

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10590

研究課題名(和文) 血中エクソソームを利用した膵癌タイプ別分類に基づくテーラーメード治療の確立

研究課題名(英文) Exploration of tailored treatment based on type classification of pancreatic cancer using exosome

研究代表者

山田 豪 (YAMADA, Suguru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：30467287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞株の培養上清から超遠心法によりエクソソームを抽出し、電子顕微鏡およびnano tracking analysis (NTA)で確認した。また、網羅的解析により膵癌を「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に分類可能なmiRNAのリストアップを行い、パブリックデータベース及び膵癌切除検体のRNAにより発現解析を行い、有力なmiRNAを候補としてピックアップした。最後に、膵腫瘍切除患者の血液検体からエクソソームを抽出し、アフィニティー法を用いmiRNAの解析を行い、ピックアップしたmiRNAの発現解析、臨床病理学的因子・予後との解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの膵癌をめぐる基礎研究では、本研究の最大の特徴である「血中癌細胞由来エクソソーム」をターゲットとした研究は皆無であり、その観点からは独創的である。また、消化器癌の中でも浸潤・転移能の極めて高い膵癌においては、「血中癌細胞由来エクソソーム」から術前診断法の確立をめざす本研究は極めて価値が高い。術前血液サンプルから難治性膵癌のタイプ別分類法が可能となれば、膵癌に対する至適集学的治療法を選択し、テーラーメード治療を確立できるため、治療成績の飛躍的な向上に寄与するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Exosomal micro RNAs(exo-miRNAs) could reflect the epithelial to mesenchymal transition(EMT) status of the original parental cell. This study aimed to identify exo-miRNAs related to EMT status of pancreatic cancer(PC). Comprehensive miRNA-expression profiles of exosomes in culture media of PC cell lines were analyzed through genome-wide microarray technology. Discovered miRNAs were analyzed to investigate their clinical implication with TCGA dataset, cell lines, and clinical samples. We prioritized 291 exo-miRNAs differentially expressed between epithelial type and mesenchymal type and selected the miRNAs. Next, the analysis of TCGA dataset revealed candidate miRNAs. In addition, quantitative PCR analysis indicated miRNAs as the EMT markers. Finally, we investigated the expression of miRNAs in serum. We have discovered novel exo-miRNAs associated with EMT status of PC. Our findings may be step on the way to establish less-invasive biomarkers to contribute personalized medicine for PC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 EMT 術前診断 miRNA

1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率はいまだに15%に満たなく、唯一根治が望める治療は外科的切除ではあるが、手術だけでは本疾患の根治や治療成績向上はもはや不可能である。つまり、集学的治療の確立が不可欠である。

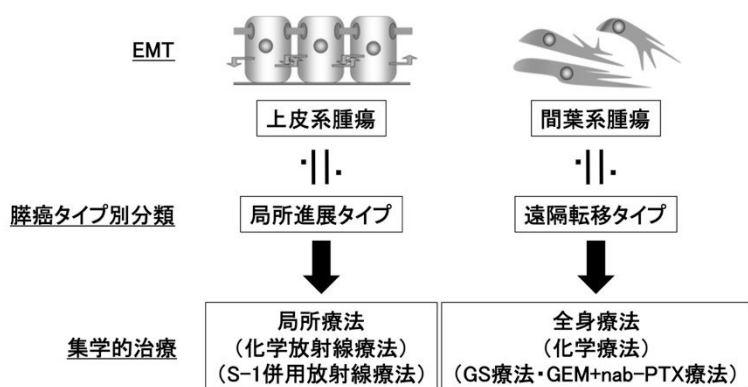
一方、膵癌は多様性に富み、切除後再発形式として局所再発だけで数年経過する症例もあれば、術後早期に肝転移をきたす症例もある。腹膜播種だけにとどまる症例もあれば、5年経過して肝転移が出現する症例もある。つまり、膵癌は「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に大きく二分される。従って、腫瘍の性質、患者個々に適したテーラーメイド治療の導入こそ、難治性膵癌の治療成績向上に不可欠である。

