

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07415

研究課題名(和文)細胞診検体を用いてmiRNAとlncRNAを標的とする胆管癌の診断モデルの構築

研究課題名(英文) Construction of diagnostic model of cholangiocarcinoma targeting of miRNA and lncRNA of cytological samples

研究代表者

有廣 光司(Arihiro, Koji)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：70232064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：miR-182-5p、miR-31-5p、miR-122-5p、miR-92a-3p、miR-378dの5つのmicroRNAについて胆管癌と非癌部の組織検体、胆管擦過細胞診あるいは胆汁細胞診検体からtotal RNAを抽出し、qRT-PCR法により各microRNAのcustom primerを用いてコピー数の定量的解析を行った。miR-31-5p、miR-122-5p、miR-378dは胆管癌組織において非癌部よりも有意に高発現であった。細胞診判定に関係なくmiR-31-5p、miR-182-5p、miR-378d、miR-92a-3pが良性症例より胆管癌症例で有意に高発現であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

良性疾患の患者と比較して肝外胆管癌患者の胆汁細胞診検体で、複数のmicroRNAの発現レベルが高いことを明らかにした。また胆管細胞診標本の補助判定としてmicroRNAの発現を解析し、miR-182-5pの発現が細胞診でAtypicalと診断された悪性例と良性例を区別できることを示した。胆汁細胞診標本におけるmicroRNAの定量的解析は、客観的な診断補助として有用である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop reliable biomarkers that improve the ability of bile cytology to diagnose cholangiocarcinoma versus benign biliary lesions. We analyzed the expression of five tumor-associated miRNAs (miR-31-5p, miR-122-5p, miR-378d, miR-182-5p, and miR-92a-3p) in cytology samples using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. We collected 52 surgically resected tissue samples, 84 cytological specimens from smears (53 cases of cancer and 31 cases of non-cancer), and 40 residual sediments after smearing for routine cytology. The expression of miR-31-5p, miR-378d, and miR-122-5p was significantly higher in cancer tissues than those in normal tissues, while miR-182-5p expression was lower. The expression of miR-31-5p, miR-378d, miR-182-5p, and miR-92a-3p was significantly higher in detached cell samples from smears of cholangiocarcinoma cases than in those from non-cancer cases.

研究分野：外科病理

キーワード：肝外胆管癌 胆管擦過細胞診 胆汁細胞診 microRNA qRT-PCR法 定量的解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

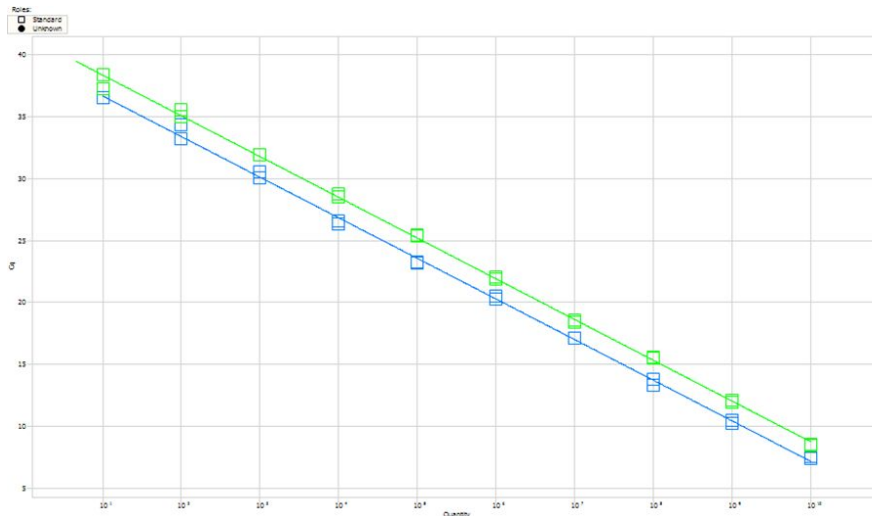
(1) 肝外胆管癌は近年の治療の進歩にもかかわらず、5年生存率は低いままである。肝外胆管癌の診断のため胆管擦過細胞診や胆汁細胞診が使用されるが、検査として特異度は高いが、感度は低い。その理由として、胆管擦過細胞や胆汁細胞診検体は容易に変性するため詳細な形態観察による良悪性の鑑別が困難な例が多いためと考えられる。

