

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10194

研究課題名(和文)胆汁分泌小胞中miRNAの解析による胆管癌の早期診断マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of diagnostic biomarker for cholangiocarcinoma by analysis of miRNA in exosome of bile

研究代表者

竹村 茂一 (TAKEMURA, Shigekazu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00322363

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)：胆道がん症例から採取した胆汁の酸化還元動態、胆汁酸組成、変異原性および胆汁中のエクソソームに含まれるmiRNAを解析した。胆道癌症例の胆汁には酸化型グルタチオンが有意に多く、二次胆汁酸の割合が高いことが判明した。各種病態より採取された胆汁の変異原性試験は陰性であった。胆汁中エクソソームに含まれるmiRNAは既法では安定して採取できなかったため、新規の回収法を開発し、胆汁中エクソソームに含まれる胆管癌特異的miRNA候補を検出することができた。

研究成果の概要(英文)：We examined redox dynamics, bile acid composition and mutagenicity of bile obtained from biliary tract cancer patients. Furthermore, miRNAs contained in exosomes purified from bile were analyzed. Bile obtained from biliary tract cancer patients contained significantly more oxidized glutathione. Bile acids in the bile of patients with biliary tract cancer were found to contain a lot of secondary bile acids. The mutagenicity by the umu method was negative for all tested bile. Exosomes in the bile could not be stably collected by the known methods. We have developed a novel method to reproducibly extract exosomes from bile. Candidate miRNAs specific for biliary tract cancer were identified.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胆道癌 胆汁 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1)胆道癌(胆管癌+胆嚢癌)の罹患数は2005年に男性9237人、女性9399人、5年後の2009年には男性8598人、女性9001人の死亡数であり、罹患数と死亡数がほぼ同じことから胆道癌は予後不良の疾患である。この原因として、肝内胆管癌や末梢に発生する胆管癌は症状が現れにくく、発見が遅れることが一因である。早期発見・診断を目指してこれまで血液中や癌細胞中のmiRNAを網羅的に解析することで胆道癌特異的な診断マーカーを見つけようと多くの研究がなされてきた。胆管癌においてはmiRNA-26aが癌の増殖を促進すること(Gastroenterology 2012;143:246-56)や化学療法の有効性と関連するいくつかのmiRNAなどが報告されているが、その特異度は高くなく臨床的には使用されていない。胆道癌の発生母地である胆管上皮細胞の血流空間以外のもう一つの分泌局面は胆道系であるが、この胆汁中に分泌されると推測されるmiRNAを解析しているものはほとんどない。近年、胆汁中に分泌される細胞外小胞中のmiRNAが胆管癌の診断マーカーとして重要ではないかとの報告がある(Hepatology 2014;60:896-907)。よって、胆汁中の細胞外小胞に含まれるmicroRNA(miRNA)を解析し、胆管癌の特異的なバイオマーカーを見いだすことは早期発見・診断につながる非常に重要で臨床課題である。

(2)印刷会社で校正業務に携わり有機溶媒の高濃度で暴露された経験のある人に通常より高い確率で胆管癌が発症していることが社会的な問題となっている。当該勤務地が大阪であったこともあり、大阪市立大学(当院)では、全国に先駆けて印刷関連業務により高頻度に胆道発癌を生じうることを報告した。我々は同社に従事経験のある印刷労働者をスクリーニングし、更に3例の胆管癌を発見、手術を含む治療を担当するという貴重な経験を得た。当該印刷会社では「ジクロロメタン」や「1,2-ジクロロプロパン」などの塩素系の有機溶剤を洗浄の為に多量に扱っていたことから、これらの溶剤と胆管癌の関係性が疑われているが、明確な因果関係はわかっていない。そこで、これらの溶剤を扱う職場にいた経験があり、胆管癌の疑いや肝機能障害と診断された患者様を集中的に検診することで、胆管癌と溶剤の因果関係や発癌のメカニズムの解明、より良い治療法の開発を目的に当病院では2012年8月より、全国に先駆けて、胆管癌特別外来を設置してきた。これまでも、申請者らは印刷業従事者の胆管癌患者の胆汁と印刷業背景を有しない肝癌患者の胆汁を分析し、相違点を見出すことで胆管癌、特に印刷業特異的な胆管癌の診断マーカーを探索している(H25-26 挑戦的萌芽研究)。本研究に於いて胆管癌、肝癌、胆石症例等の患者胆汁中の酸化物質(脂質過酸化物質など)またはチオール動態を分析、変異原性試験による胆汁中の発癌性物質

