

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09450

研究課題名(和文) 膵癌患者血清中細胞外小胞EVにおける長鎖機能性RNAの発現、機能解析

研究課題名(英文) Analysis of EV encapsulated long non-coding RNA as the liquid biopsy for pancreatic cancer

研究代表者

高橋 賢治 (TAKAHASHI, KENJI)

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：00736332

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)：血清中細胞外小胞(EV)内に存在する長鎖機能性RNA(lncRNA)は、体液診断の新たなツールとして期待される。本研究では、膵癌患者血清EV中に高発現する新規lncRNA(LINC02280、lncRNA(A))を同定した。LINC02280は膵癌細胞における浸潤・遊走能を増強し、lncRNA(A)はアポトーシスの抑制に働くことが示唆された。また、2種類のlncRNAは健常者、膵管内乳頭粘液性腫瘍患者と比べ、膵癌患者血清EV中に有意に高発現した。これら血清EV中のlncRNAの組み合わせによって診断率の向上が期待され、膵癌早期発見に寄与する新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、膵癌患者血清EV中の新規lncRNAを同定した。現状では早期診断に有用な腫瘍マーカーのない膵癌において、これらのlncRNAは新たな体液診断ツールとして期待されるとともに、将来的に新規診断法の開発へと繋がる可能性がある。本研究結果は膵癌のみならず、他癌腫の診断や臨床応用という観点においても、非常に重要な新しい情報を提起できると考える。

研究成果の概要(英文)：Although extracellular vesicles (EVs) encapsulated non-coding RNAs (ncRNAs) are expected to be crucial tools for liquid biopsy, there are few reports regarding EV encapsulated long non-coding RNA (lncRNA). Here, we identified highly expressed lncRNAs (LINC02280, lncRNA (A)) in EVs derived from patients with pancreatic adenocarcinoma (PDAC). In vitro studies, LINC02280 could promote tumor cell invasion and migration through induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) pathway whereas lncRNA (A) could inhibit apoptosis in PDAC cells. In serum EVs, the expression levels of LINC02280 and lncRNA (A) were significantly elevated in PDAC patients compared to healthy individuals and intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) patients. A combination of EV lncRNAs showed good performance in predicting PDAC diagnosis and will find applications in liquid biopsies to determine human PDAC status.

研究分野：消化器内科学

キーワード：長鎖機能性RNA 体液診断 膵癌 細胞外小胞 上皮間葉形質転換

1. 研究開始当初の背景

膵癌は診断時既に局所浸潤、遠隔転移を伴う事が多いため早期診断が必須であり、予後改善のためには浸潤、転移の制御が望まれる。現在診断には CA19-9 等の腫瘍マーカーが用いられている。しかし、進行癌以外での陽性率は低く、2cm 以下の腫瘍では最も検出感度の高い CA19-9 の陽性率が 52%と未だ不十分であり、診断の補助となり得る新規マーカーの発見が急務である。一方で上皮間葉形質転換(EMT)という現象が膵癌浸潤、転移を惹起することが知られている。EMT 並びに EMT を介して誘導される浸潤、転移の機序を解明する事は、膵癌治療成績の向上に寄与すると考えられる。

長鎖機能性 RNA(lncRNA)はタンパク質をコードしない機能性 RNA (ncRNA)のうち、200 塩基以上の RNA 群の総称である。近年、さまざまな疾患における lncRNA の機能が徐々に解明されつつある。膵癌では HOTAIR, H19 等、十数個の lncRNA の発現異常が報告されているものの、膵癌特異的なマーカーとなる lncRNA の報告は無く、浸潤、転移における lncRNA の役割は解明されていない。よって、膵癌早期診断並びに、EMT の制御に寄与する新規 lncRNA を同定する事は、膵癌診断、進展機序解明のブレイクスルーとなる可能性が極めて高い。

