

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592039

研究課題名(和文)血清マイクロリボ核酸による膵癌早期診断の可能性

研究課題名(英文)Detection of pancreatic cancer by serum microRNA

研究代表者

土田 明彦(Tsuchida, Akihiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：50207396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の早期診断を目的に、膵癌患者血液中のmicroRNAをマイクロアレイ法によって解析を行った。その結果、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-1275及びhsa-miR-3648が、健常者あるいは良性膵疾患患者に比べて、膵がん患者において有意に上昇していた。特にmiR-1275は平均3.6倍に上昇していることが確認された。今後はさらに、これらmiRNAの膵癌における意義、機能を解析していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the serum microRNA in patients with pancreatic cancer by microarray. The results showed that hsa-miR-188-5p, hsa-miR-1275 and hsa-miR-3648 were significantly higher in pancreatic cancer patients than those in healthy volunteer or patients with benign pancreatic disorders. Especially, miR-1275 increased 3.6 times in average. In future, we have a plan to analyze the role and function of these microRNA in pancreatic cancer.

研究分野：膵臓外科

キーワード：膵癌 microRNA 早期診断

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は 19~24 塩基の短い一本鎖の非コード RNA で、ヒト・動物・植物・ウィルスゲノムにコードされた内因性のヘアピンループ構造を形成する転写産物である。近年の研究で、miRNA は標的となる遺伝子に結合し、分化・細胞増殖・アポトーシス・発達などに関与する多数の標的遺伝子の発現を制御することが明らかになってきた。特に、種々のがん腫における miRNA の発現異常等の存在が発見され、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子としての機能と、腫瘍の発生・進展への関与が示唆されている。これまでに研究者らは、白血病、肝細胞がん、大腸がんにおいて、miRNA-17-92 cluster の一つである miR-92 に注目し、組織中および血清中の濃度を測定した。その結果、いずれのがんにおいても、miR-92 は血液中では健常者と比べて低値になることが示された。以上の結果は、血清 miRNA の検出が診断に有効であることを示すものである。(Tsuchida A, Kuroda M et al. *Cancer Sci.* 102(12):2264-71. 2011, Shigoka M, Tsuchida A, Kuroda M et al. *Pathol Int.* 60(5):351-7. 2010, Tanaka M, Kuroda M et al. *PloS ONE* 4 (5): e5532., 2009)。近年、膵がんにおいても、RT-PCR assay や microarray を用いて miRNA の網羅的解析がいくつか報告されているが、臨床応用には至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

腫瘍発生に関与する miRNA が、細胞内のエクソソームによって分泌され、miRNA が液性因子として全身的に作用することにより、

組織の発がんに関与するという新たな概念が蓄積されつつある。また、エクソソームではなく、ago と miRNA の複合体が血液中に循環していることが明らかになっている(PNAS 201 108:5003)。また、エクソソームの分泌に関与する分子も明らかになってきた(*Nat Cell Biol* 2010 12:19)。この、miRNA のバイオロジーを応用することにより、革新的ながんの診断と治療が展開される。本研究を進めることで、従来非観血的な早期診断が不可能だった膵がんの診断、さらにこれまでにない治療が実用化される。この研究開発は、新規の産業を創出し、がんの死亡率を速やかに抑制する社会貢献が出来る。

3. 研究の方法

(1)膵がん患者血液中に存在する miRNA の同定

血液中に存在する分泌型 miRNA にはエクソソーム/microvesicle に内包されて存在するものと、Ago2 complex に結合して存在するものがある。miRNA は、いずれの状態においても、血液中において RNase 抵抗性である。本研究項目においては、これらの miRNA に関して、ショ糖密度勾配による遠心法によって分離し、その後 miRNA を単離し、Agilent 社のマイクロアレイ法によって解析する。

(2)膵がん細胞におけるエクソソーム/microvesicle の蛋白解析

エクソソーム/microvesicle は、細胞と同様の成分を持った小胞である。エクソソームに特徴的なタンパク質として CD63 を初めとした分子が同定されているが、一方で Her2 タンパク質の様に乳がんにて特異的発現する

分子もエキソソームに同定されている。本研究項においては、膵がん患者血漿中からエキソソームを分離して、2D-DIGE 法及び LC-MS/MS によるタンパク質の同定を行う。

(3) 膵がんを標的とした miRNA の単離

膵がんに対する化学療法剤は限られていることから、新規の薬剤の開発が望まれている。このような背景から、本項目においては、我々が開発した、miRNA ライブラリーを用いて、膵がんの増殖を抑制する anti-onogenic な miRNA を単離する。具体的には、ヒト膵がん培養細胞 (Panc-1, MIA PaCa-2 Capan-1) に、500 種類のレンチウイルス miRNA vector を導入する。その後、細胞死を引き起こす miRNA を同定していく。我々の、開発したプレートタイプのシステムは、効率よく miRNA のスクリーニングが可能である。

(4) マウス実験による抗腫瘍効果及び安全性の検討

項目(3)において、膵がんに対して増殖を抑制する miRNA の単離を行っている。この単離された miRNA の in vivo での増殖効果を検討するために、マウス移植モデルを用いた検討を行う。具体的には、膵がん培養細胞株 (PANC-1, MIA PaCa-2, KLM-1, Capan-1, PK-1, PK-8) に、Luciferase を導入した細胞を樹立する。これらの細胞を RAG マウスに移植していく。腫瘍細胞を移植したマウスに対して anti-oncogenic miRNA を含有したエキソソームを尾静脈より静注し、抗腫瘍効果を検討していく。腫瘍効果の判定には、IVIS Imaging System を用いる。また、エキソソームを産生する細胞には、HEK293 を用いる。

