

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19305

研究課題名(和文)エクソソーム内マイクロRNAおよびRNA結合蛋白を介した癌進展メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of cancer evolution mechanism via exosomal microRNA and RNA binding protein

研究代表者

後藤 拓磨(GOTO, Takuma)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50646007

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)：本検討では、膵腫瘍におけるExosome microRNA (ExmiR)とRNA結合蛋白の意義を検討した。

次世代シーケンサーを用い膵癌・IPMNの血清で過剰発現するExmiRを同定した。またIPMNの悪性度、膵癌の予後や治療効果と相関するExmiRを同定した。ExmiRとExosome外のmicroRNAおよび既存の腫瘍マーカーを比較し、ExmiRはIPMNや早期がんの診断において優れていることを明らかにした。複数のRNA結合蛋白をKnock downすることで膵癌の増殖を抑制するRNA結合蛋白を同定し、それにより細胞中microRNAおよびExmiRが変化することを確認した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the significance of Exosomal microRNA (ExmiR) and RNA binding protein in pancreatic neoplasm. We investigated by next generation sequencer, and ExmiRs of serum were overexpressed in pancreatic cancer (PC) and intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN). ExmiRs were correlated with the prognosis and therapeutic effect of PC and malignant potential of IPMN. We compared the ExmiRs with microRNA outside exosome and existing tumor markers, and confirmed that ExmiRs were superior in the diagnosis of IPMN and early stage of PC. By knocking down multiple RNA binding proteins, we identified RNA binding proteins that suppress pancreatic cancer proliferation, thereby confirmed that influenced to cell microRNA and ExmiR. These results indicated that ExmiRs and RNA binding protein are mutually related to the progression of pancreatic neoplasm.

研究分野：消化器癌

キーワード：microRNA 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

ゲノム中には miR のように蛋白質へ翻訳されない Non-coding RNA が数多く存在し、RNA 干渉により生体の遺伝子発現を制御していることが報告されている。これまでの miR の発現と腫瘍性病変の関連を対象とした研究により、癌の発生や進展の過程で miR の遺伝子変異や異常メチル化、miR の転写後修飾の異常が深く関係していることが明らかにされた。消化器癌において miR の発現が亢進していることや、これらの発現異常が癌の進行度や予後、抗癌剤耐性とかかわっていることが報告されている。また、癌組織において RNA 結合蛋白の発現パターンの変化が認められ、細胞増殖の亢進や細胞死の抑制など癌促進的に働いていることや、RNA 結合蛋白の発現パターンは癌発生臓器や進行度によって違いがあることが明らかにされた。

当科ではこれまでに miR や RNA 結合蛋白の発現異常と消化器癌や炎症性疾患との関連に着目し、miR が RNA 結合蛋白と直接結合し、オートファジー経路を介して大腸癌細胞にアポトーシスを誘導することや、miR が腸管内で NF- $\kappa$ B の活性化および腸管バリア機能の亢進を介してマウス腸管炎症を改善することを明らかにしてきた。

近年、癌細胞で過剰発現した miR が血液や体液中に分泌されること、また、これらの発現異常や異常メチル化が癌の予後と関連することから、血清 miR の発現異常を検出することは有用な癌の診断・予後予測マーカーになる可能性が示唆された。しかし、血液中に存在する RNA 分解酵素によって血清中 miR が分解されるためその定量は困難であり、臨床応用に至っていない。一方で、血液中を循環する miR が exosome と呼ばれる小胞の中に包埋され血液中でも安定して存在することが報告され、血清中 miR が分解をされことなく定量できる可能性が示された。また、この exosome は癌の転移への関与が推察され、遠隔臓器における癌由来 miR の移入には RNA 結合蛋白の共存が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 癌患者における exosome 中 miR および RNA 結合蛋白の発現異常と臨床所見や予後との関係を明らかにする。
- (2) 癌由来 exosome による標的細胞の miR および RNA 結合蛋白の発現および細胞態度の変化を明らかにする。
- (3) Exosome の体内分布および転移形成への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍および癌患者、健常人の血清から Exoquick による免疫沈降にて exosome を回収する。Exosome 中 miR の発現パターン変化を次世代シーケンサーによる網羅的解析にて抽出し、RT-PCR にて明らかにする。Exosome 中の RNA 結合蛋白の変化を Western Blot 法、