(2) microRNA は、18~23 塩基の非コード RNA であり、特定の mRNA の翻訳を調節し、腫瘍においては様々な役割を果たすことが知られており、microRNA がいくつかのがんの早期診断マーカーの候補であることが示されている。

一部の microRNA は、肝外胆管癌組織及び細胞株を用いた研究で肝外胆管癌の診断バイオマーカーや予後予測因子として報告されているが細胞診検体を用いた解析は殆どない。

2. 研究の目的

本研究では胆汁細胞診検体を用いて microRNA を定量的に解析し、良悪性の鑑別に有用な新規マーカーを選定し胆汁細胞診の精度を向上出来るか検討することが目的である。



3. 研究の方法

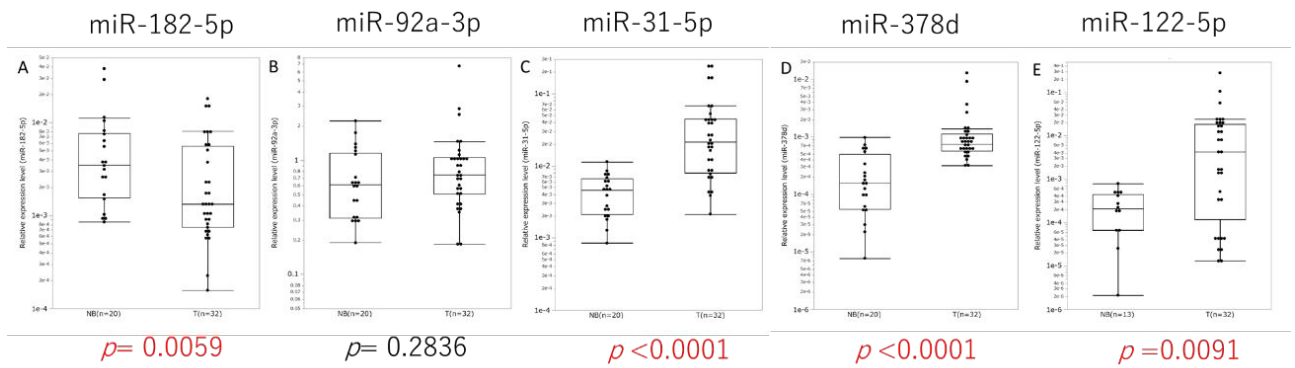
既報及び The Cancer Genome Atlas (TCGA) において胆管癌に関して報告されている microRNA の中から miR-182-5p、miR-31-5p、miR-122-5p、miR-92a-3p、miR-378d の 5 つの microRNA を選択し、検討を行った。組織検体、細胞診検体から total RNA を抽出し、qRT-PCR 法により各 microRNA と U6 small nuclear RNA の custom primer を用いてコピー数の定量的解析を行った。

組織検体は本学で切除された肝外胆管癌 32 例の腫瘍組織と 20 例の正常胆管組織を対象とした。細胞診検体は本学で採取された胆管擦過細胞診あるいは胆汁細胞診検体を用い、40 例の標本作製後残余沈渣凍結検体と 84 例のプレパレート標本から細胞を剥離した検体を対象とした。各 microRNA の発現と細胞診判定及び病理診断との関係について検討をした。