NcRNA の細胞間伝達媒体として、近年、細胞外小胞 (extracellular vesicles; EV)が注目されている (図 1)。EV は多くの細胞から分泌され、RNA やタンパク質を含有し、それらの情報を EV 分泌細胞(ドナー細胞)から EV を受け取る細胞(レシピエント細胞)へと運搬する。しかし、膵癌における EV を介した lncRNA 輸送の機序とその役割については不明な部分が多い。EV は血液を含めた体液中を循環しており、EV に内包された RNA は安定性が高い事も示されている。よって体液中 EV 内の ncRNA の発現変化は、疾患早期診断のための体液診断 liquid biopsy としての有用性も期待される。従って膵癌患者血清 EV 中 lncRNA の発現変化とその機能解析を行う事は、膵癌早期診断法に新たな選択肢を提唱すると共に、膵癌進展に関わる細胞間情報伝達の新たなモデルを提示できると考えられる。

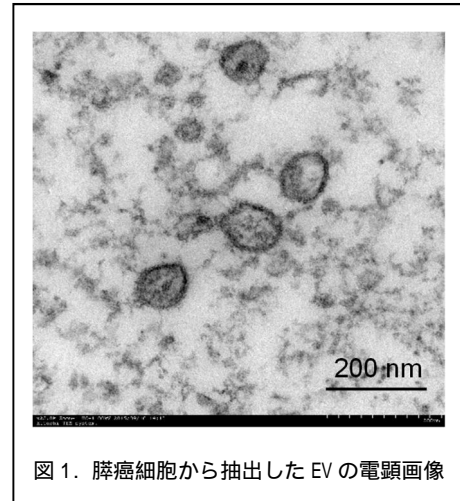


図 1. 膵癌細胞から抽出した EV の電顕画像

2. 研究の目的

本研究では、(1)膵癌患者血清 EV 中の lncRNA の発現量を解析し、膵癌早期診断のバイオマーカーとしての新規 lncRNA を同定し、その有用性を検証する。また、同定された lncRNA が膵癌進展に関連して(2)どのような作用をするのか(細胞生存能、浸潤能や遊走能に与える影響等)、(3)どのようなメカニズムで関わるのか(核酸本体としての制御機構、 EV による細胞間伝達を介した制御機構)を同定し、膵癌進展における、特に EMT を介した癌浸潤、転移に関わるメカニズムを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵癌患者血清 EV 中に高発現する lncRNA の同定

膵癌患者、健常者よりそれぞれ 3 検体ずつ血清を採取後、血清中 EV より RNA を抽出し、既知の 65263 遺伝子の発現変化を Affimetrix 社の cDNA microarray を用いて網羅的に解析し、膵癌患者で有意に発現上昇する RNA 群を同定した。

(2) 同定した lncRNA が膵癌細胞における形態、機能、遺伝子発現に及ぼす影響の解析

同定した lncRNA の膵管上皮細胞 (hTERT-HPNE) に対する各種膵癌細胞 (Panc-1、MiaPaCa-2、BxPC-、KP-3、QCP-1 等) における発現を qRT-PCR 法を用いて解析した。次に、lncRNA の膵癌細胞に及ぼす影響を、形態学的、遺伝子発現の両面から siRNA を用いたノックダウンによる遺伝子発現調節によって解析、検討した。まず、lncRNA ノックダウン後の、細胞増殖、生存、遊走、浸潤能の変化を評価した。更にノックダウンによって浸潤、遊走能に影響を与える事が確認された lncRNA については、浸潤、遊走促進のトリガーとされる EMT 関連遺伝子に与える影響を qRT-PCR、Western blot 法を用いて解析した。また、増殖、生存能に影響を与える事が確認された lncRNA については、ノックダウンがアポトーシスに与える影響について検討した。

(3) EV による lncRNA の細胞間輸送が膵癌進展に及ぼす影響の解析

同定した lncRNA が、ドナー膵癌細胞から分泌される EV によって細胞間伝達されるかどうか、及び伝達先のレシピエント細胞へ及ぼす影響について検証した。ドナー膵癌細胞から抽出した EV をレシピエント細胞へと添加し培養することで、(2)で行った実験と同様に、細胞増殖、生存、