ELISA にて明らかにする。明らかにした Exosome 中の RNA 結合蛋白および miR の発現パターンの変化と臨床所見との関連を明らかにする。

(2) (1)より同定した RNA 結合蛋白や miR の発現抑制および過剰発現細胞と exosome を作成する。標的細胞の miR および RNA 結合蛋白の発現および細胞態度の変化を明らかにする。

(3) ノドマウスに exosome の表面マーカーである CD63 を GFP で標識した癌細胞株を移植し、癌細胞由来 exosome の分布を明らかにする。また 1. で検出した miR および RNA 結合蛋白を過剰発現させた Exosome を投与し、転移形成への影響を明らかにする。

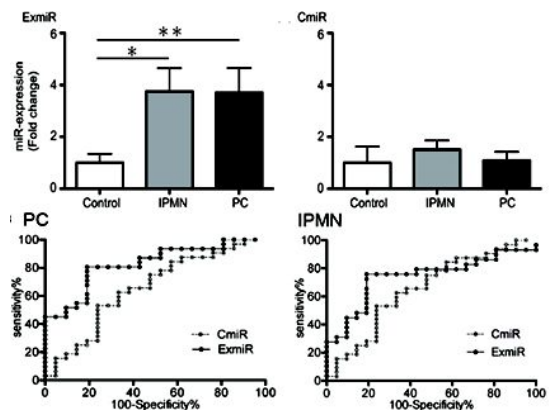
4. 研究成果

(1)

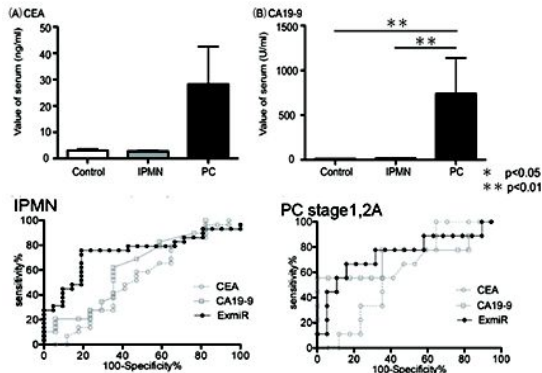
健常人、IPMN・膵癌患者の血清中 Exosome を回収し、次世代シーケンサーを用いて、Exosome 中の miR (ExmiR) を網羅的に解析した。

Candidate ExmiR	P value
miR-191	0.0036
miR-21	0.0417
miR-451a	0.0477

3群間で有意差を認めた3つの miR を RT-PCR にて発現量変化を確認した。いずれの ExmiR も健常人と比較し腫瘍性病変で発現量が高いことを明らかにした。Exosome 外の miR (CmiR) は健常人・IPMN・膵癌の間で明らかな差を認めなかった。ROC 曲線を用いた IPMN・膵癌の診断能においても ExmiR は CmiR より優れていることを明らかにした。