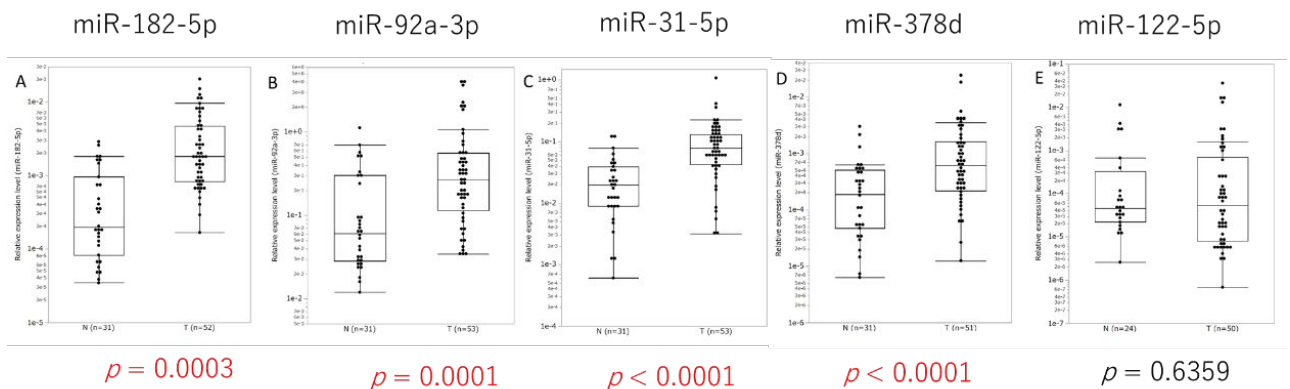
4. 研究成果

(1) miR-31-5p、miR-122-5p、miR-378d は胆管癌組織において正常組織よりも有意に高発現であった (miR-31-5p: $P < 0.001$, miR-122-5p: $P < 0.001$, miR-378d: $P = 0.009$)。一方、miR-182-5p は胆

管癌組織で有意に低発現であった ($P=0.006$)。miR-92a-3p は胆管癌と正常組織で有意差はなかった ($P=0.2836$)。



(2) 細胞診プレパラート標本から剥離した細胞で、病理診断が胆管癌であった 53 例と良性疾患であった 31 例の各 microRNA の発現量を比較すると、細胞診判定に関係なく miR-31-5p、miR-182-5p、miR-378d、miR-92a-3p が良性症例より胆管癌症例で有意に高発現であった (miR-31-5p: $P<0.001$, miR-182-5p: $P<0.001$, miR-378d: $P<0.001$, miR-92a-3p: $P<0.001$)。miR-122-5p は有意差を示さなかった。



(3) ROC 解析では miR-182-5p 単独が他の microRNA や miR-182-5p と miR-31-5p の組み合わせとと比較して感度が高かった (miR-31-5p: AUC =0.82 ,感度=73.6%, miR-182-5p: AUC =0.86,感度=94.2%, miR-378d: AUC =0.74,感度=51.0%, miR-92a-3p: AUC =0.75,感度=77.4%, miR-122-5p: AUC=0.47, 感度=48.0%, miR-31-5p&miR-182-5p: AUC =0.88,感度=73.1%)。細胞診と比較して miR-182-5p の感度及び特異度が共に最も高かった。(細胞診:感度=41.5%,特異度=64.5%, miR-182-5p:感度=94.2%,特異度=67.8%)。

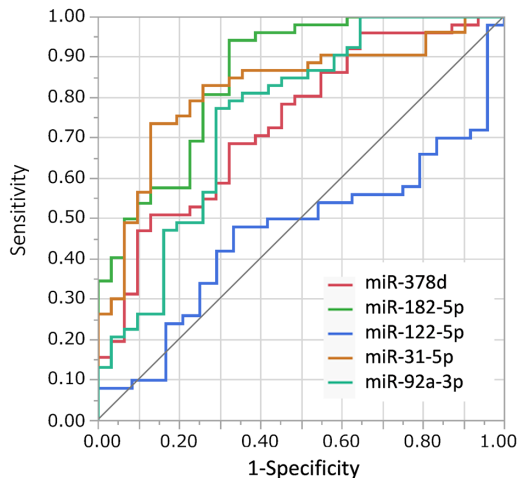
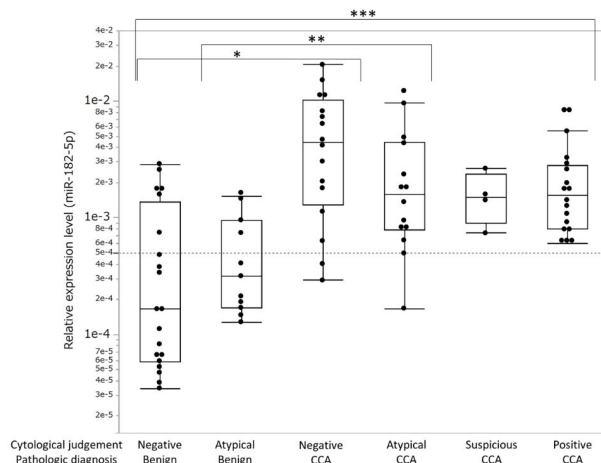


