

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09471

研究課題名（和文）膵発がん初期バイオマーカーとなる血中マイクロRNAの同定

研究課題名（英文）Identification of circulating microRNAs for the detection of early stage pancreatic cancer

研究代表者

松崎 潤太郎（Matsuzaki, Juntaro）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授

研究者番号：60464864

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：マウス膵臓より初代分離培養した膵外分泌細胞に対して低分子化合物を曝露させ、ケミカルダイレクトリプログラミングを行って膵前駆細胞を樹立し、この細胞に胆汁酸によるストレス刺激を与えることで膵発がん初期の環境を*in vitro*でモデルすることに成功した。また細胞培養上清への分泌が促進されるmiRNAとしてmiR-296-5pなどを同定し、膵発がん超初期のバイオマーカーとなるものと期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは進行が早く予後不良であることから、早期診断技術の開発が待望されている。すでに進行膵がんと健常者の血中miRNAプロファイルに大きな差があることが知られているが、その明確な機序は不明であり、また特に早期段階から変化するmiRNAを特定することは、臨床的に早期診断される例が極めて少ないことから困難である。我々は簡便に膵臓の正常上皮細胞を培養・維持する技術を確立した。これを用いて膵がん初期段階に生じるであろう膵上皮細胞のmiRNA発現変化を解析し、膵がんの早期診断へと応用が期待できるmiRNAを特定した。今後、臨床的な評価を継続していく。

研究成果の概要（英文）：We established the culturing method of pancreatic progenitor cells by chemical direct reprogramming of pancreatic exocrine cells isolated from mouse pancreas. We then investigated the alteration in intracellular and extracellular miRNAs during the exposure to bile acid, which is a potential cause of pancreatic carcinogenesis. As a result, several miRNAs including miR-296-5p and miR-135a-3p were identified as miRNAs whose secretion into the cell culture supernatant was enhanced. These miRNAs are expected to be biomarkers for the early-stage pancreatic cancer.

研究分野：分子腫瘍学、臨床統計学

キーワード：膵臓がん マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵がんは、本邦におけるがん死亡の第4位であり、極めて予後不良な悪性腫瘍である。早期がんで見つかることが極めて稀であり、根治手術(R0手術)を行っても約半数が再発し、切除不能な症例では最も有効性の高い化学療法とされる FOLFIRINOX を使用しても生存期間中央値は11.1ヶ月である。膵がんの10%は遺伝性/家族性であるが、残る90%は明確な原因が明らかとなっていない。

膵がんの前駆病変はその多くが膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)であり、また一部に膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)が発生母地となることが知られている。IPMNはその嚢胞状の構造が容易に磁気共鳴画像(MRI)で同定できるため、膵がんハイリスク群として外科的切除または厳重フォローアップの対象となっている。一方、PanINはMRIや超音波内視鏡(EUS)の進歩を持ってしても画像的に特定が困難で、新規バイオマーカーが求められている。

一方、細胞は多様な細胞外小胞(エクソソーム)を分泌し細胞間コミュニケーションに利用していることが知られており、特にエクソソーム中で安定的に存在するmicroRNA(miRNA)は、血液や唾液、尿などの体液を用いて非侵襲的かつ正確に疾患を診断するリキッドバイオプシーへの応用が注目されている。血液中miRNAによる膵がんの診断は、miR-6075, miR-4294, miR-6880-5p, miR-6799-5p, miR-125a-3p, miR-4530, miR-6836-3p, miR-4476の8つのmiRNAを組み合わせることで感度80.3%、特異度97.6%、精度91.6%を達成しうることがわかっている(Kojima et al., PLoS One 10:e0118220, 2015)。しかし、臨床検体を用いた膵がんバイオマーカーの探索は、Stage1の早期膵がん病変が特定される患者が稀であり、ひいてはPanINの病変が特定されることは極めて困難であるため、主に進行膵がんの検体を用いて性能の評価が行われている実情があり、これが早期の病変にも応用可能であることを証明することは事実上困難である。

2. 研究の目的

本研究では、実験的に樹立した膵前駆細胞を用いてPanIN発生初期段階をin vitroで再現し、細胞上清中に含まれるエクソソーム中のmiRNAを解析し、また既存のヒト血清中のmiRNAプロファイルライブラリとの照合により、PanINの存在を血液診断しうるmiRNAを特定することにより、新たな膵発がん初期バイオマーカーを同定する。

3. 研究の方法

我々の研究グループでは、特定の低分子化合物がラットの成熟肝細胞を肝前駆細胞(Chemically-induced Liver Progenitors: CLiPと命名)に変換できることを報告した(Katsuda et al. Cell Stem Cell 20:41-55, 2017; Katsuda et al. eLife 8:e47313, 2019)。CLiP細胞は、in vitroおよびin vivoで成熟肝細胞および胆管上皮細胞の両方に分化することができた。そこで我々は、同様に低分子化合物を用いて膵外分泌細胞を膵前駆細胞にリプログラミングすることが可能かどうか検討した。C57BL/6マウスより膵外分泌細胞を単離し、低分子化合物を含む培地で平面培養を実施したところ、膵前駆細胞マーカーであるPdx1およびNkx6.1の発現が増強され、長期培養および単細胞クローニング可能な小型細胞を樹立しえた。

