

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14396

研究課題名(和文)膵がん細胞から分泌されたエクソソーム由来RNAを用いた新規診断マーカーの開発

研究課題名(英文) Pancreatic cancer diagnostic markers of exosome RNAs secreted from pancreatic cancer cells for clinical application

研究代表者

谷内 恵介 (TANIUCHI, Keisuke)

高知大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50626869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良の癌の代表である膵癌は早期発見が困難であり、有用な診断マーカーの開発が望まれている。膵癌細胞の葉状仮足に集積する細胞浸潤・転移に関わる19種類のメッセンジャーRNA(mRNA)を同定した。これらのmRNAが膵癌細胞株から培養液中に排出されるかをreal-time RT-PCR法を用いて検討した結果、9種類のmRNAは培養液中に存在していた。本研究では、膵癌症例の血清を用いて9種類のmRNAをreal-time RT-PCR法により定量検出し、核酸診断マーカーとして用いることのできるmRNAを同定する。また、9種類のmRNAが膵癌細胞から細胞外へ排出される詳細な機序を解析する。

研究成果の概要(英文)：In vitro experiments suggest that nine mRNAs were concentrated in intracellular exosomes in pancreatic cancer cells, and that these exosome-localized mRNAs were secreted from pancreatic cancer cells. A case-control study that included 20 patients with treatment-naive pancreatic cancer and 30 control individuals without pancreatic diseases was carried out. The nine mRNAs were measured from the purified serum exosomes in this cohort by real-time quantitative RT-PCR. The area under the receiver-operating characteristic curve (AUC) was as same as that of CA19-9 that is the clinical standard tumor biomarker for patients with pancreatic cancer. If some of these mRNAs were combined with CA19-9, the AUC was significantly higher compared with that for CA19-9 alone. Increased expression of serum exosome-localized mRNAs appears highly accurate in diagnosing pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腫瘍診断学 腫瘍マーカー 膵癌核酸腫瘍マーカー

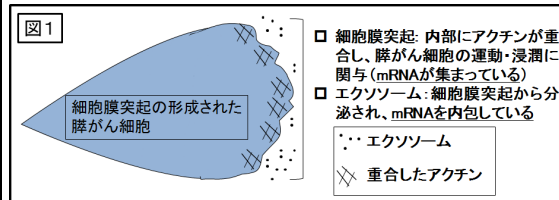
1. 研究開始当初の背景

膵癌により年間3万9000人が死亡しており、日本人の癌による死因の全体で肺、胃、大腸に次いで第4位である。年間の罹患者数と死亡者数が悪性腫瘍の中で最も近接しており、予後不良の癌の代表である。膵癌は早期発見が困難であり、有用な診断マーカーの開発が望まれている。我々は、膵癌細胞の増殖に関わっているカイネシンモーター蛋白質の1つであるKIF20Aが、RNA結合蛋白質IGF2BP3と結合したメッセンジャーRNA (mRNA) の複合体を内包したRNA顆粒を細胞膜突起(葉状仮足)まで輸送することにより、膵癌細胞を浸潤・転移させていることを明らかにした。また、脂質二重膜の中に、蛋白質や核酸分子を内包しているエクソソームが注目されており、特に、癌細胞における役割が近年急速に解明されている。我々は、膵癌細胞において葉状仮足まで輸送されたmRNAの一部がエクソソームに内包されることにより細胞外に放出されていることを明らかにした。本研究では、膵癌症例の血清を用いてこれらのRNAをreal-time RT-PCR法により定量検出し、核酸診断マーカーとして用いることのできるRNAを同定する。また、RNAが膵癌細胞から細胞外へ排出される詳細な機序を解析する。

2. 研究の目的

申請者は、膵癌細胞において細胞浸潤に必須部位である葉状仮足に集積したmRNAが、同部位において局所翻訳されることにより膵癌細胞の浸潤・転移を亢進させる新しい膵癌細胞浸潤・転移機序を発見した(Cancer Res 71:895-905, 2011; Oncotarget 5: 6832-45, 2014)。これらの機能を有する19種類のmRNAを次世代シーケンサーにより同定した。19種類のうち9種類のmRNAは、葉状仮足の形成された膵癌細胞株から培養液中に放出されていることを明らかにし、新規診断マーカー同定に向けて基盤となる実験結果を得た。さらに、これらの9種類のmRNAは、エクソソームに内包された状態で膵癌細胞の培養液中に存在していることを最近明らかにした(図1)。膜小胞であるエクソソームは細胞内から細胞外へと開口分泌され、RNA結合蛋白質やmRNAを含有している。研究代表者は、ヒト膵癌組織内の先進部に集簇している浸潤・転移能の高い葉状仮足を有する膵癌細胞からエクソソームに内包された9種類のmRNAが腫瘍組織の間質に放出され、腫瘍内血管に侵入している仮説をたてた。本研究では、膵癌症例の血清中に存在しているエクソソーム内のmRNAを精製し、9種類のmRNAが検出されるかを検討するために、リアルタイムRT-PCR法を用いた定量測定を行う。臨床で用いられている膵癌診断マーカーとして最も特異性の高い異常糖鎖であるCA19-9と検出感度と特異性を比較することにより、本研究では核酸診断マーカーとして用いることのできるmRNAを同定する。