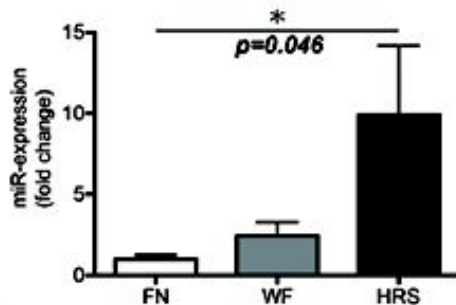


3つのExmiRと既存の腫瘍マーカーをROC曲線にて比較し、IPMNや早期の膵癌にてExmiRの診断能が優れていることを確認した。

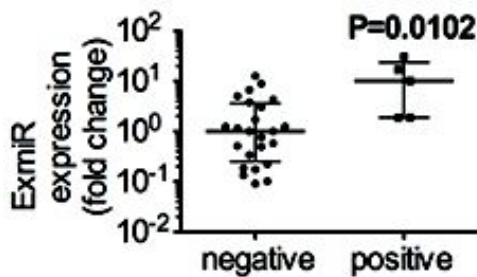


IPMN群において、癌進展のリスク因子を解析し、結節状隆起を伴う症例、High risk stigmataがある症例において、ExmiRの発現が高くなることを明らかにした。

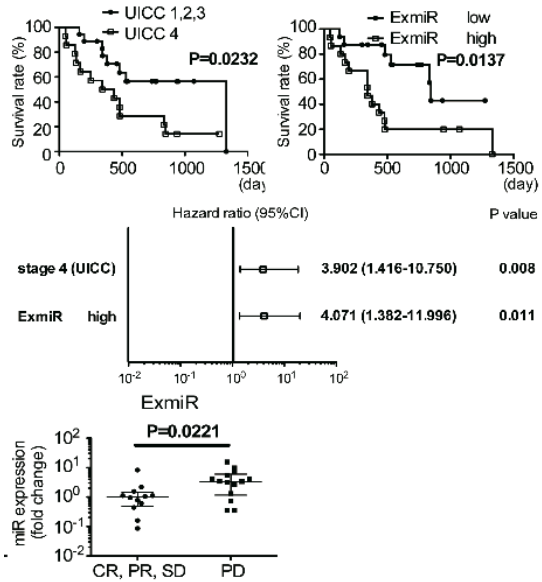
### ExmiR expression of Fukuoka criteria



### Mural nodule



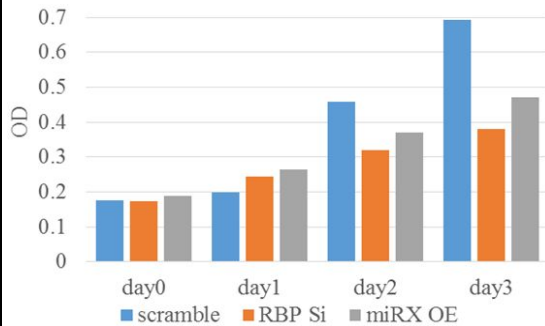
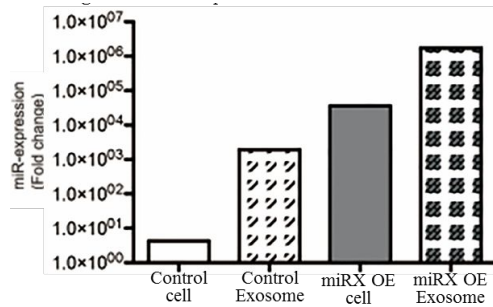
膵癌症例においてKaplan meierで有意となったUICC Stage4とExmiRをCox-hazard modelにて多変量解析を行ったところ、いずれも有意な予後因子となった。また、ExmiRの発現が高い症例において、Progression diseaseが多いことを明らかにした。



Exosome中RNA結合蛋白(RBP)については、血清を用いたWestan blot法では結果にばらつきがあり、ELISA法などで今後再解析とした。

(2)

(1)で明らかとしたExmiRのうち、腫瘍抑制miRを過剰発現することで、膵癌細胞の増殖が抑制されることを確認した。



また複数のRBPをsiRNAにて発現抑制したところ、RBP Aを抑制することで膵癌細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。

siRNA の効果を RT-PCR にて確認し、RBP A は細胞内で発現抑制、Exosome 中で発現が亢進する傾向を示した。

さらに RBP A の抑制により、(1) で明らかとした腫瘍関連 miR が細胞内で発現低下または上昇し、Exosome 中でも発現低下または上昇すること、を確認した。

ExmiR および RBP が腫瘍の増殖に相互に関連している結果であり、他の assay にて関連性の解明を試みている。

(3)

Exosome の表面マーカーである CD63 を GFP で標識した膵癌細胞株を作成した。

膵癌高転移株を脾臓移植することで、肝転移が形成されることを確認した。

GFP の分布は癌細胞以外にも認められたことから、評価は困難であり、標識の変更を試みている。

#### <引用文献>

Lau NC, An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 858-62.

