

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15302

研究課題名（和文）胆汁サンプルを用いた膵胆道癌の新規biomarkerの発掘

研究課題名（英文）Research for new biomarker of pancreatobiliary cancer using human bile

研究代表者

松田 暁子（MATSUDA, AKIKO）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：10573272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：胆汁中の細胞外小胞(EVs)が膵胆道癌の新たな診断マーカーとなるかを検討した。効率的EVs抽出法：胆汁は感染や黄疸の影響を受けるため適切な希釈やフィルタリングをEV抽出前に行う必要がある。EVsは粒子径と濃度・膜表面タンパクの発現により検体の妥当性を確認した。EV内包因子の発現評価：EVs内のmicro RNAは抽出可能であり、miR-21の発現をdigital PCRで確認した。癌に特異的なEV関連候補蛋白を認め、候補因子発現について確認評価を行っている。胆汁中EVsが膵胆道癌の新たな診断マーカーとして臨床で応用でき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

消化器分野で難治である膵胆道癌の確定診断は、内視鏡を用いた胆汁細胞診や胆道狭窄部からの生検が必要不可欠だが、診断に難渋するケースが存在する。細胞外小胞は体液中に存在する細胞間コミュニケーションツールであり、癌の診断においても注目される因子である。本検討では、胆汁中の細胞外小胞の適切な抽出方法確立し、診断マーカー検索における有用なターゲットとなる可能性を示した。またそれらが有するmicro RNAやタンパク発現について、特異的因子の発現評価は現在進行中であるが、これらの候補因子により、膵胆道癌の診断から治療に至る過程がより迅速化され、患者の早期治療介入へ貢献される事が期待される。

研究成果の概要（英文）：We showed that extracellular vesicles; EVs in bile had a potential for diagnosis of pancreatobiliary cancer. Efficient EV isolation technique: Viscosity of bile depends on the cholangitis or jaundice in the patients. Efficient dilution and filtering method made EV isolation efficiency by ultracentrifugation better. We evaluated EV size, particle numbers and showed the expression of specific EV markers by western blot. Identification of EV inclusions in the patients with pancreatobiliary cancer: Exosomal miRNAs derived from bile was able to isolate and miR-21 expression was showed by digital PCR. Some exosomal proteins expressed specifically in the patients with pancreatobiliary cancer. These will be useful marker in diagnosis of pancreatobiliary cancer and will contribute to early diagnosis and care.

研究分野：消化器内科

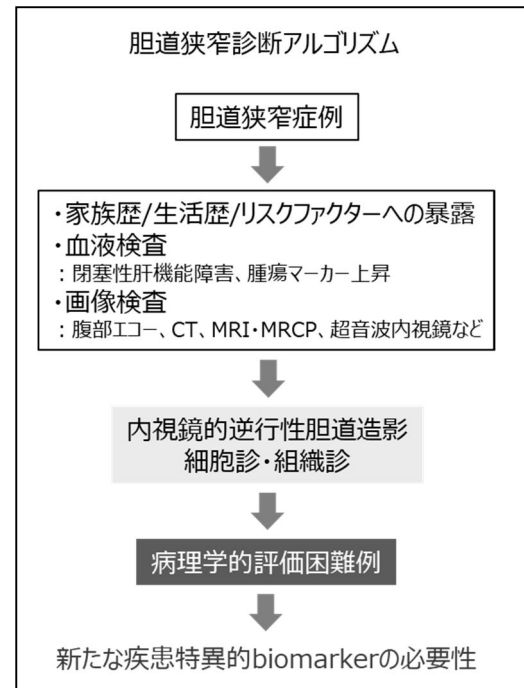
キーワード：胆汁 細胞外小胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治癌のひとつである膵胆道癌はCT、MRI 等による画像診断に加え、内視鏡的逆行性胆道造影 (Endoscopic retrograde cholangiography:ERC)による胆汁細胞診、胆道狭窄部からの生検が確定診断において必要不可欠である。しかし的確な部位からの生検は手技の熟練を要し、不十分な検体採取は病理学的評価を困難にするため、現在の膵胆道癌診断アルゴリズムでは治療開始の遅れや over surgery に繋がるリスクがあり、新たな診断ストラテジーが求められる。

血液、唾液、尿などの体液中には、脂質二重膜から成る細胞由来の細胞外小胞 (extracellular vesicle: EV) が存在する。EV は由来細胞の特徴をそのまま反映した脂質、タンパク質、核酸等を内包し、ドナー細胞にそれらを輸送し標的遺伝子発現を制御するなど、細胞間コミュニケーションツールとして重要な役割をはたしている [1]。癌においても EV による情報伝達が癌細胞の増殖・転移等にかかわっている [2]。また、由来細胞によって異なる EV 内包分子による癌診断法の研究も活発に行われている [3]。胆汁中にも胆管上皮細胞由来の EV が存在し、胆道癌症例の胆汁中 EV は非癌症例と比較して有意に高濃度であり、血清中 EV 濃度より高い正診率で非癌症例との鑑別が可能である事が報告された [4]。この結果は、癌細胞の高い EV 産生能と EV が直接的に胆汁中に放出される事を反映しており、胆汁 EV は血清 EV と比較してより直接的に癌細胞由来 EV を評価できるメリットがある。胆汁 EV を用いた膵胆道癌診断は病理診断を補完する新たな診断法として期待されるが、より特異的な膵胆道癌 biomarker を多角的に検討すべきである。



2. 研究の目的

胆汁中 EV を用いた膵胆道癌診断の新たな診断法を構築する事が最終的な目的である。しかし胆汁中の EV 抽出方法やその解析方法について確立されていない。そこで、適切に評価しうる胆汁中 EV 抽出方法の確立、を行った上で、膵胆道癌患者の胆汁由来 EV における内包因子の発現解析を行い、疾患特異的因子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