我々は「上皮間葉転換 (Epithelial to mesenchymal transition; EMT)」という現象に着目してきた。上皮系腫瘍はE-カドヘリン、間葉系腫瘍はビメンチンを優位に発現するが、これにより規定されるEMTは癌の浸潤・転移のメカニズムとして極めて重要である。我々は切除検体を活用し、臨床的意義を報告してきた。これらの研究成果より、消化器癌はEMT statusにより分類され、間葉系腫瘍は予後不良であることを見出した。つまり、EMTの発想こそが、膵癌を「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に分類可能な手段であり、集学的治療のテーラーメイド化に活用すべきだと着想した。

2. 研究の目的

膵癌の治療成績向上のためには、集学的治療が不可欠である。我々はこれまでに「上皮間葉転換 (EMT)」という現象が膵癌の浸潤・転移のメカニズムにおいて重要な鍵となっていることを報告してきた。また、過去の豊富な臨床経験より、膵癌は「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に大きく二分されると考えている。各々のタイプに応じた治療法の確立が求められることから、EMTを膵癌のタイプ別分類に利用することを着想した。これまでの研究は切除検体を活用し、特定遺伝子のRNAやタンパク発現レベルを解析したものであった。しかし、術前に腫瘍組織を採取することが一般的ではない膵癌においては、「血中癌細胞由来エクソソーム」を利用したリキッドバイオプシーにより術前診断を行うことが臨床応用への近道であると考えた。つまり、リキッドバイオプシーとして癌細胞由来エクソソーム内のタンパク、mRNAあるいはmiRNAの測定や解析を利用することとした。本研究では非侵襲的かつ理想的なリキッドバイオプシーにより膵癌の術前タイプ別分類法を確立し、集学的治療をテーラーメイド化し、治療成績を向上させることを目的としている。

膵癌におけるテーラーメイド治療の確立



3. 研究の方法

膵癌上皮系及び間葉系細胞株に高発現する「miRNA」の同定

膵癌細胞株、非腫瘍細胞株、線維芽細胞株の培養上清から超遠心法による分離技術を用いてエクソソームを抽出し、電子顕微鏡および NanoSight NS300 nanoparticle characterization system を用いた nano tracking analysis (NTA) で確認する。膵癌細胞株においては、これまでの研究成果から EMT に関する上皮系あるいは間葉系細胞のステータスが判明しているため (Yamada S, Fuchs BC. Surgery 2013) (次ページ図)、上皮系及び間葉系細胞株において特異的に高発現する miRNA を 3D-Gene® Human miRNA Oligo Chip ver.21 を用いた網羅的解析の後にリストアップし、中でも最も有力な候補となる miRNA を同定する。

パブリックデータベースの利用による絞り込み

先にリストアップした候補 miRNA をパブリックデータベースである The Cancer Genome Atlas

(TCGA)と照らし合わせ、さらに候補となる miRNA の絞り込みを行う。

膵癌切除検体を利用した検証

教室の膵癌切除検体から抽出した RNA により発現解析を行い、EMT を判定しうる有力な miRNA の候補をピックアップする。

膵腫瘍切除患者の血液検体による検証

教室の膵腫瘍切除患者の血液検体におけるエクソソームの抽出につき

MagCapture™ Exosome

Isolation Kit PS によるア

フィニティー法を用い、総

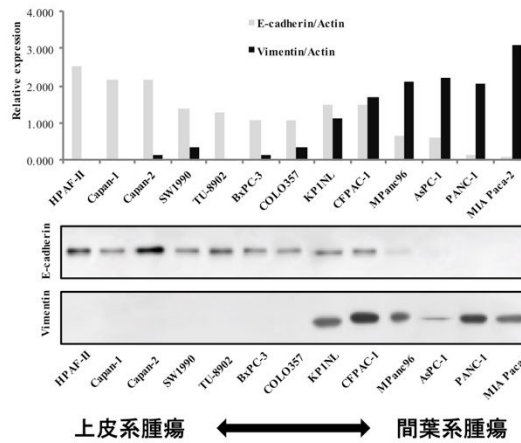
RNA を抽出して miRNA の解

析を行う。先の miRNA の発

現解析、臨床病理学的因

子・予後との解析を行う。

膵癌細胞株の”EMT status”