Takahashi Y, Up-regulation of NEK2 by microRNA-128 methylation is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2013, 205-12.

Osada H, MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2007, 2-12.

Ng EK, Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 2009, 1375-81.

Yan-Let Ma, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is identified as a potential biomarker for colorectal cancer based on differential proteomics technology, *Journal of Proteome Research*, 2009, 4525-35.

Fujiya M, microRNA-18a induced apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, *Oncogene*, 2014, 4847-56.

Nata T, MicroRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating nuclear factor- $\kappa$ B and improving epithelial barrier function, *J Gene Med*, 2013, 249-60.

Kosaka N, Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs, *J Biol Chem*, 2012,

1397-405.

#### 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13件)

Fujiya M, Sato H, Ueno N, Sakatani A, Tanaka K, Dokoshi T, Fujibayashi S, Nomura Y, Kashima S, Gotoh T, Sasajima J, Moriichi K, Watari J, Kohgo Y. Efficacy and adverse events of cold vs hot polypectomy: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2016;22(23):5436-5444

Fujibayashi S, Sasajima J, Goto T, Tanaka H, Kawabata H, Fujii T, Nakamura K, Chiba A, Yanagawa N, Moriichi K, Fujiya M, Kohgo Y. A high-throughput sequence analysis of Japanese patients revealed 11 candidate genes associated with type 1 autoimmune pancreatitis susceptibility. *Biochemical And Biophysical Reports*. 2016 July;6:76-81.

Sasajima J, Uehara J, Goto T, Fujibayashi S, Koizumi K, Mizukami Y et al. Pancreatic metastasis of angiosarcoma (Stewart-Treves syndrome) diagnosed using endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Aug;95(33):e4316.

Goto T, Sasajima J, Koizumi K et al. Primary Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinoma of the Extrahepatic Bile Duct. *Intern Med*. 2016;55(12):1581-4.

Iwama T, Sakatani A, Fujiya M, Tanaka K, Fujibayashi S, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Gotoh T, Sasajima J, Moriichi K, Ikuta K. *Gut Pathog*. 2016; 8:2. doi:10.1186/s13099-016-0086-4.

後藤拓磨, 齋藤博哉, 柳川伸幸, 藤永明裕, 斎藤義徳. 切除不能胆嚢癌における動注化学放射線療法(AI+RT)の検討. *胆道*. 2015.

Utsumi T, Sasajima J, Goto T, Fujibayashi S, Dokoshi T, Sakatani A, Tanaka K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Inaba Y, Inamura J, Shindo M, Moriichi K, Fujiya M, Kohgo Y. The Detection of Pancreatic and Retroperitoneal Plasmacytoma Helped to Diagnose Multiple Myeloma: A Case Report. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jul;94(27):e914.

