

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16844

研究課題名（和文）膵液中エクソソーム由来膵癌特異的microRNAの同定による膵癌早期診断

研究課題名（英文）Establishment of the diagnosis of early pancreatic cancer by analysis of pancreatic juice-derived exosomal microRNA

研究代表者

阪上 尊彦（SAKAUE, TAKAHIKO）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90597402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は独自の手法を用いて、二つの膵液中エクソソーム由来膵癌特異的microRNAの同定に成功した。その後、膵癌患者膵液15例、慢性膵炎患者膵液11例を用いて検証したところ、既存の腫瘍マーカーや膵液細胞診よりも高い感度・特異度・正診率を示した。さらに、膵液細胞診に、この二つのmicroRNAを上乗せすることによって、より膵癌診断のバイオマーカーとして有用であることが示された。また、血清診断への応用に関する少数例での検討では、有望な結果が得られ、血清診断への導出の可能性が示唆された。さらに、膵癌根治切除後の血清において発現が低下していることから、治療効果モニタリングとしての有用性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が膵癌患者に寄与しうる効果は大きく二つある。一つ目は早期診断への応用、および病態のモニタリングである。画像診断で顕在化する前に膵癌を捉えることで飛躍的に早期膵癌を発見することが可能となり、5年生存率向上に寄与することができる。また、治療（切除、化学療法、放射線治療など）後の効果判定や病勢のモニタリングに使える可能性がある。二つ目に、本研究で同定された新規 microRNAs の標的遺伝子が新たな治療標的となり得るため、創薬にまで発展させることが出来る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in identifying two pancreatic cancer-specific microRNAs derived from exosomes in pancreatic juice using our original method. Subsequent validation using 15 cases of pancreatic juice from patients with pancreatic cancer and 11 cases of pancreatic juice from patients with chronic pancreatitis showed higher sensitivity, specificity and positive detection rate than existing tumor markers and pancreatic juice cytology. Furthermore, by adding these two microRNAs to the pancreatic juice cytology, it was shown that the microRNAs are more useful as biomarkers for the diagnosis of pancreatic cancer. In addition, a study on the application to serodiagnosis in a small number of cases showed promising results, suggesting the possibility of derivation for serodiagnosis. Furthermore, the fact that its expression was decreased in serum after curative resection of pancreatic cancer suggested its usefulness as a monitoring of treatment effect.

研究分野：消化器病学、臨床腫瘍学(特に胆膵の悪性腫瘍)

キーワード：膵癌 早期診断 バイオマーカー エクソソーム microRNA 膵液 血清診断

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良な悪性腫瘍の一つであり、年間死亡者数は年々増加しているが、早期発見・治療ができれば良好な予後が期待できる。膵癌は周囲臓器や脈管へ浸潤しやすく、また、早期診断に有用なバイオマーカーがないため、早期診断は容易ではない。膵癌の早期診断を行うためには、限局的な膵管狭窄を有する患者に対する膵液細胞診の重要性が報告されている (Pancreas 41:523-529, 2012)。しかし、膵液細胞診の診断能は 30~84.7%と施設間に差があり、有用性が一定していないという問題点がある (胆と膵 27:157-161, 2006)。

近年、様々な癌細胞はエクソソームを豊富に分泌し、微小環境における細胞間コミュニケーションを積極的に制御していることが明らかになっている (Nature 523(7559):177-82, 2015)。種々の蛋白や核酸などが安定的に内包されているエクソソームは、細胞内の分子生化学的情報を高密度に集積しているキャリアであり、これを癌の早期診断に用いるという考えは合理的である。

## 2. 研究の目的

本研究では、より病巣と密接に関係する膵液中から膵癌特異的なエクソソーム中 microRNA を探索・同定し、画像検査では認識できない前癌病変や早期膵癌を、既知の腫瘍マーカーや細胞診よりも優れた感度・特異度をもって診断することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)膵液中エクソソームの存在を確認する

：膵癌および非膵癌患者膵液からエクソソームを抽出した後、エクソソームからタンパクを抽出し、Western blot 法でエクソソーム特異的タンパクを同定する。次に、Nanoparticle Tracking Analysis および透過型電子顕微鏡観察を行い、膵癌および非膵癌患者膵液由来エクソソームの特徴を解析する。

### (2)膵癌細胞特異的 microRNA を同定する

：マイクロアレイデータから独自の手法を用いて、膵癌細胞特異的 microRNA を同定する。さらに、マイクロアレイの結果と整合性の取れた microRNA を判別するために、validation PCR を進め、さらに有望な microRNA を選別する。

### (3)感度・特異度・正診率を検証する

：絞り込まれた膵癌細胞特異的 microRNA の感度・特異度・正診率を検証する。

### (4)血清診断への応用

：絞り込まれた膵癌細胞特異的 microRNA が、血清診断が可能かどうかリアルタイム PCR を用いて、評価する。

## 4. 研究成果

膵癌患者および非膵癌患者膵液からエクソソームが抽出できていることは、CD63, CD9, CD81, HSP70 といったエクソソーム特異的蛋白をモニタリングすることにより確かめられた。さらに、エクソソームの存在は、Nanoparticle Tracking Analysis および透過型電子顕微鏡観察でも確かめられた。

我々は独自の手法を用いて、二つの膵液中エクソソーム由来膵癌特異的 microRNA の同定に成功した。その後、膵癌患者膵液 15 例、慢性膵炎患者膵液 11 例を用いて検証したところ、既存の腫瘍マーカーや膵液細胞診よりも高い感度・特異度・正診率を示した。さらに、膵液細胞診に、この二つの microRNA を上乗せすることによって、より膵癌診断のバイオマーカーとして有用であることが示された。また、血清診断への応用に関する少数例での検討では、有望な結果が得られ、さらに、膵癌根治切除後の血清においてエクソソーム中 microRNA の発現が低下していることから、治療効果モニタリングとしての有用性も示唆された。

現在、これらエクソソーム中 microRNA の機能解析を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阪上尊彦
2. 発表標題 膵液由来エクソソーム中microRNAを基盤とした血清学的膵癌診断法の確立
3. 学会等名 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiko Sakaue
2. 発表標題 Pancreatic juice biomarker for detection of early stage pancreatic cancer using tumor-specific exosomal microRNAs
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用	発明者 阪上尊彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-122124	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------