

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17420

研究課題名(和文) 膵液中エクソソームによる膵癌進展機序の解明と新規診断法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of pancreatic cancer progression by exosomes in pancreatic juice and development of a novel diagnostic method

研究代表者

滝川 哲也 (Takikawa, Tetsuya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70836882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌患者と良性疾患患者の血清からエクソソームを単離しRNAを抽出した。次に両患者間のエクソソーム中の遺伝子プロファイルの相違を次世代シーケンサーを用いて解析した。本研究では、近年様々ながん腫の発生や進展に関与していると注目されている long non-coding RNA (lncRNA) に対象を絞って検討を行い、膵癌患者で顕著に上昇する lncRNA を 12 種類、低下する lncRNA 16 種類をバイオマーカーの候補として同定した。今後は候補 lncRNA について、どの組み合わせが診断に最も有用か、早期の膵癌診断にも応用できるか、といった検討を追加していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌はわが国の部位別癌死亡数の第4位を占め、高齢化の進行に伴い今後さらなる患者数の増加が予想される。膵癌は外科的切除が唯一の根治療法であるが、画像診断技術が進歩した現在においても早期診断が困難であり、新しいバイオマーカーの開発が期待されている。

本研究では、血清エクソソーム中の long non-coding RN が新しいバイオマーカーの候補となり得ることを示した。血液検体採取は比較的簡便で侵襲も少ないため、検診における膵癌スクリーニングなどへの応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes were isolated from the sera of patients with pancreatic cancer and benign diseases, and then total RNA was extracted from the exosomes. We compared the gene expression profiles of the exosomes between pancreatic cancer and benign diseases using next-generation sequencer. We focused on long non-coding RNAs (lncRNAs), which have recently attracted attention as being involved in the development and progression of various malignancies, and identified 12 lncRNAs that are elevated and 16 lncRNAs that are decreased in pancreatic cancer patients compared with benign diseases. Further research is needed to clarify which combination is most useful for diagnosis and whether it can be applied to the diagnosis of early-stage pancreatic cancer.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 バイオマーカー エクソソーム lncRNA

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌はわが国の部位別癌死亡数の第4位を占め、高齢化の進行に伴い今後さらなる患者数の増加が予想される。膵癌は外科的切除が唯一の根治療法であるが、画像診断技術が進歩した現在においても早期に膵癌を診断することは非常に困難である。

近年、細胞外分泌小胞である「エクソソーム」が多くの癌で発癌や進展、抗癌剤耐性などに寄与することが明らかになっている。エクソソームは核酸やタンパク質を内包しており細胞間情報伝達ツールとして機能する。脂質二重膜の保護効果により内包されるため、RNA など分解されやすい生体分子であっても、血液などの体液中でも安定して存在できる特徴をもつ。そのため組織採取を行わず体液から癌の診断を行う、リキッドバイオプシーのキープレイヤーとして期待されている。特にエクソソーム内の「マイクロ RNA (miRNA)」や「長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)」と呼ばれるノンコーディング RNA を診断に用いようとする試みは、多くの癌種で報告されている。エクソソームを用いた新規診断法の開発は膵癌の領域でも非常に期待されているが、まだ実臨床に応用できる段階には至っていない (Romano R et al. *Cells* 2021.)。また、これまでの報告の多くは血液検体を用いたものであり、エクソソームは全ての細胞が分泌していることを考えると、早期診断と考える腫瘍量が少ない段階で血液検体から癌特異的なエクソソームを検出できるかは懸念が残る。この問題の解決策として、膵特異性が高い体液である膵液に注目した。

申請者はこれまで膵癌周囲の線維性間質形成に中心的な役割を果たす膵星細胞に注目し、膵癌 - 膵星細胞相互作用の観点から膵癌進展に関わる分子機構の解明を行ってきた。そして、膵星細胞が膵癌細胞の EMT (上皮間葉転換) を誘導し浸潤能を増強すること、癌細胞の幹細胞性を増強すること、膵癌の放射線感受性を低下させることなどを明らかにした。また早くから miRNA やエクソソームの存在に着目して、膵癌 - 膵星細胞相互作用に miRNA やエクソソームが関与していることを明らかにしてきた。膵癌は前癌病変 ~ 非浸潤癌の段階から周囲に線維化領域を伴うことが分かっている。このことは、かなり早期から膵癌 - 膵星細胞相互作用による機序が膵癌の発生・進展に関わっていることが示唆され、さらにその相互作用にエクソソームが大きく関与している可能性がある。

膵癌特異性が高い膵液中エクソソームに着目し、膵癌の早期段階におけるエクソソームの関与を明らかとし、早期診断につながるバイオマーカーの開発を目指して本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は膵液中エクソソームとそれに内包される miRNA や lncRNA による膵癌進展機構を解明し、早期診断のために新規バイオマーカーを開発することである。

