

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19906

研究課題名(和文) 血漿中のmiRNAを指標とした新規膵癌リンパ節転移診断法の開発

研究課題名(英文) Novel diagnostic value of circulating miRNA in plasma of patients with lymph node metastasis in pancreatic cancer

研究代表者

森村 玲 (Morimura, Ryo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70448736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：当院で治療を行った膵癌患者100症例と80例の健常人血漿を用いて、網羅的アレイ解析によって非担癌患者群と比して膵癌群の血漿中で減少しているmicroRNAのうち、癌抑制遺伝子的microRNAを選出した。上記解析でmiR-107が選出された。リンパ節転移がある膵癌患者中のmiR-107レベルはリンパ節転移がない患者と比べ有意に発現低下を認めていた(p=0.038)。血漿中のマイクロRNA-107を測定することにより膵癌リンパ節転移の術前診断を行うことができる可能性があり、さらに予後予測のマーカーとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study explored decreased tumor suppressor microRNA (miRNA) plasma levels in pancreatic cancer patients to clarify their potential as novel biomarkers. We used the microRNA array-based approach to select candidates by comparing plasma levels between PCa patients and healthy volunteers. Six down-regulated miRNAs (miR-107, miR-126, miR-451, miR-145, miR-491-5p, and miR-146b-5p) were selected. Small- and large-scale analyses using samples from 100 PCa patients and 80 healthy volunteers revealed that miR-107 was the most down-regulated miRNA in PCa patients compared with healthy volunteers ( $P < 0.0001$ ; area under the receiver-operating characteristic curve, 0.851). A low miR-107 plasma level was significantly associated with advanced T stage, N stage, and liver metastasis and was an independent factor predicting poor prognosis in PCa patients ( $P = 0.0424$ ; hazard ratio, 2.95).

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 リンパ節転移 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

micro RNA(miRNA, miR)は約 20 塩基程度の短鎖 RNA であり、正常細胞において恒常性の維持などに重要な役割を果たすが、癌を含む多くの疾患においても、その発現異常が病態の形成に深く関わる事が知られてきた。癌においては、血中 miRNA もその病態や予後と関係する事が知られ、biomarker としての報告が散見される。申請者らは、膵癌組織における変化が報告されている miR-18a、miR-221 に着目し、膵癌患者の組織、術前・後の血漿中の両 miRNA 量を real-time RT-PCR 法で検討した。その結果、膵癌患者において血漿中の両 miRNA が、その存在診断や腫瘍動態のモニタリングに極めて有用であり、次世代バイオマーカーとなり得る事を示した (Morimura R et al, 2010, BJC, Kawaguchi T et al.2013, BJC)。血漿中 miR-18a は、健康者に比較して膵癌患者の術前血漿中で高く、また多くの膵癌患者で術後に有意な低下を示した。同様に血漿中 miR-221 でも術前膵癌患者で有意に高いことを報告している。一方、膵癌は全世界の死因第 4 位であり、今後さらに増加していくものと考えられている。しかし、外科的切除できても 5 年生存率は 20 から 30%であり、予後不良の癌である。手術のみでは根治が望めないため、現在では術前の化学療法、放射線療法を行うことで治療成績を向上させようと試みがある。特にすでにリンパ節転移を伴う膵癌に対しては術前加療の恩恵が高いと考えられる。しかしながら、膵癌術前のリンパ節転移の正診率は各種画像診断の modality を用いてもまだ低い。術前にリンパ節転移を正確に診断できることは、治療方針決定のためには重要な要因である。

## 2. 研究の目的

膵癌の術前補助療法が可能になりつつある今日、より正確にリンパ節転移を診断することの重要性が再認識されてきている。従来多くの研究では、膵癌の原発巣のみを対象として扱ってきたが、リンパ節転移のある膵癌は非常に予後が悪い事が知られており、その診断には画像診断のみでは限界

