

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462079

研究課題名(和文) 膵液中エクソソーム解析による膵癌に対する術前放射線併用化学療法の効果予測の検討

研究課題名(英文) Clinical significance of the exosome detected in the pancreatic juice in the setting of preoperative chemoradiation therapy for pancreatic adenocarcinoma

研究代表者

高橋 秀典 (Takahashi, Hidenori)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・副部長

研究者番号：90601120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌に対する術前治療の効果を膵液中のエクソソームから予測可能かどうかを検証する研究である。膵液エクソソームは採取可能であり、遺伝子発現を検討可能であることは確認できたが、収量は非常に少なく、網羅解析などには応用できなかった。候補遺伝子を絞り込むために、術前治療施行患者の血清エクソソームをmicroRNA arrayを用いて解析し、治療効果と関連するmoleculeの候補を抽出したところ、予後良好群・不良群と有意に相関するmiRNAが同定された。エクソソーム内のmiRNAは術前治療の効果予測が可能である可能性が示唆され、今後、膵液エクソソームにおけるこれらのmiRNAについて解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the clinical significance of the exosome obtained in the pancreatic juice in the setting of preoperative chemoradiation therapy for pancreatic cancer (PC). First, we revealed that the pancreatic juice contains the exosome suitable quality for the analysis of mRNA and miRNA expression and that those exosome could be extracted from the pancreatic juice obtained during ERCP under various conditions. Second, we extracted the exosomes from the serum obtained from the patient with PC who were treated by preoperative chemoradiation therapy, and micro RNAs in those exosome were assessed using the micro RNA array. We identified several miRNAs (including mir-22, mir-122, and mir-320) that were significantly associated with the prognosis. Further investigation is planned to assess the biological significance of those miRNAs obtained from the pancreatic juice with the special attention to predict the therapeutic effect of preoperative treatment for PC.

研究分野：医学

キーワード：膵癌 エクソソーム 術前化学放射線療法 効果予測

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は消化器がんの中でも非常に予後が悪く、外科的切除に化学療法、放射線治療を加えた集学的治療が必須である。当センターでは膵外浸潤陽性切除可能膵癌(Stage III, IVa, 膵癌取り扱い規約第6版)に対し gemcitabine 併用術前化学放射線療法(CRT)を施行しており、5年生存率57%と良好な成績を報告している。これらの症例について切除標本の病理組織学的効果(局所効果)と予後を検討すると、効果良好群(組織学的に90%以上の腫瘍破壊が認められたもの)、効果不良群(組織学的腫瘍破壊が90%未満のもの)の5年、10年生存率は、それぞれ71% vs 50%、71% vs 34%であり効果良好群が有意に予後良好であった。数年前までは効果の認められた抗がん剤としては唯一 Gemcitabine(ジェムザール®)のみであったが、近年、S-1(TS-1®)や erlotinib(タルセバ®)、FOLFIRINOX(5-FU+Leucovorin+Irinotecan+Oxaliplatin)や nab-Paclitaxel(アブラキサン®)などの有効性が報告され、膵癌の治療成績も徐々に改善してきている。このように治療法が多岐にわたるにつれ、個々の膵癌症例にどの治療法が有効かを早期に診断する治療効果予測の重要性は増しており、術前CRTによる治療戦略においても治療開始前にCRTの治療効果を予測し、個々の患者においてより効果的な治療法を選択することが更なる治療成績改善には不可欠である。

(2) 最近、免疫細胞や腫瘍細胞をはじめ多くの細胞がエクソソーム(exosome)と呼ばれる直径30-100nmの小型膜小胞を放出することがわかってきた。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた小嚢胞で、分泌細胞とその標的細胞の間でタンパク質や脂質を交換する重要なメッセンジャーであることが明らかとなりつつある。またエクソソームには表面に分泌細胞と同様の抗原ペプチドやMHC複合体が発現しているほか、内側には分泌細胞由来の mRNA や microRNA が存在することが明らかとなっており、これらが細胞間の遺伝情報伝達や腫瘍細胞による免疫抑制誘導に与する可能性が示唆されている。さらにエクソソームが分泌細胞の遺伝情報などを反映していることから、エクソソーム内の mRNA、miRNA を解析することは分泌細胞の生物学的特性を診断する手段として期待されている。エクソソームは脂質二重膜構造を持つ小嚢胞であるため、比較的周囲環境の影響を受けにくく、内包する mRNA や microRNA も安定している可能性が高いと言われている。膵癌細胞が分泌するエクソソームを解析することで、治療抵抗性などそれぞれの癌の持つ特性を把握することが可能ではないかと考えられる。膵腫瘍の診断目的にて ERCP(内視鏡的逆行性胆管膵管造影)下に採取された膵液は遠沈され、沈殿した pellet は細胞診に用いられるが、通常診療では上清は廃棄される。本研究ではこの上清をもちいて膵液中エクソソ-