のスクリーニングを行っている。しかしながら、これらの解析結果から胆管癌とそれ以外の症例とを差別化する明確な因果関係は未だ見つかっていない。その原因として、当初予想していたように胆管癌と診断が確定している時点では、有機溶剤への高濃度暴露より数年経過しているため、すでに酸化ストレスマーカーや変異原性の増加は失われている可能性も想定していた。一方、通常型の場合、胆管癌再発の術前、術後の酸化ストレスマーカー、変異原性テストの値はどちらも著明に増加することが報告されている。そこで、すでに多くの癌の診断および予後のバイオマーカーや薬物反応予測の候補因子として注目されている腫瘍関連miRNA分析を追加することにより、これまで行ってきた解析項目との相関および胆管癌に特徴的なmiRNAの同定を行い独自の早期診断マーカーを構築することが可能と考えた。

2. 研究の目的

肝内や末梢胆管に発生する胆管癌では黄疸などの特徴的な症状が無く、発見時には病期が進行していることが多い。現在のところ胆管癌は化学療法の奏率が低く、根治切除のみが長期生存を期待できる治療であるため早期発見が特に重要であり、胆管癌の早期診断マーカーの確立が急務である。近年、エクソソームなどの分泌小胞による細胞間伝達機構が重要視されている。種々の癌においても生体分泌液エクソソーム中のmiRNAを分析することにより特異性の高い癌診断マーカーを見つけようとする試みがなされている。そこで本研究では、予後不良の胆管癌の減少に貢献することを最終目的とし、肝胆膵癌患者(印刷業含む)胆汁中に分泌される細胞外小胞中のmiRNAの動態解析と胆膵内視鏡(ERCP)や胆汁の代謝物解析(レドックス、胆汁酸組成、変異原性)など従来の診断法とを組み合わせた独自の早期診断法の開発を行う。

3. 研究の方法

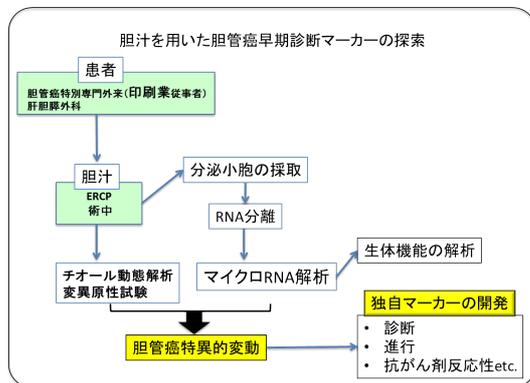
(1)【胆汁のレドックス動態をHPLC-ECDで解析する】これまでの分担者・南山が代表者で推進している研究では、印刷業従事者の胆管癌の発がん機構に何らかの化学物質の代謝による酸化ストレスが関与しているのではないかという仮説のもとに行っている。即ち、Fig.1にも示した通り、システインおよびチオール化合物は、発癌因子である活性酸素と反応し、酸化型ジスルフィドを形成することから、酸化ストレスの指標となる。そこで、胆汁中のチオール化合物を定量して胆汁中で産生された活性酸素の量を評価する。定量は、HPLC法により分離し電気化学検出器(クーロケム)を用いて行う。本法では、システイン、グルタチオン、シスチン、酸化型グルタチオン、ホモシステイン、メチオニンなどの解析が可能である。



Fig.1 酸化ストレスと胆管癌の関係

【胆汁の変異原性試験により P450 代謝物(発癌性物質)の定量を行う】変異原性試験は、発癌性の有無を評価する重要な試験法であり、国内外の安全性試験法に用いられている。今回、サルモネラ菌の umuC 遺伝子発現を利用した umu テストを用いて胆汁の変異原性試験を行う。

(2)【胆汁細胞外小胞中 miRNA の胆管癌特異的変動を解析する】近年、癌細胞が分泌するエクソソームと呼ばれる小胞に含まれる miRNA やペプチド、タンパクが、癌細胞の増殖・浸潤・転移において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。肝細胞癌では、miR-15b, 18a, 21, 106b, 221, 222, 224 の発現上昇および let-7, miR-101, 122a, 125a, 195, 199a, 200a の発現低下が見られるなど、様々な癌においてエクソソーム中の miRNA の変動と癌およびその転移との関係が報告されつつある。本研究では肝胆膵外科の臨床医である利点を生かし、血液中の miRNA ではなく、胆道系腫瘍が直接接する胆道系に分泌される胆管内視鏡 (ERCP) 下で採取した胆汁中の miRNA および胆汁小胞由来の miRNA の変動を胆道がん症例と正常者さらには肝臓がん、膵臓がん患者のものと比較する。