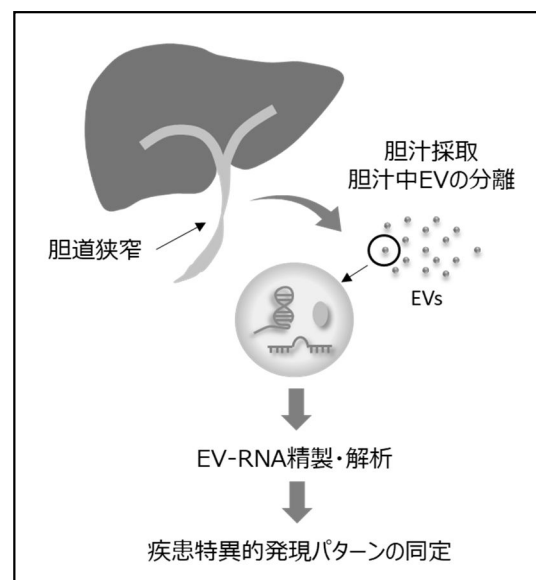
(1) ERC・胆汁採取

： ERC 時に採取した胆汁はすぐ氷冷し、採取当日に 4℃, 500g × 10 分遠心して、その上清を -80℃ で保存する。なお、ERC 時の生検や胆汁細胞診、もしくは外科切除標本において悪性腫瘍の確定診断がついたものを悪性狭窄群、胆管結石症例をコントロールとした。

(2) EV isolation

： プロトコルに従って [5, 6]、遠心による細胞成分の分離後、バッファーによる洗浄と超遠心、0.22μm pore filter による濾過を行い良質な EV 検体を得る。

(3) EV の質的評価



：プロトコールに従って EV を固定し電子顕微鏡で EV の形態とサイズを確認する。また、EV 発現タンパクである CD9,CD81,ALIX の発現を Western blot で評価する。

(4) EV 内包 miRNA 抽出

：miRNA は miRNeasy Serum/plasma kit (Qiagen)によるを用いて isolation する。

(5) EV 内包タンパク発現評価

：EV 検体のタンパク量は蛍光抗体法で測定し、LC/ MS system(Q-exactive/EasynLC1000, Thermo)により発現解析を行った。

4 . 研究成果

(1) 胆汁中 EV 抽出

：膵胆道癌 20 例、コントロールとして胆管結石 20 例から、ERC 施行時の胆汁、および経鼻胆道ドレナージチューブ (Naso-biliary drainage: NBD) を留置した場合には胆汁バックを氷冷して 5-20ml 検体を採取した。

癌・非癌いずれにおいても、胆管炎の併発により胆汁の粘稠度が上昇する事から、PBS による検体の洗浄、500g・10 分の遠心後に .22um pore filter によるろ過、さらに 300g で再度遠心を加えた。ナノ粒子トラッキング解析 (Nanosight) において、100-200nm にピークを持つ EV が採取され、適切な前処理により安定した EV 抽出が可能であった ($5.0 \times 10^{10} \sim 1.5 \times 10^{11}$ particles/ml)。抽出した EV は、EV の表面マーカーである CD9,CD81,ALIX の発現が western blot で確認され、検体としての妥当性が示された。ERC 施行時、および NBD 留置後 3,7 日目に採取した検体では、明らかな胆汁中 EV 数に差は認められなかった。膵胆道癌症例とコントロール症例において、EV 濃度の比較を行った。既報では癌患者の胆汁中 EV が優位に高濃度であったが[4]、本検討では有意差はなかった。膵胆道癌では胆管炎や黄疸は必発といっても過言ではなく、胆汁中 EV はこれらの背景となる病態による影響は無視できず、EV 濃度のみで癌・非癌の鑑別は困難と考えられた。

(2) EV 内包 miRNA 発現

：胆汁中の miRNA 抽出が可能か検討した。胆汁は胆泥等の不純物を遠心で除去した後、miRNA は miRNeasy Serum/plasma kit を用いて抽出した。他の miRNA 抽出キットと比較検討した結果、同キットにより安定した抽出量が得られた (1.5-15ng/ul)。微量検体であるため、miRNA 発現解析を digital PCR (Bio-Rad) にて行った。コントロールとして miR-21 の発現を癌・非癌検体で評価し、いずれにもいっても発現が確認された。現在、膵胆道癌特異的 miRNA 発現について検討継続中である。

(3) EV 内包タンパク発現

：LC/ MS system (Q-exactive/EasynLC1000, Thermo)による、プロテオーム解析が進行中である。現時点で、膵胆道癌患者由来の胆汁検体から抽出した EV に発現する候補蛋白を同定し、解析を進めている。

これまで胆汁中 EV の解析はいくつか報告されているが、EV 抽出法について検討されてはあらず、検体としての適切性については疑問が持たれるところであった。本検討では、胆汁中 EV 内包因子発現新を評価しうる適切な検体の抽出法が確立された。また胆汁中 EV から miRNA 抽出が可能であり、digital PCR による発現評価も可能である事が示された。膵胆道癌診断マーカーとなるタンパクの同定は現在進行中である。

【引用文献】

- [1] Valadi H, et al. Nat Cell Biol 2007;9(6):654e9.
- [2] Choi D, et al. Semin Cell Dev Biol. 2017;67:11-22.
- [3] Matsuzaki J, et al. Int J Clin Oncol. 2017;22(3):413-420.
- [4] Severino V, et al. Gastroenterology. 2017;153(2):495-504.
- [5] Yan IK, et al. Protocol exchange, 2015.
- [6] Li L, et al. J Vis Exp. 2016;112.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----