浸潤、遊走能と EMT やアポトーシスに与える影響を解析、検討した。

(4) 血清 EV 中 IncRNA の膵癌新規バイオマーカーとしての有用性の検証

同定した IncRNA について、更に多くの膵疾患患者(膵癌患者、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)患者)、健常者血清(各 20-22 検体)を用い、血清 EV 中の発現解析を digital PCR(dPCR)を用いて行った。その結果を元に、各種臨床検査データとの相関を含め新規バイオマーカーとしての有用性について検証した。

4. 研究成果

(1) 膵疾患患者血清 EV 中に高発現する IncRNA の同定

cDNA microarray を用い健常者及び膵癌患者血清 EV 中の 65263 遺伝子の網羅的発現解析を行い、膵癌患者血清 EV 中に高発現する RNA 群を同定した(図 2)。その中でも特に発現の強い 5 種類の IncRNA に着目した。5 種類の IncRNA の中には、癌遺伝子としてすでに報告されている MALAT-1 も含まれていた。MALAT-1 はこれまで膵癌など多くの癌において、癌遺伝子として働くことが報告されているが、その他 4 種類については、癌と関連する文献的報告は見られなかった。これら 4 種類の IncRNA のうち、LINC02280 と IncRNA(A)については、正常膵管上皮細胞に比べ、各種膵癌細胞株において高発現し、更にそれぞれの膵癌細胞株から抽出された EV においても高発現する傾向が認められた(図 3)。以上の

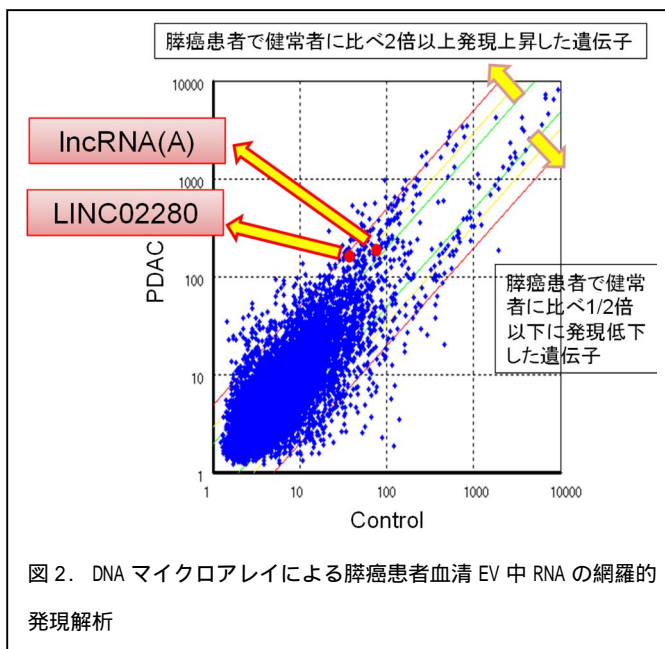


図 2. DNA マイクロアレイによる膵癌患者血清 EV 中 RNA の網羅的発現解析

結果から、LINC02280 と IncRNA(A)については膵癌診断における新規バイオマーカーとなり得る可能性が高いと考えられたため、これらの IncRNA に着目し、以降の実験を進めることとした。