Table. Diagnostic utility of microRNA markers in bile

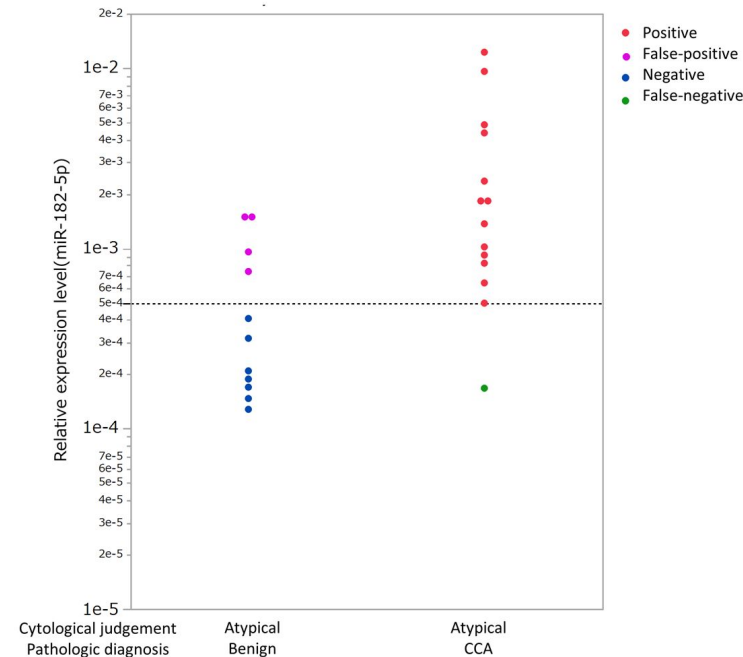
	Sensitivity(%)	Specificity (%)	AUC
cytology diagnosis	41.5	64.5	
miR-31-5p	73.6	87.1	0.82
miR-182-5p	94.2	67.8	0.86
miR-378d	51.0	87.1	0.74
miR-92a-3p	77.4	71.0	0.75
miR-122-5p	48.0	66.8	0.47

(4) miR-182-5p の発現量は細胞診判定と有意に相関した。(スピアマン順位相関係数: 0.45; $P < 0.001$)。



(5) 細胞診で Atypical と判定された 26 例のうち組織学的に胆管癌と診断された 15 例と良性疾患の 11 例では、胆管癌症例で miR-182-5p が有意に高発現であった。

性疾患の 11 例では、胆管癌症例で miR-182-5p が有意に高発現であった。



細胞診標本作製後の残余沈渣を用いて同様に 5 つの microRNA の発現量の解析も行った。miR-182-5p の発現量は 23 例の病理診断が良性疾患の症例より 17 例の病理診断が胆管癌の症例で有意に高値であった ($P=0.008$)。他の 4 つの microRNA では有意差を認めなかった(miR-31-5p: $P=0.266$, miR-378d: $P=0.508$, miR-92a-3p: $P=0.061$, miR-122-5p: $P=0.692$)。以上の結果より本研究は胆管細胞診標本の補助判定として microRNA