具体的には、胆汁中から直接あるいは胆汁中から単離したエクソソームより miRNA を含む小分子 RNA を回収し、マイクロアレイにより

その変動を解析する。胆汁中から採取可能な miRNA はごく少量である可能性が考えられるが、連携研究者の藤原は、これまでに 30ng-70ng のごく少量の RNA 量でもマイクロアレイによる miRNA 解析する手法の開発に成功している。また、マイクロアレイに比べ、RNA シークエンサーで得られる情報量は圧倒的に多いが RNA 量が必要となる。そこで、RNA を専門とする藤原の協力により、高純度で高収量が得られより簡便な胆汁からの RNA 分離法を開発する。

4. 研究成果

肝胆膵疾患症例において ERCP や術中に採取した胆汁のレドックス動態、脂質過酸化物などを測定、胆汁の変異原性試験を施行するとともにヒト(印刷業従事胆管癌を含む)胆汁中に分泌された細胞外小胞を単離、さらに内包する miRNA の解析を施行した。

【胆汁のレドックス動態を HPLC-ECD で解析する】印刷従事者胆管癌 4 例、印刷業以外の肝胆膵癌 43 例、非胆癌症例 14 例から採取した胆汁について酸化還元動態、変異原性試験、胆汁酸組成を検討した。印刷業従事者とそれ以外の胆管癌を HPLC 法により電化学検出器(クーロケム)で検出した結果を比較すると、印刷業従事胆管癌症例で酸化型グルタチオンの割合が有意に高く、その他のチオール含有化合物の検討でも酸化型の有意な増加が確認された。同時に施行した胆汁酸組成の解析では、胆道癌症例では非胆癌症例に比し二次胆汁酸の比率が高いことが判明した。印刷業従事者の胆管癌では発癌見時点ですでに有機溶媒暴露から年単位の長期間が経過しているため、暴露の影響は考えにくく、反復惹起された胆管炎の遷延の結果である可能性が考えられた。一方、印刷従事者を含む胆道癌症例と非胆癌症例の計 110 例の変異原性試験では全例陰性であった。

【胆汁細胞外小胞中 miRNA の胆管癌特異的変動を解析する】

胆道癌症例及び非胆道癌症例より術中に採取した胆汁を用いてエクソソームの回収を試みた。胆汁からのエクソソーム採取は今まで Ling Li らによる報告 (Hepatology 2014;60:896-907) を含め数編しか見られない。これは胆汁が高濃度の塩を含む液体で、高い pH であることなど特殊な要因が関与するため、我々も当初、市販のエクソソーム分離キットを用いた回収を試みた。結果、エクソソームの回収量はごく微量でその品質のもばらつきが大きいことが判明した。得られた少量のエクソソームから回収された RNA を解析すべく従来の RNA シークエンサー法を用いて種々の条件検討を行ったが、再現性のある結果は得られないことが判明した。そこで胆汁中のエクソソームの回収から新たな手法、条件を用いて回収法を開発した。新規の手法を用いても胆汁中のエクソソームは想定通り微量ではあったが、新規の回収法を開

発(詳細は特許申請予定のため不記載)確立し、NanoSight を用いてエクソソームの確認を行ったところ粒子径 120nm 前後の安定したエクソソームの精製が可能であった。現在では本手法を改良し、さらなる収量の増加に取り組み、胆管癌特異的なマーカーの検出を行った結果、胆汁中エクソソーム分画より miRNA をリードすることが可能となった。以上の経過より、予想はされたものの胆汁からのエクソソーム単離、miRNA の回収に非常に難渋したため当初より大幅に研究の進展は遅れたものの、現在、胆管癌 5 例、肝細胞癌 4 例、肝内胆管癌 3 例、膵癌 2 例、印刷業由来胆管癌 2 例からの採取した胆汁の解析を終了、現在得られた miRNA プロファイルより胆道癌特異的な変動を解析するとともに血中の miRNA との相同性などを検索中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 27 件)

Occupational cholangiocarcinoma caused by exposure to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. Kubo S, Takemura S, 他 7 名 *Ann. Gastroenterol Surg.* 2018 2;99:105. Doi:10.1002/ags3.12051. 査読有