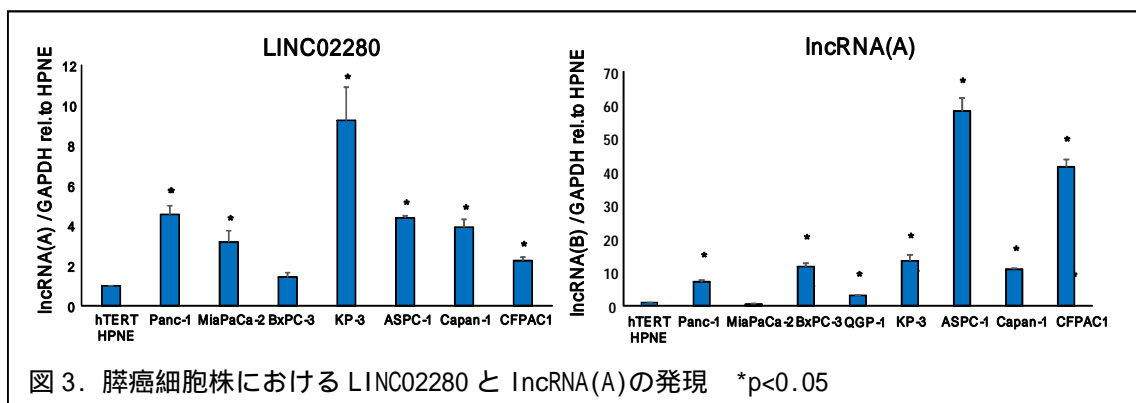


図 3. 膵癌細胞株における LINC02280 と IncRNA(A) の発現 * $p < 0.05$

(2) LINC02280、IncRNA(A) が膵癌細胞における形態、機能、遺伝子発現に及ぼす影響の解析

同定した 2 種類の IncRNA の機能解析を進めるため、まず始めに各々の IncRNA に対する siRNA をデザインし、膵癌培養細胞株 Panc-1 におけるノックダウン効率を検証した。その結果、LINC02280 については約 75%、IncRNA(A) については約 70% 程度のノックダウン効率を得られた。次に、Panc-1 において siRNA を用い LINC02280 に対するノックダウンを行い、細胞浸潤、遊走能に与える影響を Transwell assay 及び Wound healing assay を用いて検証した。その結果、LINC02280 のノックダウンによって、細胞浸潤、遊走能は有意に減弱することが確認された(図 4)。更に LINC02280 のノックダウンによって、癌浸潤、転移において重要な役割を担う EMT 経路が阻害されることも確認された。以上より LINC02280 のノックダウンが EMT 阻害を介して、膵癌細胞浸潤、遊走能を減弱することが示唆された。

一方で IncRNA(A) については、ノックダウンによる膵癌細胞 EMT や浸潤、遊走能への影響は確認されなかった。しかし、ノックダウンに伴い 5 μ M の塩酸ゲムシタピン投与下における膵癌細胞のアポトーシスが有意に誘導されることが確認され、IncRNA(A) は膵癌細胞のアポトーシス制御