ム解析を行う。

2. 研究の目的

(1) 切除可能膵癌に対する施行予定の患者から治療開始前に膵液を採取し、膵液中のエクソソームに含まれる mRNA、microRNA(miRNA)を解析することにより、放射線および抗がん剤耐性に関与する因子の発現を検討する。これら mRNA、miRNA の発現状況と切除標本の病理組織学的診断と比較検討することにより、術前 CRT の治療効果に関連する因子を同定し、化学放射線療法開始前に治療効果を予測する新たな方法を確立することを目的とする。

(2) 我々は既に、様々な条件下で処理・保存された膵液上清からエクソソームの分離し、エクソソームから mRNA、miRNA の分離を試みる Preliminary な実験を施行済みである。その結果にて膵液上清からエクソソームが分離可能であり、更に解析に十分な quality の mRNA、miRNA が抽出可能であることが示されていた。一方、収量の問題で、多くの mRNA、miRNA を探索的に検討できない場合には、検証する molecule を絞る必要がある。その際には、当センターで術前 CRT 施行後に根治切除を行った膵癌患者の血清を用いて、血清中のエクソソームを抽出し、mRNA、miRNA を網羅的に解析することにより、治療効果に関連する molecule の候補を抽出し、上記の膵液エクソソーム解析に feedback することとした。

3. 研究の方法

(1) 膵液からのエクソソーム抽出:

膵腫瘍の診断目的にて ERCP(内視鏡的逆行性胆管膵管造影)下に採取された膵液は遠沈され、沈殿した pellet は細胞診に用いられるが、通常診療では上清は廃棄される。本研究ではこの上清をもちいて膵液中エクソソーム解析を行った。回収した膵液上清をエクソソーム抽出濃縮キット(ExoQuick®, System Bioscience)にて抽出し、mRNA、miRNA の quality、収量を確認した。

(2) 術前治療前後の血清エクソソーム中の miRNA の変化と治療効果の関連に関する網羅的解析:

術前 CRT の効果に関係する miRNA を同定するため、当センターで術前化学放射線治療施行後に根治切除術を施行した膵癌患者の中で、病理学的効果不良(Evans grade I)かつ1年以内に再発を来した予後不良群(A群)6例(A1~A6)と、病理学的効果良好(Evans grade III or IV)でかつ2年以上無再発であった予後良好群(B群)6例(B1~B6)との術前治療前後の血清を用いた。まず A 群 6 例と B 群 6 例のそれぞれ治療前、治療後の血清サンプル 24 検体からそれぞれ血清エクソソームを抽出し、これを Affimetrix 社製の GeneChip miRNA 4.0 array を用いて網羅的に microRNA array を施行した。得られた発現量をもとに、各サンプルにおいて、治療前後の発現比を計算し、

予後不良群(A群), 予後不良群(B群)において特徴的なmiRNAを同定することにより, 治療効果予測に効果的なmiRNAの候補を検索した.

4. 研究成果

(1) 膵液からのエクソソーム抽出:

採取したエクソソームから mRNA を抽出し, quality を check するために, まずこの mRNA を用いて GAPDH, β -Actin の発現を PCR 法にて検証した. その結果, 膵液の原液から抽出したエクソソーム由来の mRNA は十分 PCR に耐えうる quality であることが確認できた. しかし, 膵液内のエクソソームから抽出できる mRNA は平均 2ng/ul と非常に微量であるため, 頻回の PCR を行うことが出来ないということ, また取れる量が微量であるため, (そのままでは) 発現の定量には不向きであるということが判明した. 膵液の収量の増加のためにセクレチン負荷下に ERCP・膵液採取を行う preliminary な検討の結果, セクレチン負荷によって膵液採取量は平均約 1.4 倍に増加することが判明したが, それでも多くの mRNA, miRNA を探索的に検討するには十分な量ではないことが判明した. これらの結果をもって, 膵液エクソソーム解析の target を絞るために, 血清中のエクソソームを網羅的に解析し, 術前 CRT の治療効果に関わる molecule の候補を抽出する検討を行うこととした.