膵癌細胞株はE-cadherinとVimentinの発現により”EMT status”が決定される

4. 研究成果

EMT ステータスの判明している 4 種類の膵癌細胞株の培養上清を利用し、先に述べた超遠心法による分離技術を用いてエクソソームを抽出し、電子顕微鏡および nano tracking analysis (NTA) で確認した。血漿中にはマイクロ小胞やアポトーシス小体など、様々な粒径の物質が含まれているが、密度勾配法を用いた超遠心法により高純度なエクソソームの抽出が可能となった。

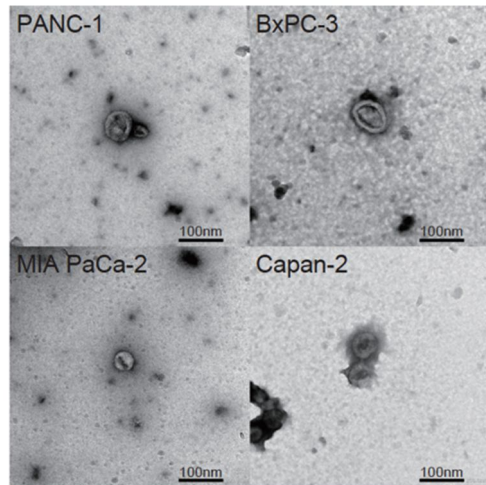
その後、2,565 種類の miRNA から網羅的解析を 3D-Gene® Human miRNA Oligo Chip ver.21 により行った。膵癌を EMT の見地から「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に分類することが可能な miRNA として、67 種類をピックアップすることができた。

次に、健常膵組織 22 例と膵癌組織 136 例を GSE24279 から比較検討し、193 例の miRNA が膵癌組織で高発現していることが分かった。以上の結果より、5 種類の miRNA をその後の実験系で使用することとした。

これらの miRNA の発現と生存成績の解析のため、パブリックデータベースとして The Cancer Genome Atlas (TCGA) を利用した。その結果、2 種類の miRNA が予後と相関していることが分かった。

さらに、7 種類の膵癌細胞株を用い、miRNA の発現状況を検証した。最終的には、膵腫瘍切除患者の血液検体として、IPMN、MCN 及び膵癌患者のエクソソームの抽出につきアフィニティー法を用い、総 RNA を抽出して miRNA の解析を行うことに成功した。ピックアップした miRNA の発現解析を調査したところ、膵癌患者において特異的に発現していることが示唆された。

以上の結果につき論文作成を行い、現在投稿中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

砂川祐輝, 山田 豪, 園原史訓, 林 真路, 高見秀樹, 神田光郎, 田中千恵, 小林大介, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高見 秀樹
ローマ字氏名：TAKAMI, Hideki
所属研究機関名：名古屋大学
部局名：医学部附属病院
職名：病院助教
研究者番号(8桁)：40723028

研究分担者氏名：末永 雅也
ローマ字氏名：SUENAGA, Masaya
所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)
部局名：その他部局等
職名：外科医師
研究者番号(8桁)：50801627

研究分担者氏名：藤井 努
ローマ字氏名：FUJII, Tsutomu
所属研究機関名：富山大学
部局名：大学院医学薬学研究部
職名：教授
研究者番号(8桁)：60566967

研究分担者氏名：小寺 泰弘
ローマ字氏名：KODERA, Yasuhiro
所属研究機関名：名古屋大学
部局名：医学系研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：10345879