MR imaging and MR cholangiopancreatography of cholangiocarcinoma developing in printing company workers. Koyama K, Kubo S, Ueki A, Shimono T, Takemura S, 他 4 名. *Jpn J Radiol.* 2017 May;35(5):233-241. doi: 10.1007/s11604-017-0626-y. 査読有

The PD-1/PD-L1 axis may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. Sato Y, Kinoshita M, Takemura S, 他 11 名, Kubo S. *Pathol Int.* 2017 Mar;67(3):163-170. doi: 10.1111/pin.12511. 査読有

Outcomes after resection of occupational cholangiocarcinoma. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, 他 30 名 *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016 Sep;23(9):556-64. doi: 10.1002/jhbp.373. 査読有

Comparison of clinicopathological characteristics between patients with occupational and non-occupational intrahepatic cholangiocarcinoma. Hamano G, Kubo S, Takemura S, 他 7 名 *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016 Jul;23(7):389-96. doi: 10.1002/jhbp.353. 査読有

Screening and surveillance for occupational cholangiocarcinoma in workers exposed to organic solvents. Kubo S, Takemura S, 他 14 名 *Surg Today.* 2016 Jun;46(6):705-12. doi:

10.1007/s00595-015-1229-9. 査読有

Outcomes of Hepatic Resection in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Patients with Diabetes, Hypertension, and Dyslipidemia: Significance of Routine Follow-Up. Nishioka T, Kubo S, Tanaka S, Wakasa K, Takemura S, 他 5 名 *Liver Cancer.* 2016 Apr;5(2):107-20. doi: 10.1159/000367752. 査読有

MicroRNA expression in hepatocellular carcinoma after the eradication of chronic hepatitis virus C infection using interferon therapy. Tamori A, Murakami Y, Kubo S, Itami S, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Takemura S, Tanahashi T, Taguchi YH, Kawada N. *Hepatol Res.* 2016 Mar;46(3):E26-35. doi: 10.1111/hepr.12518. 査読有

Pathological spectrum of bile duct lesions from chronic bile duct injury to invasive cholangiocarcinoma corresponding to bile duct imaging findings of occupational cholangiocarcinoma. Kinoshita M, Kubo S, Nakanuma Y, Sato Y, Takemura S, 他 17 名 *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016 Feb;23(2):92-101. doi: 10.1002/jhbp.305. 査読有

Different carcinogenic process in cholangiocarcinoma cases epidemically developing among workers of a printing company in Japan. Sato Y, Kubo S, Takemura S, 他 7 名 *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Jul 15;7(8):4745-54. 査読有

[学会発表](計 19 件)

S.Kubo, S.Takemura, 他 6 名 Development of cholangiocarcinoma in a printing company employee: Occupational cholangiocarcinoma. The 6th biennial meetings of the Asia-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association.2017

三牧幸代、渡邊正彦、久保正二、上原一哉 化学物質大量暴露を伴う職業性胆がんの遺伝子変異の特異性 第 76 回日本癌学会学術集会 2017

濱野玄弥、竹村茂一、他 7 名、久保正二 職業性肝内胆管癌と非職業性肝内胆管癌との臨床病理学的比較 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016

木下正彦、竹村茂一、他 6 名、久保正二 職業性胆管癌の手術成績 第 14 回日本消化器外科学会大会 2016

木下正彦、中沼安二、竹村茂一、他 6 名、久保正二 これまでの職業性胆管癌症例の検討 大阪での 17 例と新規労災認定 9 例の比較 第 115 回日本外科学会学術集会 2015

竹村茂一、上西崇弘、田中肖吾、久保正二 肝内胆管癌の病態に立脚した治療戦略の現況 第 51 回日本肝癌研究会
2015
木下正彦、中沼安二、竹村茂一、他 8 名、久保正二 当科における職業性胆管癌切除症例の病理学的検討 第 13 回日本消化器外科学会大会 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departments/zouki-g-hbps.shtml>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹村 茂一 (TAKEMURA Shigekazu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00322363

(2)研究分担者

南山 幸子 (MINAMIYAMA Yukiko)
京都府立大学・大学院生命環境化学研究科・教授
研究者番号：00362989

久保 正二 (KUBO Shoji)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80221224

(3)連携研究者

藤原 俊伸 (FUJIWARA Toshinobu)
近畿大学・薬学部・医療薬学科・教授
研究者番号：80362804

(4)研究協力者

中川 加奈子 (NAKGAWA Kanako)
高島 望 (TAKAHATA Nozomi)