できるmRNAを同定する。血清から迅速かつ高感度にmRNAを検出するリアルタイムRT-PCR法を確立し、臨床データを集積するための体制を整える予定である。



3. 研究の方法

高い感度と特異性、解析が安価で汎用的であることが臨床的に有用である診断マーカーの条件である。膵癌を診断するための特異性が高い診断マーカーは異常糖鎖であるCA19-9以外にはない。しかし、早期膵癌の診断にはCA19-9は感度が低く有用性はない。したがって、膵癌を感度よく特異的に診断することのできる新たな診断マーカーの同定とその詳細な生化学的解析が必須である。症例登録予定である膵癌60症例(早期膵癌20例、進行膵癌40例)においてCA19-9の測定を同時に行い、申請者が抽出した9種類のmRNAのリアルタイムRT-PCRによる検出率と比較する。CA19-9よりも高い感度と特異性を示したmRNAを選定することを目標とする。また、膵癌細胞に形成された葉状仮足部からmRNAが排出される機序の詳細な解析を行い、血清mRNA測定の臨床価値を証明するための学術的な基盤データを得る。

4. 研究成果

研究代表者の同定した膵癌細胞から放出される9種類のエクソソームRNAが膵癌診断マーカーになり得るかを検討するために、膵癌20症例の血清を用いてリアルタイムRT-PCR法により定量検出を行った(Case control study)。コントロールとして、慢性膵炎10症例、および膵疾患を認めない疾患群30症例の合計40症例の血清を用いた。すべての症例とコントロール群においてCA19-9測定を同時に行い、RNAのリアルタイムRT-PCRによる検出率と慢性膵炎の疑陽性率を比較した。その結果、同定したRNAは、CA19-9同等の膵癌診断能を有していた(論文投稿準備中)。慢性膵炎の血清においては、CA19-9とは異なり有意の上昇を認めず、9種類のエクソソームRNAは膵癌に対する新規核酸診断マーカーとなり得る可能性が示唆された。重要な点として、複数のエクソソームRNAとCA19-9を組み合わせることにより、CA19-9単独に比較して有意に膵癌の診断能が勝っていた。現在、検証目的の臨床試験を実施中であり、複数のマーカーRNAの組合せ診断について検証する予定である(UMIN21938)。エクソソームは分泌小胞体であり、内部にRNA結合蛋白質やmRNAを含む。膵癌細胞から放出されたエクソソーム由来のRNAが膵癌症例

の血清において特異的に上昇し、かつ慢性膵炎では有意な上昇をしないことが示された。膵臓の慢性炎症は膵癌診断の感度・特異度を低下させる大きなファクターであるが、膵癌細胞のみから放出されるエクソソーム RNA に着目することにより、この問題を解決できることが示唆された。また、今後は膵癌の診断においては、複数のエクソソーム RNA を組み合わせることで膵癌を診断する方法を同定し、膵癌の予後改善に貢献していきたい。

(引用文献)

1. Taniuchi K, Nishimori I, Hollingsworth MA. Intracellular CD24 inhibits cell invasion by posttranscriptional regulation of BART through interaction with G3BP. *Cancer Res* 71:895-905, 2011.

2. Taniuchi K, Furihata M, Hanazaki K, Saito M, Saibara T. IGF2BP3-mediated translation in cell protrusions promotes cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer. *Oncotarget* 5:6832-45, 2014.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Kimura M, Watanabe R, Mizuta H, Okamoto N, Kohsaki T, Dabanaka K, Hanazaki K, Saibara T: Elevated expression of SCGB1D2 predicts unfavorable prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pancreas* 18:216, 2017. 査読あり. ISSN 1590-8577.

2. 谷内恵介: 血中エクソソームによる膵癌診断. *月刊細胞*, 49:43-46, 2017. 査読なし.

3. Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Dabanaka K, Hanazaki K, Saibara T: PODXL, linked to poor prognosis of pancreatic cancers, promotes cell invasion by binding to gelsolin. *Cancer Science* 107:1430-42, 2016. 査読あり. doi: 10.1111/cas.13018.