## 3. 研究の方法

(1) 膵癌患者血液検体からキットを用いてエクソソームの単離し、ウエスタンブロッティングで存在確認を行う。

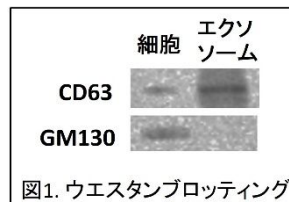
(2) 血清由来エクソソームから total RNA 抽出し、バイオアナライザを用いて質的評価を行う。

(3) 膵癌患者と良性疾患患者の血液由来エクソソームにおける、長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) の発現プロファイルの変化を次世代シーケンサーで網羅的に解析する。

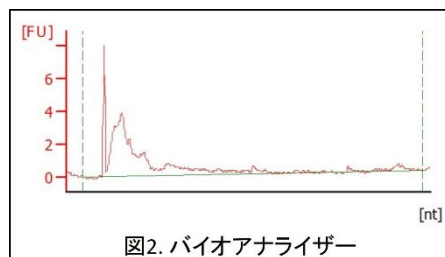
## 4. 研究成果

(1) 当初はマウスとヒトの膵液から超遠心法によりエクソソーム単離を試みたが、収量が少なく安定的な採取が困難であった。そこで、膵癌患者の血清エクソソームを用いたバイオマーカーの開発を目指すこととした。

膵癌患者の血清からキットを用いてエクソソームを単離しタンパクを抽出した。コントロールとして膵癌細胞からタンパクを抽出し、エクソソームマーカーである CD63 がエクソソーム由来タンパクに含まれていることを確認した。また、細胞成分のコンタミネーション除外に用いられる GM130 がエクソソーム由来タンパクでは発現していないことを確認した (図1)。



(2) 膵癌患者3例、良性疾患患者3例 (慢性膵炎2例、胆嚢ポリープ1例) の血清からエクソソームを単離し、total RNA を抽出した。バイオアナライザを用いてエクソソーム由来 RNA サンプルとして既報 (Eldh M et al. *Mol Immunol* 2012.) と同じ品質であること、次世代シーケンサーを施行できる RNA 量が収集されていることを確認した (図2)。



(3) 膵癌患者 3 例と良性疾患患者 3 例の血清エクソソーム由来の total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて 57,955 個の遺伝子を解析した結果、 $P < 0.05$  かつ膵癌患者において発現量が 4 倍以上上昇する遺伝子は 227 個、4 倍以上低下する遺伝子は 276 個であった。その中で 4 倍以上上昇する lncRNA は 12 個、4 倍以上低下する lncRNA は 16 個であった。これらの lncRNA についてリアルタイム RT-PCR で validation を試みたが、ばらつきが多く安定的な結果が得られなかった。これはエクソソームからの RNA 収量が少ないことが原因と考えられた。現在、より収集量が多くなるよう新しいキットを用いる、より微量の発現変化を確認できるデジタル PCR で解析する、といった対応を考えている。

今後さらなる検討が必要であるが、血清由来エクソソーム中の lncRNA は膵癌診断の新規バイオマーカーになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takikawa Tetsuya, Kikuta Kazuhiro, Hamada Shin, Kume Kiyoshi, Miura Shin, Yoshida Naoki, Tanaka Yu, Matsumoto Ryotaro, Ikeda Mio, Kataoka Fumiya, Sasaki Akira, Nakagawa Kei, Unno Michiaki, Masamune Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical features and prognostic impact of asymptomatic pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4262 ~ 4262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08083-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Shin, Takikawa Tetsuya, Kikuta Kazuhiro, Hamada Shin, Kume Kiyoshi, Yoshida Naoki, Tanaka Yu, Matsumoto Ryotaro, Ikeda Mio, Kataoka Fumiya, Sasaki Akira, Hatta Waku, Inoue Jun, Masamune Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Focal Parenchymal Atrophy of the Pancreas Is Frequently Observed on Pre-Diagnostic Computed Tomography in Patients with Pancreatic Cancer: A Case-Control Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1693 ~ 1693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11091693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝川 哲也, 菊田 和宏, 正宗 淳
2. 発表標題 当院における検診・他疾患フォロー中に無症状で発見された膵癌の長期予後
3. 学会等名 第29回日本消化器病関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 晋, 滝川 哲也, 糸 潔, 菊田 和宏, 濱田 晋, 吉田 直樹, 池田 美緒, 佐野 貴紀, 松本 諒太郎, 田中 裕, 正宗 淳
2. 発表標題 膵臓のくびれ所見は膵癌発症の前兆か?
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝川 哲也, 菊田 和宏, 正宗 淳
2. 発表標題 当院における無症状で発見された膵癌の特徴と長期予後
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------