(2) 術前治療前後の血清エクソソーム中の miRNA の変化と治療効果の関連に関する網羅的解析:

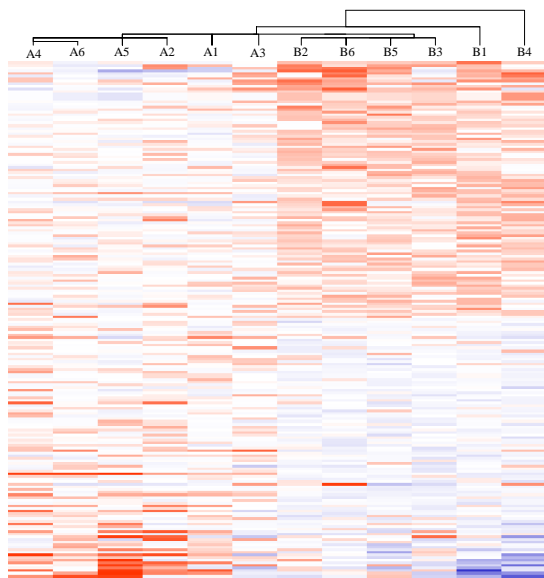


図1 クラスタ解析

GeneChip4.0array に搭載された約 36000 の miRNA のうち, ヒト由来の miRNA 6248 個を対象とした. その中で, 治療前サンプルである 12 サンプルにおいて miRNA の発現が 2 症例以上で極端に低く, 検討に耐えうる quality が維持できないものを除いた 3656 個の miRNA を対象とした. まず 3656 個全体でクラスタ解析を行ったところ, 図 1 のデンドログラムに示すように, 予後不良群(A1~6)と予後良好群(B1~6)は, 良好に分けることが可能

であった. また, A 群で高値であった 100 個の miRNA と B 群で高値であった 100 個の miRNA を用いて Heatmap を作成したが, 図 1 に示すように, この 2 群間で有意に miRNA の発現に差があることが示された. さらにこれらの miRNA を具体的に示したものが表 1 である. 左のカラムは予後不良群で上昇した miRNA の上位 20 個を示している. この中には, 細胞増殖や転移, 治療抵抗性に強く関与しているとされる let-7 系の miRNA が多く含まれていることが判明した. また最上位の mir106b は前立腺がんにおいて, PTEN を介して細胞の増殖に関与することがすでに報告されており (Thangavel C et al. Cell cycle2013), mir23a は膵癌においてがん抑制遺伝子である PDCD2, BTG2, NEDD4L を抑制することにより, 根治切除後の予後規定因子であると報告されている (Frampton AE et al, Gastroenterology2014). ただし, この報告においても術前治療の効果判定などについては一切述べられていない. このように予後不良群で上昇している miRNA の多くは細胞増殖や転移などに関連していると思われる, エクソソーム中のこれら miRNA の測定が予後不良群の同定に関与している可能性は高いと思われる.

表1 予後と関連を認めたmiRNA

予後不良群で高値	予後良好群で高値
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-6776-5p
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-6735-5p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-4793-3p
hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-6756-5p
hsa-miR-1263	hsa-miR-2277-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-5787
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-6732-5p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-6780b-5p
hsa-miR-423-5p	hsa-miR-4722-3p
hsa-miR-146a-5p	hsa-mir-6858
hsa-miR-3201	hsa-miR-381-3p
hsa-miR-451a	hsa-miR-4487
hsa-miR-5004-5p	hsa-miR-6834-5p
hsa-miR-8074	hsa-mir-550a-3
hsa-miR-139-5p	hsa-mir-550a-2
hsa-miR-6858-5p	hsa-mir-550a-1
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-552-3p
hsa-mir-8081	hsa-mir-6867
hsa-miR-4532	hsa-miR-6769b-5p
hsa-mir-1289-2	hsa-miR-376c-3p

一方で, 予後良好群で上昇しているものの中では, mir-381 が FGFR2 を介して頭頸部癌における細胞増殖抑制作用が報告されており (Yang X et al, Am J Cancer Res2017), mir376c は頭頸部癌において RUNX/Activin-A axis を介してリンパ節転移関連すると考えられている. (Chang WM et al, Cancer Res2016). このように今回検索した miRNA では, 細胞増殖, 転移などに関連する miRNA が候補として detect 出来ており, これらが術前治療の効果予測マーカーとなる可能性が高いと思われる.

る。今後はこれらのマーカーをさらなるサンプルを用いて検討するとともに、当初の目的であった腭液エクソソームでこれらのmicroRNAを利用することが出来るかどうか検証していく予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀典 (TAKAHASHI, Hidenori)
大阪国際がんセンター(旧 大阪府立成人病センター) 消化器外科 副部長
研究者番号：90601120

(2) 研究分担者

秋田 裕史 (AKITA, Hirofumi)
大阪国際がんセンター(旧 大阪府立成人病センター) 消化器外科 副部長
研究者番号：70528463

井岡 達也 (IOKA, Tatsuya)
大阪国際がんセンター(旧 大阪府立成人病センター) 消化器検診科 副部長
研究者番号：70501815

手島 照樹 (TESHIMA, Teruki)
大阪国際がんセンター(旧 大阪府立成人病センター) 放射線腫瘍科 主任部長
研究者番号：40136049

富田 裕彦 (TOMITA, Yasuhiko)
大阪国際がんセンター(旧 大阪府立成人病センター) 病理細胞診断科 主任部長
研究者番号：60263266