

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10610

研究課題名(和文) 膵癌における血清エクソソーム由来miRNAのバイオマーカーとしての意義

研究課題名(英文) Usefulness of exosomal microRNA as a biomarker for pancreatic cancer

研究代表者

和田 慶太 (Wada, Keita)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：80349307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌におけるマイクロRNA(miRNA)のバイオマーカーとしての意義を検討するために、膵癌患者より採取した血液サンプルを用いmiRNAの発現を測定した。まず、miRNA arrayにより健康人との対比を行い、膵癌に特異性の高いmiRNAを抽出した。次に、膵癌切除例の手術前に採取した血液サンプルを用いてmiRNA-451a発現量と臨床病理学的因子を比較検討した結果、miR-451a 高発現群は低発現群と比較して有意に無再発生存期間、全生存期間の短縮を認めた。腫瘍還流血である門脈血サンプルでも同様の結果が得られたことより、膵癌においてmiRNAは再発予測因子、予後予測因子となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は難治性がんの一つであり、患者全体の5年生存率は欧米、日本で6-7%と推定されている。膵癌が予後不良であることの一因は有効な早期診断法がなく、ほぼ全例が診断された時点で進行癌であることがあげられる。膵癌治療成績の向上のためには早期診断も然ることながら、治療効果モニタリングに有用なバイオマーカーの開発が不可欠である。今回の検討でmiRNAが膵癌における有用なバイオマーカーである可能性が示されたことから、今後の研究により早期発見、危険群の選別、治療効果予測などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the significance of microRNA (miRNA) as a biomarker in pancreatic cancer, miRNA expression was measured using a blood sample collected from a pancreatic cancer patient. First, the miRNA array was performed and compared with healthy subjects to extract miRNAs highly specific to pancreatic cancer. Next, we compared the miRNA-451a expression level with clinicopathological factors using blood samples collected before surgery for patients with resected pancreatic cancer. As a result, the miR-451a high expression group was significantly higher than the low expression group. Recurrence-free survival and shortened overall survival were observed. Similar results were obtained in portal blood samples that were perfusion of tumor, suggesting that miRNA may be a predictor of recurrence and prognosis in pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

現在の癌治療の問題点のひとつとして有効なバイオマーカーの欠如があげられ、早期診断、個別化治療の実現ために有効なバイオマーカーの開発が望まれている。膵癌は難治性がんの一つであり、患者全体の5年生存率は欧米、日本で6-7%と推定されている。膵癌が予後不良であることの一因は有効な早期診断法がなく、ほぼ全例が診断された時点で進行癌であることがあげられる。膵癌治療成績の向上のためには早期診断も然ることながら、治療効果モニタリングに有用なバイオマーカーの開発が不可欠である。

miRNAは非翻訳領域の約20数塩基からなるRNAであり、遺伝子転写発現制御により発生・細胞増殖・分化・アポトーシス・代謝などの生命事象に広く関与していることが明らかとなってきた。miRNAは体内で組織、体液のエクソソームに極めて安定的な形で存在しており、オンコロジー分野では、miRNAが様々な癌腫において発癌および進展に関与していることが示され、新たなバイオマーカーとしての有用性が期待されている。

2. 研究の目的

- (1) 膵癌組織および同一患者末梢血を用いた miRNA 発現プロファイルの検討から、高感度 miRNA を同定し、臨床病理学的因子との対比を行いバイオマーカーとしての意義を検討する。
- (2) miRNA の薬剤治療効果予測の可能性について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 血液サンプルにおける miRNA 発現の検討
 - ・ 膵癌症例と健常人の血清（血漿）から超遠心またはフィルター(ExoMir)によりエクソソームを分離する。
 - ・ TotalRNA を抽出後、miRNA-PCR アレイを用いてその発現プロファイルを明らかにする。
 - ・ 健常人との比較から、膵癌に特性の高い miRNA を選択する。
- (2) 膵癌切除例における miRNA のバイオマーカーとしての意義の検討
 - ・ miRNA 発現量と臨床病理学的情報との相関を検討する。
- (3) 切除不能膵癌における miRNA の薬剤効果予測の検討
 - ・ 化学療法施行前の血液サンプルを用いて miRNA 発現量と臨床効果の相関を検討する。

4. 研究成果

- (1) 膵癌における miRNA の臨床的意義を検討するために、Target miRNA の探索する目的で miRNAarray を行った。膵癌術後無再発生存症例と健常人における miRNA 発現の比較を行い、miRNA-451a (miR-451a) が最も有意な miRNA として抽出された (Table1)。次に膵癌切除例 50 例の術中に採取した末梢血サンプルを用いて、miR-451a のバイオマーカーとしての有用性について検討した結果、miR-451a 高発現群は低発現群と比較して有意に無再発生存期間、全生存期間の短縮を認めた。病理組織学的因子との比較においては、腫瘍径および進行度との相関がみられた。上記結果より、血漿 miR-451a は、膵癌切除症例において再発予測因子、予後予測因子となる可能性について報告した[1]。