の発現を解析し、miR-182-5p の発現が細胞診で Atypical と診断された悪性例と良性例を区別できることを示した。

(6) 凍結組織を対象として解析した miR-182-5p の発現レベルは、細胞診検体の結果とは異なった。この原因としては、組織検体は上皮細胞、炎症細胞、間質細胞、内皮細胞などの様々な細胞を含むが、胆汁細胞診プレパレート検体では、主として上皮細胞と炎症細胞であり、含有細胞の違いが microRNA の発現量の違いに関与したと考えた。肝外胆管癌における miR-182-5p の発現レベルと機能に関する報告はない。また肝外胆管癌患者の胆管擦過により採取された塗抹細胞診標本から剥離された細胞検体中の microRNA に関する報告もない。本研究では、良性疾患の患者と比較して肝外胆管癌患者の胆汁細胞診検体でいくつかの microRNA の発現レベルが高かった。これらの結果は、胆汁細胞診標本における microRNA の定量的解析が、客観的な診断補助として有用である可能性を示唆している。塗抹標本を使用すると、プレパレートから細胞を剥離する工程が必要になるため、作業が増加するが、検鏡で細胞を観察出来ることが最大の長所である。また、塗抹標本をすぐに 95% アルコールで固定し、封入できるため検体の空気暴露を防ぎ、RNA の分解を抑

制できると推定される。胆汁中の RNA を高品質のまま維持するための最適な処理法や保存法については、更に検討する必要がある。

本研究の限界は、microRNA の診断に対する有用性を評価するには検体数が不十分であったので、症例数を増やし大規模な研究を実施する必要がある。多くの細胞診検体から microRNA を抽出し、複数の microRNA の定量解析を臨床応用するためには、自動検査システムを構築し、より簡便な方法の開発が望まれる。

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 Uchihata Yukari, Arihiro Koji, Kaneko Yoshie, Shimizu Tomomi, Marubashi Yukari, Aoki Chie, Murakami Takuya, Ochi Mayu, Niihara Nanaka, Ohtsuka Kohei, Unehara Rimu, Araki Yusuke, Seki Yoshinaga, Mori Keiichi, Oda Miyo, Ishida Katsunari	4. 巻 2022 Feb 14;aqac015
2. 論文標題 Analysis of MicroRNA in Bile Cytologic Samples Is Useful for Detection and Diagnosis of Extrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ajcp/aqac015	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 Araki Yusuke, Arihiro Koji, Yamaguchi Kakuhiro, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Masuda Takeshi, Miyamoto Shintaro, Nakashima Taku, Iwamoto Hiroshi, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Hattori Noboru	4. 巻 156
2. 論文標題 Analysis of microRNA Expression in Liquid-Based Cytology Samples May Be Useful for Primary Lung Cancer Diagnosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 644 ~ 652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ajcp/aqaa278	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内島由加里, 有廣光司, 新原菜香, 村上拓也, 越智真悠, 青木知恵, 丸橋由加里, 清水智美, 金子佳恵, 石田克成, 尾田三世, 森馨一, 織田麻琴, 城間紀之
2. 発表標題 胆汁細胞診の精度向上のためにmicroRNAの検索は臨床応用可能か？
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 織田麻琴, 有廣光司, 城間紀之, 森馨一, 尾田三世, 石田克成, 高井チカ子, 金子佳恵, 清水智美, 丸橋由加里, 青木知恵, 越智真悠, 内島由加里, 村上拓也, 新原菜香
2. 発表標題 膵臓の超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診検体を対象としたmicroRNA検索の試み
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内畠由加里, 有廣光司, 新原菜香, 村上拓也, 越智真悠, 青木知恵, 丸橋由加里, 清水智美, 金子佳恵, 石田克成, 尾田三世, 森馨一, 織田麻琴, 城間紀之
2. 発表標題 胆汁細胞診におけるmicroRNA検索の有用性
3. 学会等名 第34回日本臨床細胞学会中国四国連合会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔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	城間 紀之 (Shiroma Noriyuki) (30634927)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	
研究分担者	織田 麻琴 (Orita Makoto) (50814331)	広島大学・病院(医)・歯科診療医 (15401)	
研究分担者	内畠 由加里 (Uchihata Yukari) (60816338)	広島大学・病院(医)・臨床検査技師 (15401)	
研究分担者	鈴木 賢一 (Suzuki Ken-ichi) (90363043)	広島大学・基礎生物学研究所新規モデル生物開発センター・特任准教授 (15401)	
研究分担者	石田 克成 (Ishida Katsunari) (80769894)	広島大学・病院診療支援部・部門長 (15401)	

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