4 . 研究成果

膵臓がんは、がんにおける死因の第 5 位を

占める。また、膵臓がんは予後不良のがんであり、膵臓がん患者全体の 5 年生存割合は 5 % に満たない。膵臓がん患者の予後が不良である原因は、再発・進行膵臓がんに対する有効な薬剤が限られていることに加え、早期発見の手段が確立していないことが挙げられる。従って膵臓がん患者の予後改善のためには、非侵襲的な早期診断法の確立が必要不可欠であり、本研究では、これまで上記検討を行った。

具体的には、患者血清から RNA を単離しマイクロアレイ法によって解析を行った。その結果、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-1275 及び hsa-miR-3648 が、膵臓がん患者において有意に上昇していた。特に miR-1275 は平均 3.6 倍に上昇していることが確認された。今後はさらに、これら miRNA の膵臓がんにおける意義、機能を解析していく予定である。最終的には、以上の結果を踏まえて、分子標的医薬品の開発を目指していく。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Taniguchi T, Sumida T and Mamura M.(3rd of 18) Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2 and Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. Nature communications. 2015 in press. 査読有
2. Nakayama Y, Kuroda M. (5th of 5) Evaluation of the Human Papillomavirus mRNA Test for the detection of cervical lesions in Japan. Eur J Gynaec Oncol. 2015

- 36(2):192-6. 査読有
3. Toyono T, Usui T, Yokoo S, Kuroda M, Amano S. (6th of 8). Angiopoietin-like 7 is an anti-angiogenic protein required to prevent vascularization of the cornea. PLoS One. 10(1) e0116838. doi: 10.1371/journal.pone.0116838. 2015. eCollection 2015. 査読有
 4. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K. Kuroda M and Ishibashi T. (19th of 20). Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. Gene Ther. 2015 22(2): 127-37. doi: 10.1038/gt.2014.112. 査読有
 5. Horita A, Kurata A, Ohno S, Kuroda M. (7th of 7). Immaturity of smooth muscle cells in the neointima is associated with acute coronary syndrome. Cardiovasc Pathol. (in press) 2014. 査読有
 6. Nakaya T, Kurata A, Hashimoto H, Kuroda M. (8th of 8.) Young-age-onset pancreatoduodenal carcinoma in Shwachman-Diamond syndrome. Pathol Int. 2014 64(2):75-80. doi: 10.1111/pin.12133. 査読有
 7. Nakaya T, Morita K, Kurata A, Ushiku T, Igarashi T, Kuroda M, Fukayama M. (6th of 7). Multifocal Kaposiform Hemangioendothelioma in Multiple Visceral Organs: An Autopsy of 9-Day-Old Female Baby. Human Pathology. 2014. 45(8):1773-7. doi: 10.1016/j.humpath.2014.03.019. Epub 2014 Apr 18. 査読有
 8. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo M, Nakao K,

Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. (11th of 12). KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. Cancer Res. 2014. 74(10):2882-91. 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2574

〔学会発表〕(計 38 件)

1. 黒田雅彦. microRNA 生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析. 第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会場(名古屋)、2015 年 4 月 30 ~ 5 月 2 日
2. Kuroda M. Development of novel form of mimic microRNA for lung cancer therapy. AACR Annual Meeting 2015. Philadelphia, Pennsylvania (USA). April 18-22, 2015
3. Kuroda M. The development of short form of mimic microRNA for lung cancer therapy. 26th EORTC-NCI-ACR Symposium. 18-21th Nov 2014, Barcelona (SPAIN).
4. 許 文聰、土田明彦. 分泌型 microRNA による膵癌診断の開発. 第 76 回日本臨床外科学会総会、一般演題、郡山、2014 年 11 月 20-22 日
5. 黒田雅彦. 核酸医薬品の新展開 (Significance and applications of novel class of RNA for cancer therapy). 第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会. 慈恵医大(東京). 2014 年 8 月 30-31.
6. 黒田雅彦. エクソソームによるドラッグデリバリーシステムの応用 (Application of drug delivery systems by exosomes). 第 6 回日本 RNAi 研究会(JARI)、第 1 回日本細胞外小胞学会(JSEV). グランドプリンスホテル広島(広島) 2014 年 8 月 28-30 日
7. Kuroda M. Colon cancer stem cells and

microRNA signature during cokon cancer development. Immune-network Pioneer Research Center 2nd International Symposium 2014. Seoul (KOREA). Jul 7 2014

8. 黒田 雅彦. 肺がんを効果的に抑制する Mimic microRNA の新規形状の探索. 第 103 回日本病理学会総会、広島国際会議場 (広島) 2014 年 4 月 24 日 ~ 26 日
9. Kuroda M. Novel RNAi agent can control HCV replication. AACR Annual Meeting 2014, San Diego, CA, (USA) April 5-9, 2014
10. Kuroda M. Significance and applications of novel class of RNA for cancer therapy. Drug Discovery World Asia 2014 11-12th Mar. Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre. Suntec City (Singapore).
11. Kuroda M. Novel RNAi agent can control HCV replication. RNA Silencing (A9) Keystone symposia. Seattle, Washington (USA) Jun. 31, Feb.5, 2014
12. 黒田 雅彦. マイクロ RNA のがん治療およびがん診断への応用 新規の lipid conjugate RNA を用いたがん治療法の開発. 第 72 回日本がん学会学術総会、横浜国際会議場(横浜) 2013 年 10 月 5 日
13. 黒田 雅彦. Exosome によるがん特異的 miRNA デリバリー法の開発. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会、シンポジウム、京都、2013 年 7 月 5 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

土田 明彦 (TSUCHIDA AKIHIKO)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 50207396

(2)研究分担者

黒田 雅彦 (KURODA MASAHIKO)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 80251304

永川 裕一 (YUICHI NAGAKAWA)

東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：20349484