

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08648

研究課題名(和文) 膵・胆道癌早期診断を目指した十二指腸液exosome中バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Biomarkers in exosome extracted from duodenal fluid for early detection of pancreaticobiliary malignancy

研究代表者

高畑 俊一 (TAKAHATA, Shunichi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50437779

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)：膵液中及び十二指腸液中から各々exosomeの抽出を試み存在を証明し、その安定性の検討を目標とした。最終的には十二指腸液カプルでのexosome抽出、内包される蛋白質、RNA、DNAの抽出を目標とした。当研究室で十二指腸液を採取し、膵、胆道癌高危険群同定及び早期癌の診断精度を検証。我々は胆汁中、膵液中のexosome抽出に成功し、exosomeの安定性についての検証も終了、膵液中のexosomeからmiRNA-21, miRNA-155を測定、膵液細胞診と組合せることで膵癌診断の正診率が91%まで上昇することを明らかにした。また十二指腸液からも安定的にexosomeが抽出できることを確認。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵液細胞診は膵癌診断において感度が比較的低く、穿刺吸引細胞診を要することも稀ではない。われわれが開発した膵液中のexosomal RNAからmiRNAの発現解析を組み合わせることで高い正診率を得ることができ、患者に複数回の内視鏡検査を行う負担を軽減することが可能になる。また、十二指腸液中のexosomeの抽出は可能であったため、内包されるmiRNA、DNAの解析で膵癌・胆道癌診断ができれば、健常者の検診でも膵癌・胆道癌のスクリーニングが可能である。罹患率は低いものの、生物学的悪性度が高いために、高い癌関連死亡率を示す膵・胆道癌の早期診断による社会的な貢献度も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Compared to other body fluid, pancreatic juice, bile, and duodenal fluid would be better sources of DNA, RNA, proteins, and exosomes derived from neoplastic cells of pancreaticobiliary system and have the potential to increase sensitivity/specificity of biomarkers to identify pancreaticobiliary cancer. We prospectively collected pancreatic juice, bile, and duodenal fluid from patients with pancreaticobiliary malignancy. In our initial study, we extracted exosomal miRNA from pancreatic juice and identified miRNA-21 and miRNA-155 as biomarkers for diagnosis of pancreatic cancer. We also succeeded extraction of exosome from duodenal fluid which have potential to utilize for minimally-invasive screening of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆道癌 セネセンス マイクロRNA 膵癌 十二指腸液 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

膵癌、胆管癌は各々膵管上皮、胆管上皮から発生する。そのため近年報告される血液サンプルと比較し、癌に直接、接する膵液、胆汁、及び十二指腸液は早期癌由来の分子マーカ含有している可能性が高い。健診が浸透している本邦では十二指腸液は消化管内視鏡中に非侵襲的に採取可能な検体であり、早期診断目的のバイオマーカーを検出するには最も適当な検体といえる。当研究で発見されるであろうバイオマーカーによって国民が受ける利益は極めて高く、挑戦する価値があると思われる。一方、exosomeは癌細胞を含むすべての細胞から分泌される直径30~100nmほどの脂質二重膜により形成される小胞である。内部に蛋白質、RNA、DNAなどが内包されており、RNase、DNaseから守られている。その機能の詳細はまだ判明していない(図2)。膵液、及び胆汁、胃液の混在する十二指腸液は長らく早期癌診断ツールとして大きな可能性を秘めてはいるにもかかわらず、分子マーカーにとっては過酷な環境と言われてきた。



(2) 研究課題の核心をなす学術的「問い」

exosomeは十二指腸液中に存在するのだろうか。もし存在するのであれば、安定して存在することが予想され、早期膵癌・胆道癌診断可能な分子マーカーを安定して含有しているのではないだろうか。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的

十二指腸液中 exosome に内包される蛋白質、RNA、DNA を網羅的に解析し、膵癌、胆道癌高危険群を選別することを目的とする。

(2) 本研究の学術的独自性と創造性

胆汁中 exosome を解析した胆管癌診断の報告(2012, hepatology)はあるが、膵液中、及び十二指腸液中には exosome の存在すら報告されておらず、未知の領域である。特に膵液は非常に強力な消化液として知られており、今まで分子マーカー検索に不向きと言われてきた。本研究では膵液中でも安定して存在する exosome に着目することで、全く新しい分子マーカーを発見する可能性を秘めており、担癌患者からの検体だけでなく健診で採取された十二指腸液を使用することで膵癌、胆管癌の発癌の機序に迫る可能性もある。