に関わる遺伝子であることが示唆された。

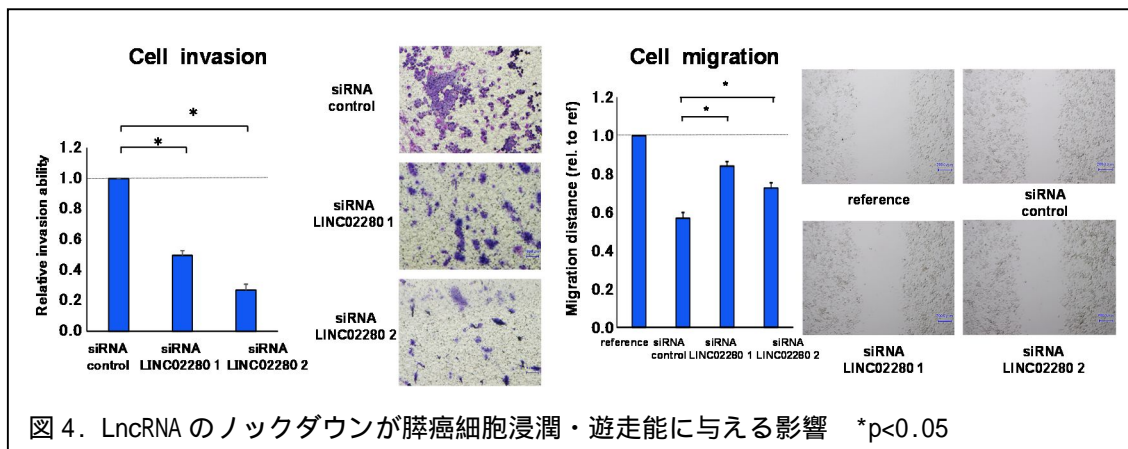


図 4. LncRNA のノックダウンが膵癌細胞浸潤・遊走能に与える影響 *p<0.05

(3) EV による LncRNA の細胞間輸送が膵癌細胞に及ぼす影響の解析

正常膵管上皮細胞と比較し、膵癌細胞 Panc-1 より抽出した EV 中には LINC02280 及び lncRNA(A) が高発現した。これらの EV を他の Panc-1 へと添加し培養したところ、添加後の Panc-1 における LINC02280 及び lncRNA(A) の発現は亢進したことから、これら 2 種類の LncRNA は EV によって細胞間伝達される遺伝子であることが示唆された。

これらの EV を添加した膵癌細胞では、EMT 促進を介した浸潤、遊走能の増強とアポトーシスの抑制が認められた。その制御には EV 内 LINC02280 と lncRNA(A) の関与が想定されるものの、詳細なメカニズムについては現在解析中である。

(4) 血清 EV 中 LncRNA の膵癌新規バイオマーカーとしての有用性の検証

LINC02280 と lncRNA(A) について、更に多くの膵癌患者 (21 検体)、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 患者 (22 検体)、健常者血清 (20 検体) を用い、血清 EV 中の発現を digital PCR を用いて解析した。その結果、LINC02280、lncRNA(A) とともに、健常者、IPMN 患者と比較し膵癌患者血清中で有意に発現上昇することが確認された (図 5)。ROC 曲線による解析では、両 lncRNA とともに area under the curves (AUC) の値は既存の腫瘍マーカー CEA より優位に高値であり、CA19-9 とほぼ同等であった。また、膵癌患者検体のみを用いた解析では、癌の Stage が進むにつれて両 lncRNA とともに発現上昇傾向が認められたものの、有意差までは得られなかった。現在更に検体数を増やして解析中である。

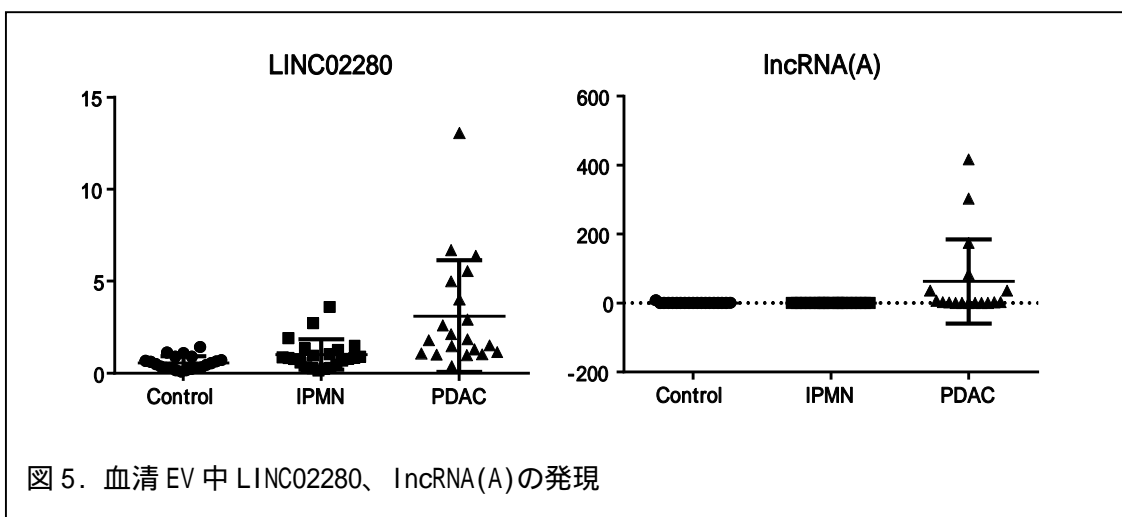


図 5. 血清 EV 中 LINC02280、lncRNA(A) の発現

cDNA microarray の結果から、膵癌患者血清 EV 中に高発現することが示された LINC02280 と lncRNA (A) は、膵癌細胞とそれらから分泌される EV 中にも高発現し、膵癌における新たな oncogenic RNA となり得る可能性が示唆された。現在 2 種類の lncRNA について膵癌細胞における機能解析を進めているが、LINC02280 が、EMT 促進を介し浸潤、遊走能を増強させる働きを担うこと、lncRNA(A) がアポトーシス抑制を担う証左を得つつある。今後は双方の遺伝子について、その詳細な膵癌進展制御機構を in vitro、in vivo 両面から検証していく予定である。