Moriichi K, Fujiya M, Ijiri M, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Fujibayashi S, Ando K, Nomura Y, Ueno, Kashima S, Gotoh T, Sasajima J, Inaba Y et al. Quantification of autofluorescence imaging can accurately and objectively assess the severity of ulcerative colitis. Int J Colorectal Dis. Dokoshi T, Fujiya M, Tanaka K, Sakatani A, Inaba Y, Ueno N, Kashima S, Goto T, Sasajima J, Tominaga M et al. A randomized study on the effectiveness of prophylactic clipping during endoscopic resection of colon polyps for the prevention of delayed bleeding. Biomed Res Int. 2015;2015:490272

Shugo Fujibayashi, Takuma Goto, Junpei Sasajima, Tatsuya Utsumi, Tatsuya Dokoshi, Aki Sakatani, Kazuyuki Tanaka, Yoshiki Nomura, Nobuhiro Ueno, Shin Kashima, Yuhei Inaba, Kentaro Moriichi, Mikihiro Fujiya, Yutaka Kohgo. Intraductal cholangioscopic visualization of moving fasciola hepatica. Gastrointestinal endoscopy. Mikihiro Fujiya, Aki Sakatani, Tatsuya Dokoshi, Kazuyuki Tanaka, Katsuyoshi Ando, Nobuhiro Ueno, Takuma Gotoh, Shin Kashima, Motoya Tominaga, Yuhei Inaba, Takahiro Ito, Kentaro Moriichi, Hiroki Tanabe, Katsuya Ikuta, Takaaki Ohtake, Kinnichi Yokota, Jiro Watari, Yusuke Saitoh, Yutaka Kohgo. A bamboo-joint-like appearance is a characteristic finding in the upper GI of Crohn's disease patients. Endoscopy. 2014.

Hiroaki Konishi, Mikihiro Fujiya, Katsuyoshi Ando, Kazuyuki Tanaka, Aki Sakatani, Tatsuya Dokoshi, Yuhei Inaba, Shugo Fujibayashi, Takuma Goto, Shin Kashima, Nobuhiro Ueno, Junpei Sasajima, Takahiro Ito, Hiroki Tanaka, Katsuya Ikuta, Yutaka Kohgo. MicroRNA-18a Induces Apoptosis in Colon Cancer Cells via the Autophagosomal Degradation of hnRNP A1. Gastroenterology. 2014.

Aki Sakatani, Mikihiro Fujiya, Kazuyuki Tanaka, Tatsuya Dokoshi, Shugo Fujibayashi, Katsuyoshi Ando, Nobuhiro Ueno, Takuma Goto, Shin Kashima, Junpei Sasajima, Yuhei Inaba, Takahiro Ito, Kentaro Moriichi, Ryu Sato, Yutaka Kohgo. Usefulness of NBI for Differentiating Colon Neoplasms From Non-Neoplasms: Based on Results of Our Institutional Experience and a

Meta-Analysis of Comparative Studies. Gastrointestinal Endoscopy. 2014.

[学会発表](計14件)

Takuma Goto, Hiroaki Konishi, Junpei Sasajima, Mikihiro Fujiya. SERUM EXOSOMAL MICRORNA-191,-21,-451A ARE CONSIDERED TO BE EFFICIENT DIAGNOSTIC MARKER OF PANCREATIC NEOPLASM, Annual meeting of the American pancreatic association, 2016.10.29, Boston.

藤林周吾, 後藤拓磨, 佐藤裕基, 笹島順平, 高氏修平, 杉山雄哉, 岩間琢哉, 井尻学見, 坂谷 慧, 田中一之, 高橋慶太郎, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島 伸, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 奥村利勝. 超音波内視鏡下生検で診断し得た膵癌直腸転移の1例. 第119回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会, 2016.9.4, 札幌.

Sato H, Fujiya M, Ueno N, Iwama T, Utsumi T, Sakatani A, Tanaka K, Dokoshi T, Fujibayashi S, Nomura Y, Kashima S, Gotoh T, Sasajima J, Moriichi K, Watari J, Kohgo Y. Usefulness of cold polypectomy in comparison to hot polypectomy for the treatment of colon neoplasms: A meta-analysis of randomized controlled studies. DDW 2016 (ASGE), 2016.5.21, San Diego.

Moriichi K, Fujiya M, Iwama T, Sato H, Utsumi T, Ijiri M, Tanaka K, Sakatani A, Fujibayashi S, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Goto T, Sasajima J. Evaluation of disease activity in patients with UC by white light, magnifying and autofluorescence imaging. DDW 2016 (ASGE), 2016.5.21, San Diego.