十二指腸液中 exosome を抽出し、内包される蛋白質、RNA、DNA を網羅的に解析する。高感度な分子マーカーを検出し、最終的には膵・胆道癌の早期診断を目指したスクリーニングに耐え得るマーカーを開発する。

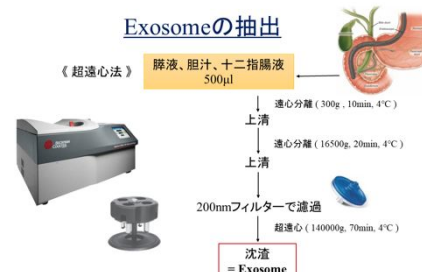
3. 研究の方法

既に多くの十二指腸液、膵液、胆汁サンプルを当研究室では保管している。同サンプルから各々 exosome の抽出を試み存在を証明する。またその安定性を検討する。最終的には十二指腸液サンプルでの exosome 抽出、内包される蛋白質、RNA、DNA の抽出を目標とする。

(1) 膵液・胆汁・十二指腸液採取方法

具体的サンプル採取方法、対象症例について以下に述べる。

十二指腸液は膵・胆道疾患患者の場合には ERCP 時に検査に先立ち採取する。胆汁・膵液は胆管、膵管へ挿管を行い採取する。十二指腸液サンプルは当科で行っている生体腎移植ドナーを正常コントロール群とし、スクリーニング上部消化管内視鏡時に採取する(Pancreas Abs 2015)。胆汁は総胆管結石症例、膵液は内分泌腫瘍症例、慢性膵炎症例をコントロール群とする。専用チューブ(RP-130Q)を用いて内視鏡挿入後ただちに5分間十二指腸液採取を採取したのち、通常の検査を行う。採取した十二指腸液は直ちに2本のチューブに分注し(蛋白分解酵素阻害剤あり・なし)、-80フリーザーに入れ、解析まで保管する(図4)。十二指腸液は以前の別の目的で立案した研究の際に採取したものをを用いる(Pancreas 2013)。十二指腸液マーカーはその種類によっては十二指腸液中で速やかに分解されるものや、逆に蛋白分解酵素阻害剤が分子マーカーの測定を妨げるものが存在する可能性があるため、蛋白分解酵素阻害剤を混注したものとし、ないものの2種類を準備する。疾患群では、まずは膵癌・胆道癌を対象とするが、それ以外に発癌高リスク因子である可能性が報告されている膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、膵胆管合流異常も含むものとする。



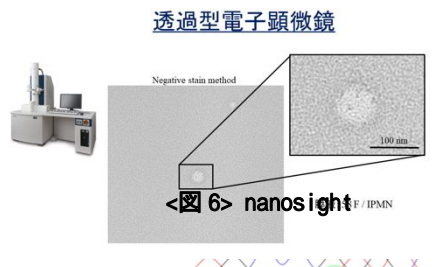
(2)exosome の分離・抽出方法

十二指腸液 400 μ l を 300g、4、10min で遠心したのちに、上清を 16,500g、4、20min で遠心し、220nm フィルターで濾過する。さらに濾過液を 140,000g、4、70min で超遠心を 2 回行い、上清とともに、沈殿物を exosome も含む fraction とし、上清と沈殿物をそれぞれ分けてストックする(図 5)。内視鏡検査時に胆汁、膵液を採取した場合には、上記と同様のプロトコールで上清と exosome 分画を分離・抽出する。これらは十二指腸液内 exosome が胆汁、膵液のいずれに由来するものであるかを確認するための検体である。

<図 5> Exosome の抽出

(3)exosome の存在解析

電子顕微鏡による exosome の直接観察、nanosight (図 6) による微量分子観察、exosome 特異的表面マーカーである CD9, CD63, CD81 をウエスタン・ブロット法で確認する。現時点で当研究室では胆汁・膵液中 exosome の抽出に成功している。特に膵液中 exosome は今まで報告がなく非常に画期的発見である(図 7)。