また本実験の結果から、これらの lncRNA は EV に内包され、EV によって細胞間伝達されることが実証された。2 種類の lncRNA は EV による細胞間輸送を介し、伝達先細胞でも分泌元の細胞内における働きと同様に、EMT 促進やアポトーシス抑制に寄与する可能性が示唆された。しかし、EV 内には 2 種類の lncRNA 以外にも数多くの因子が内包されており、それらが癌細胞の形態、機能に与える影響も考慮する必要がある。それ故、EV 内 LINC02280、lncRNA(A) の膵癌細胞における役割、及び伝達機構がどのように癌進展に寄与するかは、今後さらなる検討が必要と考えられる。

LINC02280、lncRNA(A) とともに、健常者と比べ膵癌患者血清 EV 中に有意に高発現しており、既存の腫瘍マーカー CA19-9 と同様に、膵癌発見に寄与する新たなバイオマーカーとしての有用性が示唆された。特に IPMN 患者と膵癌患者で発現に有意差が出ている事から、IPMN 由来膵癌や、併存癌の拾い上げに寄与する事が期待される。これまでに得られた検体数はそれほど多くはないものの、膵癌進展に寄与する血清 EV 中新規 lncRNA として 2 種類の遺伝子を同定したことは、今後の膵癌体液診断 (liquid biopsy) 領域の発展に貢献できる可能性が極めて高いと考える。近年注目を集めている体液診断の領域では、EV のみならず、cell free DNA や循環腫瘍細胞 (CTC) などもサンプルツールとして期待されている。その中でも EV は、癌の比較的早期から体液中に分泌されることがわかっており、早期診断という観点からは最も体液診断としての有用性が高いと期待される。これまでの国内外の報告では、EV 中の lncRNA 発現に着目した体液診断報告は希少であり、今後も更に検体数を増やし、これら "EV lncRNA" の膵癌バイオマーカーとしての有用性を検証していく。

我々が新たに同定した "EV lncRNA" は膵癌進展を制御し、新規バイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。今後更に解析を進め、膵癌早期診断、進展予測における新規 EV lncRNA の有用性及びそれらの人為的制御の可能性を検証する事で、将来的な新規診断、治療法開発基盤の確立に繋げることを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋賢治、太田雄、小山一也、鈴木裕子、岩本英孝、山北圭介、北野陽平、太田嗣人
2. 発表標題 膵癌患者血清中細胞外小胞における新規長鎖機能性RNAのliquid biopsyとしての有用性
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Takahashi, Yu Ota, Yuko Suzuki, Hidetaka Iwamoto, Keisuke Yamakita, Yohei Kitano, Tsuguhito Ota
2. 発表標題 CIRCULATING EXTRACELLULAR VESICLE LNCRNA LINC02280 IS A NOVEL BIOMARKER FOR HUMAN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA
3. 学会等名 DDW (Digestive Disease Week) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋賢治、太田雄、岩本英孝、山北圭介、北野陽平、牧野雄一、太田嗣人
2. 発表標題 長鎖機能性RNAとmicroRNAの相互作用による膵癌進展制御機構の解析
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋賢治、太田嗣人	4. 発行年 2019年
2. 出版社 アークメディア	5. 総ページ数 7
3. 書名 肝胆膵	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 癌のバイオマーカー	発明者 高橋賢治、犬塚達俊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020- 10122	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	小暮 高之 (KOGURE TAKAYUKI) (70400330)	東北医科薬科大学・医学部・講師 (31305)	