Fujibayashi S, Sasajima J, Goto T, Tanaka H, Moriichi K, Fujiya M. A high-throughput sequence analysis of Japanese patients revealed 11 candidate genes associated with type. DDW 2016 (AGA), 2016.5.21, San Diego.

内海辰哉, 後藤拓磨, 藤林周吾, 笹島順平, 岩間琢也, 佐藤裕基, 井尻学見, 坂谷 慧, 田中一之, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島 伸, 盛一健太郎, 藤谷幹浩. 十二指腸ステント留置後に胆管へのSelf-expandable metallic stent (SEMS)複数本留置にて症状緩和し得た切除不能胆管癌の1例. 第111回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会, 2015.8.29, 札幌.

Sato H, Sakatani A, Fujiya M, Kashima S, Tanabe H, Dokoshi T, Tanaka K, Ueno N, Goto T, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Kohgo Y. A bamboo-like appearance is a characteristic finding of the upper GI

in patients with Crohn's disease. The 3rd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis. 2015.6.20, Beijing.

Moriichi K, Fujiya M, Utsumi T, Ijiri M, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Fujibayashi S, Nomura Y, Ueno N, Goto T, Kashima S, Sasajima J, Kohgo. Quantification of autofluorescence imaging is useful for objectively assessing the severity of ulcerative colitis. DDW 2015 (ASGE), 2015.5.17, Washington DC.

藤林周吾、笹島順平、後藤拓磨、唐崎秀則、小泉一也、盛一健太郎、藤谷幹浩、高後 裕。膵癌術後再発の発生様式の検討；長期経過観察における異時性膵癌の危険性。JDDW2014（第56回日本消化器病学会）,2014.10.25, 神戸。

藤林周吾、後藤拓磨、笹島順平、内海辰哉、坂谷 慧、田中一之、堂腰達矢、安藤勝祥、上野伸展、嘉島 伸、稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、藤谷幹浩、追 康仁、高後 裕。経口胆道鏡にて診断し得た胆管肝蛭症の1例。第109回日本消化器内視鏡学会北海道支部例会, 2014.9.7, 札幌。

Sakatani A, Fujiya M, Tanaka K, Dokoshi T, Fujibayashi S, Ando K, Ueno N, Goto T, Kashima S, Sasajima J, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Sato R, Kohgo Y. Usefulness of NBI for differentiating colon neoplasms from non-neoplasms: Based on results of our institutional experience and a meta-analysis of comparative studies. DDW 2014 (ASGE), 2014.5.6, Chicago.

Konishi H, Fujiya M, Ando K, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Inaba Y, Fujibayashi S, Goto T, Kashima S, Ueno N, Sasajima J, Ito T, Tanaka H, Ikuta K, Kohgo Y. MicroRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells through the autophagosomal degradation of hnRNP A1. DDW 2014 (AGA), 2014.5.6, Chicago.

安藤勝祥、坂谷慧、堂腰達矢、田中一之、藤林周吾、上野伸展、嘉島伸、後藤拓磨、笹島順平、稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、田邊裕貴、藤谷幹浩、高後裕。炎症性腸疾患における静脈血栓症の頻度・危険因子と発症リスクの階層化に関する検討。第100回日本消化器病学会総会, 2014.4.23, 東京。

藤林周吾、後藤拓磨、笹島順平、内海辰哉、坂谷 慧、田中一之、堂腰達矢、安藤勝祥、上野伸展、稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、藤谷幹浩、及川賢輔、三代川齊之、高後 裕。粘膜下腫瘍様の形態を呈した胆嚢腺癌の1例。第107回日本

消化器内視鏡学会北海道支部例会, 2014.3.1, 札幌。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 拓磨 (GOTO, Takuma)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50646007