4. Tsuboi M, Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Kimura M, Watanabe R, Shimizu T, Saito M, Dabanaka K, Hanazaki K, Saibara T: Vav3 is linked to poor prognosis of pancreatic cancers and promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Pancreatology* 16:905-16, 2016. 査読あり. doi: 10.1016/j.pan.2016.07.002.

5. Tanouchi A, Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Dabanaka K, Kimura M, Watanabe R, Kohsaki T, Shimizu T, Saito M, Hanazaki K, Saibara T: CCDC88A, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 35:190, 2016. 査読あり. doi:10.1186/S13046-016-0466-0

6. Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M: Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in (\pm)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. *Neuropharmacology* 95: 278-89, 2015. 査読あり. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.03.034.

7. Yawata T, Higashi Y, Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Saito M: Brain opioid and nociceptin receptors are involved in regulation of bombesin-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in the rat. *Mol Cell Biochem* 411: 201-11, 2015. 査読あり. doi: 10.1007/s11010-015-2582-0.

8. Taniuchi K, Furihata M, Hanazaki K, Iwasaki S, Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Saibara T: Prdx1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity. *Pancreas* 44: 331-40, 2015. 査読あり. doi: 10.1097/MPA.0000000000000270.

9. 谷内恵介: KIF20A と結合する RNA 結合蛋白質由来ペプチドワクチンの新規膵癌治療への応用. *癌治療のあゆみ* 34:34-39, 2015. 査読なし.

10. 谷内恵介: 膵癌細胞における mRNA 輸送システム. *胆と膵* 36:1161-1168, 2015. 査読なし.

11. 谷内恵介、岩崎信二: 低分子量 G 蛋白質が膵癌細胞の浸潤・転移に関わる機序. *BIO Clinica* 4:148-153, 2015. 査読なし.

[学会発表](計 9 件)

シンポジウム

1. Taniuchi K, Okabayashi T, Shima Y, Saibara T: A novel serological marker for pancreatic cancer. The 43rd International Society of Oncology and Biomarkers (ISOBM) Annual Congress. Chicago USA, 2016. 9.1

~6.

2. 谷内恵介：血清中の膵癌細胞エクソソーム由来 mRNA を用いた膵癌新規診断法の確立に向けて. 第 46 回 日本膵臓学会大会. 2015. 6.19 ~ 20. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

ワークショップ

3. 谷内恵介, 西原利治：膵癌患者血清を用いたエクソソーム mRNA の膵癌新規診断法の確立に向けた検討. 第 102 回日本消化器病学会総会. 2016. 4.21 ~ 23. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

一般演題

4. Taniuchi K, Okabayashi T, Shima Y, Saibara T: Circulating tumor-associated RNAs as novel serological markers for pancreatic cancer: a case-control clinical study. Asian Pacific Digestive Week 2016. 2016. 11.2 ~ 5 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

5. Taniuchi K, Okabayashi T, Shima Y, Saibara T: A glycoprotein as a novel serological marker for pancreatic cancer. United European Gastroenterology Week. Vienna, Austria, 2016. 10.15 ~ 19.

6. Taniuchi K: A tumor-associated mRNA localizing in circulating exosomes as a novel serological marker for pancreatic cancer: the retrospective clinical study. American Association for Cancer Research, New Orleans USA, 2016. 4.16 ~ 20.

7. Taniuchi K: Two RNAs localizing in circulating exosomes as a novel serological marker for pancreatic cancer. 10th American Association for Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. Maui USA, 2016. 2.16 ~ 20.

8. Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Saibara T: BCL7B enhances cell motility and invasion of pancreatic cancer cells. Asian Pacific Digestive Week 2015. Taipei, Taiwan, 2015.12.3 ~ 6.

9. 田内亜紀, 降幡睦夫, 谷内恵介: 葉状仮足に集積した BCL7B は膵癌細胞の運動・浸潤を亢進させる. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015. 10.8 ~ 10. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

1. 名称：膵がん及び膵管内乳頭粘液性腫瘍のマーカー

発明者：谷内 恵介

出願人：高知大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/084537

出願年月日：平成 28 年 11 月 22 日

国内外の別：国際出願手続き中

2. 名称：膵がん診断マーカー

発明者：谷内 恵介

出願人：高知大学

種類：特許

番号：2015-100534

出願年月日：平成 28 年 5 月 15 日

国内外の別：国内

3. 名称：膵がん細胞浸潤転移阻害剤

発明者：谷内 恵介

出願人：高知大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/69013

出願年月日：平成 27 年 7 月 1 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内 恵介 (TANIUCHI, Keisuke)

高知大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：50626869

(2) 研究協力者

坪井 麻記子 (TSUBOI, Makiko)

岩崎 信二 (IWASAKI, Shinji)

岡林 雄大 (OKABAYASHI, Takehiro)

志摩 泰生 (SHIMA, Yasuo)