透過型電子顕微鏡

<図 6> nanosight F/IPMN

(4) 膵・胆道癌特異的分子マーカーの同定*

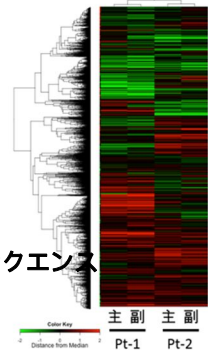
十二指腸液中 exosome 内の分子マーカーとして蛋白質、RNA、DNA に注目して解析する。DNA は膵・胆道癌で高い頻度で認められる遺伝子変異 (*KRAS*, *GNAS*) の解析(Ann Surg 2014, 2015)をはじめ、各種癌関連遺伝子のホットスポットにプライマーを設定した癌パネルを使用し変異解析を行う。遺伝子変異解析法には既に当該施設で稼働している次世代シーケンサー、サンガーシーケンス、パイロシーケンス(図 8, 9)を用いる。RNA 抽出はキットを用いて行い、正常コントロール患者から得られた検体と比較する形でのマイクロアレイ解析(図 10)を行い、癌患者で有意に発現となる mRNA を同定し、この mRNA の情報を基に、蛋白質マーカーの解析を行う(図 10)。また当該施設がこれまで膵液中の膵癌予測分子マーカーとして解析したテロメラーゼ活性(Cancer 2004)、S100 蛋白ファミリー (Clin Cancer Res 2006)、Sonic hedgehog (Int J Cancer 2007)などにも注目する。miRNA については、特に膵・胆道癌切除組織で高いことが分かっている miRNA-21, 155, 196 等 (Mol Cancer Ther 2009, JOP 2010, Oncol Rep 2013) に注目するが、マイクロアレイ解析で広く拾い上げも行う。理想的なマーカーは膵癌と胆道癌共通であり、かつ前癌病変の状態でも同定するものである。特に癌患者の偽陰性が少ない、特異度の高いマーカーの同定を目指す。この条件を満たすものであれば膵癌、胆道癌単独のマーカーであっても許容する。感度、特異度は ROC(Receiver Operating Characteristic)曲線の AUC(Area Under the Curve)から算出する。

KRAS codon 12/13; GGT>CGT, G12R

<図 7>



<図 8> サンガーシーケンス



<図 9> パイロシーケンス

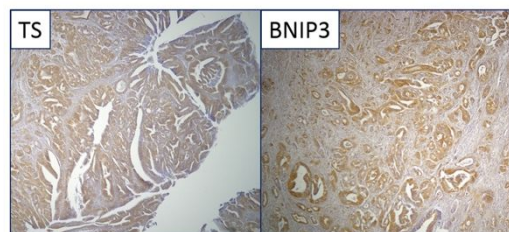
(5)切除標本との対比

十二指腸液解析で有意に特異的分子マーカー発現上昇ないし遺伝子変異を認めた同一患者の切除検体内でも同様の現象がみられるかを検討し、注目している分子マーカーが腫瘍そのものに由来しているかの確認を行う。切除標本の解析はパラフィン包埋切片に対する免疫組織化学染色(図 11)、in situ hybridization を行う。また当該施設の Tissue Bank (Human Pathol 2014)に保存している新鮮標本より DNA、RNA、蛋白質を抽出し mRNA, miRNA を PCR 法、蛋白質をウエスタン・ブロット法で定量し、遺伝子変異を次世代シーケンサーや Sanger 法を用いて検出する。

<図 10> mRNA マイクロアレイ

(6)臨床的事項との対比

特に早期癌で切除された患者で特異的に変化の見られる分子マーカーの同定を試みる。また膵胆管合流異常、慢性膵炎、IPMN など膵・胆道癌のリスクが高いと考えられる患者の経過を追い、後に発癌した患者で、解析時に既に変化の見られた分子マーカーの同定を試みる。前癌状態で変化の見られるマーカーの同定ができれば、これがスクリーニングに適した極めて優れたマーカーとなる。また腫瘍マーカーなど、従来のスクリーニング法と感度・特異度の比較も行う。



<図 11> 胆道癌の免疫組織化学染色所見

4. 研究成果

(1) 膵液中 exosome の抽出

胆汁・膵液中の RNA は RNase の存在により分解されているため、安定して発現解析を行うことは容易ではない。われわれは超遠心法によって膵液中の exosome を抽出し、exosome 内の miRNA の発現解析を行うこととした。超遠心法により抽出した exosome の存在解析は透過型電子顕微鏡と nanosight による微量分子観察, exosome 特異的表面マーカーである CD63, CD81, TSG101 で行い、膵液中の exosome は抽出可能であることを確認した(図 12)。