Table 1 Ten most highly upregulated exosomal miRNAs in the PDAC patients with recurrence based on the miRNA array

Ranks	miRNA	MirBase No.	Fold changes	
			Comparison with healthy volunteers ^a	Comparison with recurrence-free patients ^b
1	miR-451a	MIMAT0001631	4.18*	3.41*
2	miR-557	MIMAT0003221	3.02	2.82
3	miR-6721-5p	MIMAT0025852	3.98*	2.77
4	miR-4525	MIMAT0019064	3.25	2.53
5	miR-1307-3p	MIMAT0005951	3.91*	2.46
6	miR-1273a	MIMAT0018079	3.24	2.39
7	miR-4733-3p	MIMAT0019858	3.33*	2.25
8	miR125-3p	MIMAT0004602	3.20	2.17
9	miR4763-5p	MIMAT0019912	3.47*	2.16
10	miR-185-5p	MIMAT0000455	3.31*	2.11

^aMicroRNA levels of stage II PDAC patients with recurrent after surgery ($n = 3$) were compared with those of healthy volunteers ($n = 3$).

^bMicroRNA levels of stage II PDAC patients with recurrent after surgery ($n = 3$) were compared with those of recurrence-free stage II PDAC patients ($n = 3$).

* $P < 0.05$

(文献 1 より引用)

(2) さらに、腫瘍還流血である門脈血を用いた検討を行い、miR-451a, mi-4525, miR-21 は末梢血と比して高感度のバイオマーカーであることを示した (Table2)[2]。

Table 2 Sensitivity, specificity and accuracy of exosomal miR-4525, miR-451a and miR-21 separated from portal vein blood and peripheral blood

Sample of exosome	Portal vein blood			Peripheral blood		
	miR-4525	miR-451a	miR-21	miR-4525	miR-451a	miR-21
Sensitivity (%)	27/33 (81.8)	24/33 (72.7)	24/33 (72.7)	21/33 (63.6)	21/33 (63.6)	18/33 (54.5)
Specificity (%)	19/22 (86.4)	17/22 (77.3)	16/22 (72.7)	13/22 (59.1)	15/22 (68.2)	14/22 (63.6)
Accuracy (%)	46/55 (83.6)	41/55 (74.5)	40/55 (72.7)	34/55 (61.8)	36/55 (65.5)	32/55 (58.2)

(文献 2 より引用)

(3) 切除不能膵癌における miRNA の薬剤効果予測を行うために、miR-451a、miR-4525、miR-21 を用いた薬剤効果予測について検討したが、サンプルクオリティの問題、サンプル数不足もあり、結果的に知見を得るまでには至らなかった。

【参考文献】

1. Takahashi K, Iinuma H, Wada K, Minezaki S, Kawamura S, Kainuma M, et al. Usefulness of exosome-encapsulated microRNA-451a as a minimally invasive biomarker for prediction of recurrence and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2018;25:155-161.
2. Kawamura S, Iinuma H, Wada K, Takahashi K, Minezaki S, Kainuma M, et al. Exosome-encapsulated microRNA-4525, microRNA-451a and microRNA-21 in portal vein blood is a high-sensitive liquid biomarker for the selection of high-risk pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2019;26:63-72.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahasi Kunihiro, Iinuma Hisae, Wada Keita, Minezaki Shunryo, Kawamura Sachiyo, Kainuma Masahiko, Ikeda Yutaka, Shibuya Makoto, Miura Fumihiko, Sano Keiji	4. 巻 25
2. 論文標題 Usefulness of exosome-encapsulated microRNA-451a as a minimally invasive biomarker for prediction of recurrence and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 155 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Sachiyo, Iinuma Hisae, Wada Keita, Takahashi Kunihiro, Minezaki Shunryo, Kainuma Masahiko, Shibuya Makoto, Miura Fumihiko, Sano Keiji	4. 巻 26
2. 論文標題 Exosome encapsulated microRNA 4525, microRNA 451a and microRNA 21 in portal vein blood is a high sensitive liquid biomarker for the selection of high risk pancreatic ductal adenocarcinoma patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 63 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	飯沼 久恵 (Iinuma Hisae) (30147102)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	
研究分担者	佐野 圭二 (Sano Keiji) (00334392)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	三浦 文彦 (Miura Fumihiko) (00344995)	帝京大学・医学部・准教授 (32643)	