食道腺がんや分化型胃がんで見られる腸上皮化生の主要因として十二指腸からの胆汁の逆流が深く関与している(Matsuzaki et al. Gastroenterology 45:1300, 2013)。PanINから膵がんに至る発がん過程は、食道腺がんや分化型胃がんで見られる腸上皮化生を介した発がん機序(metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma シークエンス)と一致する点が多く、実際に膵管へ胆汁が逆流するように外科的処置を行ったハムスターでは、膵がんが発生する(Adachi et al., Carcinogenesis 29:830-3, 2008)。よって総胆管より膵管へ逆行した胆汁酸や、血流を介して膵臓に到達した胆汁酸が、膵発がんの直接要因である可能性が十分に考えられるため、胆汁酸曝露モデルは実際の生命現象を模した簡便な炎症惹起モデルと言える(Feng and Chen, World J Gastroenterol 22:7463-77, 2016)。

そこで、新規に樹立した膵前駆細胞に、胆汁酸によるストレス刺激を与えることで膵発がん初期の環境をin vitroでモデル化し、膵発がん超初期のバイオマーカーとなるmicroRNAの同定を試みた。

4. 研究成果

まず膵前駆細胞へとリプログラミングされる由来細胞の特徴を解明するため、C57BL/6マウスより単離した膵外分泌細胞を、蛍光ラベルで標識したDolichos biflorus agglutinin (DBA)レクチンで処理し、DBA結合能を有する細胞とそれ以外の細胞にフローサイトメトリーによって分画した。全体の97%を占めるDBA非結合分画はamylase高値で、3%程度のDBA結合分画

は CD133 高値であることから、既報のとおり、腺房細胞と膵管上皮細胞とがそれぞれ優位な細胞集団に分画することができたと考えられた (Hendley et al. eLife 10: e67776, 2021)。両分画にそれぞれ低分子化合物を曝露し膵前駆細胞の樹立を試みたところ、DBA 結合分画のみから継代維持可能な細胞が取得しえたことから、膵前駆細胞の由来は膵管上皮細胞であるものと考えられた。さらに、樹立した細胞を浮遊培養させると、Dithizone 染色陽性のインスリン分泌顆粒を有する内分泌細胞様の形質を獲得し、また培地中のブドウ糖濃度依存的に C ペプチド分泌能を有したことから、細胞への多分化能を有する細胞であることも確認できた。

この細胞に胆汁酸を曝露させるにあたり、膵管内の胆汁酸は抱合型であることを考慮し、グリココール酸、タウロコール酸、グリコケノデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸を選定した。結果、胆汁酸曝露によって細胞培養上清への分泌が促進される miRNA として miR-296-5p、miR-135a-3p などを同定した。

一方、本研究期間中に研究代表者は『体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発』プロジェクトに参画し、大規模なヒト血清 miRNA データベースを構築した。その中において膵臓がんや PanIN 患者より採取した血清の miRNA データも取得し得たが、統計学的に健常者と差のある miRNA を同定しても、その miRNA の由来細胞は膵臓がん細胞とは限らず、その変動メカニズムを推測することが困難であった。

そこで、このヒト血清 miRNA データベースを用いて miR-296-5p と miR-135a-3p のバイオマーカーとしての有用性を検証するため、健常者と PanIN の識別能を ROC 解析したところ、miR-296-5p において曲線下面積(AUC)が 0.744 (95%信頼区間: 0.593-0.895)、miR-135a-3p において AUC が 0.869 (95%信頼区間: 0.788-0.951)であった。またいずれの miRNA も PanIN の切除手術後には健常者と差がない水準に回復した。すなわち、miR-296-5p と miR-135a-3p は PanIN を早期診断する有力なバイオマーカー候補と考えられた。

実際、miR-296-5p は過去の研究者らにより、膵臓がんにおいて変動する miRNA であることが報告されている (Yu et al. Clin Cancer Res 18: 981-992, 2012; Xu et al. Ann Surg 263:1173-9, 2016)。一方、miR-135a-3p はもともと発現量の多くない miRNA であり、これまで報告がなされていないが、miRNA 測定技術の進歩によって高感度に miRNA を定量できる技術がますます増えていくなか、今後新たなバイオマーカー候補として更なる研究が必要である。