(2) 膵癌患者における exosomal-miRNA 発現解析

さらに exosome 内の miRNA21 と miRNA155 の発現は膵癌患者から採取した膵液では慢性膵炎患者から採取したものよりも有意に高値であり膵癌の早期診断に有用である可能性を報告した(図 13, Ann Surg Oncol, 2019)。

(3) 十二指腸液中 exosome の抽出

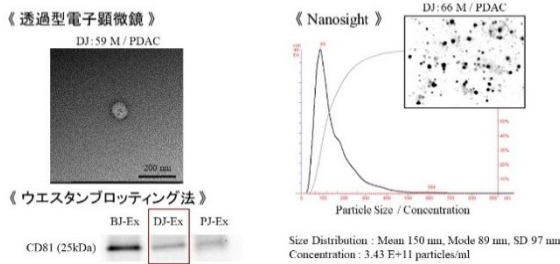
膵液中の exosome 抽出の技術を応用し、われわれは十

二指腸液中の exosome 抽出が可能か検討をおこなった。超遠心法によって十二指腸液中の exosome を抽出し、透過型電子顕微鏡と nanosight による微量分子観察, exosome 特異的表面マーカーである CD81 をウエスタンブロッティング法で確認して存在を確認した(図 14)。

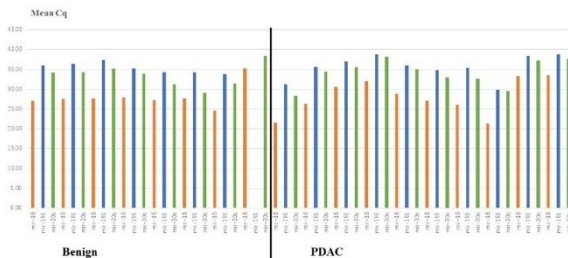
(4) 十二指腸液中 exosomal-miRNA 発現解析

続いて抽出した exosome より miRNeasy Mini Kit

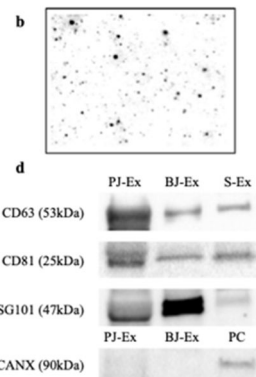
(Qiagen)を用いて miRNA を抽出した。十二指腸液中の exosome 内に安定して発現している



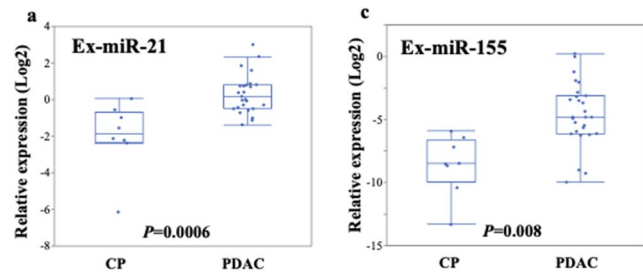
<図 14>十二指腸液中 exosome の存在確認。



<図 15>十二指腸液中 exosomal RNA, internal control の検討

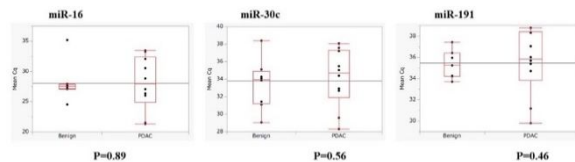


<図 12>nanosight による微量分子観察と exosome 表面マーカーの発現



<図 13>exosome 内の miRNA-21, 155 は膵癌のバイオマーカーである。

internal control についての報告はなく、われわれが過去に行ったマイクロアレイ解析および報告から miRNA-16, miRNA-30c, miRNA-191 を候補として解析を行い、miRNA-16 が internal control として適していることを同定した(図 15)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakamura So, Sadakari Yoshihiko, Ohtsuka Takao, Okayama Takafumi, Nakashima Yohei, Gotoh Yoshitaka, Saeki Kiyoshi, Mori Yasuhisa, Nakata Kohei, Miyasaka Yoshihiro, Onishi Hideya, Oda Yoshinao, Goggins Michael, Nakamura Masafumi	4. 巻 26
2. 論文標題 Pancreatic Juice Exosomal MicroRNAs as Biomarkers for Detection of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2104 ~ 2111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07269-z	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	大塚 隆生 (OTUKA Takao) (20372766)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	森 泰寿 (MORI Yasuhisa) (50632642)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	貞苅 良彦 (SADAKARI Yoshihiko) (80784503)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

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