があると考えられる。このため、膵癌のリンパ節転移を指標として、その進展やリンパ節転移の早期診断に関わる miRNA を同定できれば、有用な血漿 biomarker となる事はもちろん、膵癌リンパ節転移のメカニズムを解明できる可能性も高まり、その意義は極めて大きいと考えられる。このように、本研究を通して miRNA を介した膵臓のリンパ節転移メカニズムを探索する事は、診断のみではなく治療への応用も十分に考えられる。

## 3. 研究の方法

### 1. miRNA マイクロアレイを用いたリンパ節転移がある膵癌患者とない患者の miRNA 解析

膵癌患者の手術時採取した術前血漿を用いて、miRNA microarray による解析を行う事で、リンパ節転移のない患者と比べリンパ節転移のある患者血漿内で増加または低下する miRNA を同定し、膵癌リンパ節転移の新たな biomarker 候補を抽出する。

### 2. 候補 miRNA の血漿中の miRNA の相関を解析

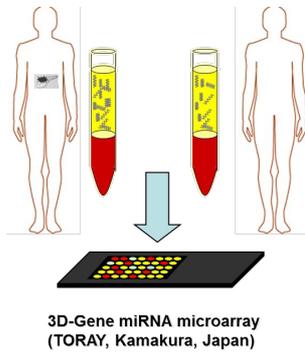
microarray 解析で候補として選出した miRNA に関して、血漿中において段階的に発現上昇あるいは低下している miRNA を明らかにする。

### 3. 膵癌患者血漿中の候補 miRNA の濃度とリンパ節転移の確認

実際の患者検体において、新たな biomarker の候補 miRNA 量を RT-PCR 法を用いて測定し、その有用性を評価する。実際の患者検体において、新たな biomarker の候補 miRNA 量を RT-PCR 法を用いて測定し、その有用性を評価する。具体的には手術を施行したリンパ節転移があった膵癌患者とリンパ節転移がなかった膵癌患者の血漿中の miRNA 量を比較し、候補 miRNA の臨床的な有用性を評価する。さらに、術前血漿内の候補 miRNA 発現量とリンパ節転移の相関を解析する

#### 4. 研究成果

当院で治療を行った膵癌患者 100 症例を用いた。また、対照として 80 例の健常人血漿を用いた。TORAY の 3D-GENE miRNA microarray TORAY による網羅的アレイ解析によって非担癌患者群と比して膵癌群の血漿中で減少している microRNA のうち、癌抑制遺伝子的 microRNA を選出した。Validation 解析は TaqMan assay を用いた。その結果、網羅的アレイ解析では、miR-451、126、145、146b-5p、491-5p、107 の 6 候補が選出され、更に TaqMan assay による test scale 解析で miR-107 が選出された。



Rank	Gene ID	Gene function	Signal intensity		Fold change PCa / Volunteer
			PCa	Volunteer	
● 1	hsa-miR-451	suppressive	235.38	1422.85	0.17
● 2	hsa-miR-126	suppressive	15.45	89.40	0.17
● 3	hsa-miR-145	suppressive	10.00	43.40	0.23
4	hsa-miR-19b	oncogenic	28.28	61.20	0.46
5	hsa-miR-1246	oncogenic	137.57	254.4	0.54
● 6	hsa-miR-146b-5p	suppressive	14.76	24.96	0.59
7	hsa-miR-380	unknown	12.40	20.95	0.59
8	hsa-miR-891a	unknown	15.11	25.25	0.6
9	hsa-miR-140-3p	unknown	13.82	21.08	0.66
10	hsa-miR-106a	oncogenic	17.43	25.93	0.67
11	hsa-miR-24	controversial	83.42	119.32	0.70
12	hsa-miR-1321	unknown	13.33	18.57	0.72
● 13	hsa-miR-491-5p	suppressive	17.40	24.14	0.72
14	hsa-miR-365*	unknown	12.69	17.39	0.73
● 15	hsa-miR-107	suppressive	37.97	50.37	0.75