また研究代表者らは CRISPR/Cas9 技術によって、膵前駆細胞にがんドライバー遺伝子である KRAS、P53、SMAD4 の変異導入に成功した。現在これらの細胞内 miRNA 発現変化も解析中である。これらの細胞をマウスに移植した際のマウス血清 miRNA 発現変化も解析を予定している。これは基盤研究(B)『膵臓がん時の血中マイクロ RNA 変動機構の包括的解明』において継続する。さらに東海大学との共同研究において、膵臓がん患者より前向きに血清を収集する研究を計画している。これは森町将司博士が代表を務める若手研究『切除不能膵癌における化学療法効果予測因子となりうる microRNA の探索』において実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tominaga Hiroto, Matsuzaki Juntaro, Oikawa Chihiro, Toyoshima Kensho, Manabe Haruki, Ozawa Eriko, Shimamura Atsushi, Yokoyama Riko, Serizawa Yusuke, Ochiya Takahiro, Saito Yoshimasa	4. 巻 13
2. 論文標題 Challenges for Better Diagnosis and Management of Pancreatic and Biliary Tract Cancers Focusing on Blood Biomarkers: A Systematic Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13164220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mori Hideki, Suzuki Hidekazu, Matsuzaki Juntaro, Masaoka Tatsuhiro, Kanai Takanori	4. 巻 1193
2. 論文標題 10-Year Trends in Helicobacter pylori Eradication Rates by Sifaxacin-Based Third-Line Rescue Therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000501610	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 Matsuzaki Juntaro, Tsugawa Hitoshi, Suzuki Hidekazu	4. 巻 [Epub ahead of print]
2. 論文標題 Precision Medicine Approaches to Prevent Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut and Liver	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5009/gnl19257	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 松崎潤太郎, 落谷孝広	4. 巻 41
2. 論文標題 血液中miRNA検査.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医療と検査機器・試薬	6. 最初と最後の頁 334-336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 松崎潤太郎	4. 巻 265
2. 論文標題 miRNAによるliquid biopsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 499-503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 松崎潤太郎, 落谷孝広	4. 巻 29
2. 論文標題 癌のリキッドバイオプシーによるプレジジョンメディシン	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Lipid	6. 最初と最後の頁 185-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 7. 松崎潤太郎, 落谷孝広	4. 巻 39
2. 論文標題 血中マイクロRNA測定による膵がん・胆道がんの早期診断	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 323-326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Matsuzaki J, Ochiya T	4. 巻 61
2. 論文標題 Extracellular microRNAs and oxidative stress in liver injury: a systematic mini review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.17-123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki J, Suzuki H	4. 巻 4
2. 論文標題 Circulating microRNAs as potential biomarkers to detect transformation of Barrett's oesophagus to oesophageal adenocarcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMJ Open Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 e000160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjgast-2017-000160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki J, Ochiya T	4. 巻 22
2. 論文標題 Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 413-420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-017-1104-3	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14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 がん診療に変革をもたらす血中微量核酸のミステリー
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuzaki J, Kato K, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yi O, Ayyar S, Miyajima R, Nolan T, Kawai N, Kato K, Ota N, Ochiya T
2. 発表標題 Machine learning-based multiple cancer detections with circulating miRNA profiles in the blood
3. 学会等名 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 いつ出るの？血中マイクロRNA診断
3. 学会等名 第28回日本がん予防学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 血中miRNA診断技術開発の現状と未来
3. 学会等名 第41回日本分子腫瘍マーカー研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 Unraveling tumor diversity by microRNA: possibilities and limits
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 低分子化合物を用いた成熟肝・膵実質細胞の前駆細胞へのリプログラミング技術の開発
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 低分子化合物による膵外分泌細胞の膵前駆様細胞およびインスリン分泌細胞の誘導
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 血中microRNAプロファイルによる消化器がん診断
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki J
2. 発表標題 Multi-class discrimination of digestive cancers based on circulating microRNA profiles
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference E2: Exosomes/Microvesicles (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 低分子化合物による膵外分泌細胞の膵前駆様細胞へのリプログラミング
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki J
2. 発表標題 In vitro chemically-induced reprogramming of pancreatic acinar cells to pancreatic progenitor-like cells
3. 学会等名 Gordon Research Conference “ Pancreatic Diseases ” (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 血清miRNAによる消化器がん診断マーカーの開発
3. 学会等名 第5回JMACシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松崎潤太郎
2. 発表標題 H. pyloriの好中球活性化蛋白(NapA)の多型によるディスペプシア惹起能力の差異
3. 学会等名 第14回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki J
2. 発表標題 Serum microRNAs for the early-stage detection of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia “ Liver Biology, Diseases &Cancer ” (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松崎潤太郎, 落谷孝広	4. 発行年 2017年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 489
3. 書名 早期発見・低侵襲で見つけ出す疾患・病態検査・診断法の開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学薬学部：講座（研究室）紹介：薬物治療学 https://www.pha.keio.ac.jp/research/pt/index.html 国がん、低分子化合物でマウス膵外分泌細胞を膵前駆細胞へ脱分化 https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/news/p1/18/03/26/04041/

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------