リンパ節転移がある膵癌患者中の miR-107 レベルはリンパ節転移がない患者と比べ有意に発現低下を認めていた (p=0.038)。

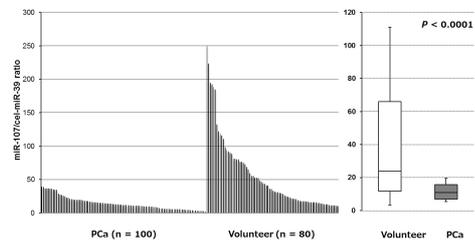
#### Association between plasma miR-107 levels and clinicopathological characteristics in PCa patients with pancreatectomy

	n	Plasma miR-107 concentration		Univariate* p-value
		High	Low	
Total	74	50	24	
Age				0.730
< 65	22	15 (30%)	7 (29%)	
> 65	52	35 (70%)	17 (71%)	
Sex				0.326
male	34	21 (42%)	13 (54%)	
female	40	29 (58%)	11 (46%)	
pT (TNM)				0.076
T1-2	10	8 (80%)	1 (4%)	
T3-4	64	41 (82%)	23 (86%)	
pN (TNM)				<b>0.038</b>
N0	31	25 (50%)	6 (25%)	
N1	43	25 (50%)	18 (75%)	
pM (TNM)				0.739
M0	70	47 (94%)	23 (96%)	
M1	4	3 (6%)	1 (4%)	

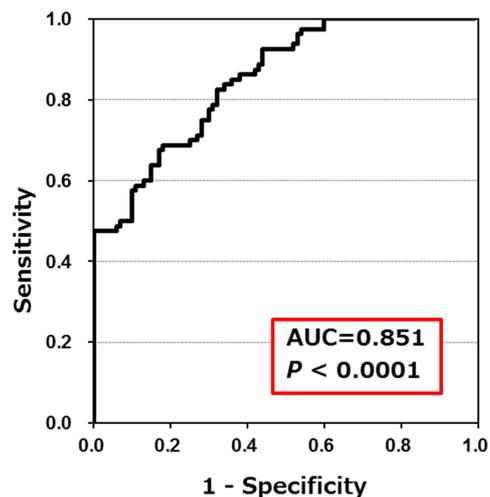
\*Chi-square test. NOTE: Significant values are in bold.

Validation 解析でも、miR-107 は健常人血漿比して有意な発現低下を認めた (p<0.0001)。

#### Comparison of plasma miR-107 level between PCa patients and healthy volunteers in large-scale analysis



ROC 曲線を用いた解析では AUC 値は 0.851 であった。



血漿中 miR-107 を測定することで、膵癌のリンパ節転移を予測することが可能である。

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1件)

Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids.

Taisuke Imamura†, Shuhei Komatsu,  
Daisuke Ichikawa, Tsutomu Kawaguchi,  
Mahito Miyamae, Wataru Okajima,  
Takuma Ohashi, Tomohiro Arita, Hirotaka  
Konishi, Atsushi Shiozaki, Ryo Morimura,  
Hisashi Ikoma, Kazuma Okamoto, Eigo  
Otsuji

World J Gastroenterol. 2016 Jul 7;22(25):5627-41.  
査読 有

〔学会発表〕(計2件)

今村 泰輔  
第28回肝胆膵外科学会定期学術集会  
2016年6月3日 大阪国際会議場  
Down-regulation of plasma tumor  
suppressive microRNA contributes to  
poor outcomes in pancreatic cancer

今村 泰輔  
第24回 JDDW  
2016年11月3日 神戸コンベンション  
センター  
膵癌における癌抑制型 microRNA を指標  
とした新規バイオマーカーの開発と治療  
応用の可能性の検討

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森村 玲 (Morimura, Ryo)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 70448736