

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20826

研究課題名（和文）膵・胆道癌の早期診断を目指したバイオマーカーの検索と臨床応用

研究課題名（英文）Biomarker search and clinical application for early diagnosis of pancreatic and biliary tract cancer

研究代表者

中村 聡（NAKAMURA, So）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90965237

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌の低侵襲な検出方法の開発を目指して十二指腸液中のエクソソームに内包されているmiRNAに着目し、超遠心法で十二指腸液からエクソソームを抽出して、その存在を電子顕微鏡およびnanoparticle tracking analysis, western blotting法で確認した。複数の膵癌細胞株と正常膵管上皮細胞株から分泌されたエクソソームのmiRNAの発現解析からmiRNA-20aを有用なマーカーとして同定し、臨床検体での解析を行い、膵癌患者の十二指腸液中エクソソームからmiRNA-20aがコントロール群よりも発現が高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十二指腸液中にexosomeを同定し、安定性を示すことができれば、ex-miRなどの内包される分子は有望なバイオマーカーとなる可能性がある。さらには、同定した十二指腸液中バイオマーカーを血液サンプルにフィードバックさせることで、膵・胆道癌の新たなスクリーニング法の開発につながる可能性が高い。本研究により膵・胆道癌の早期診断を可能とすることは、予後を大幅に改善することにつながり、社会的貢献度、緊急度は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Using the modified protocol which was invented for exosome extraction from pancreatic juice, exosome was extracted from DF and confirmed the presence by electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and western blotting analysis of exosome-surface markers. We then determined mi-RNA-20a as an exosomal-miRNA for PDAC detection based on the expression analysis of miRNA using exosome released from pancreatic cancer cell lines and a normal pancreatic epithelial cell line. We collected duodenal fluid from PDAC patients and those with benign diseases, and expression of exosomal mi-RNA-20a was significantly higher in PDAC patients compared to those with benign diseases. AUC comparing exosome; miRNA-20a in DF from PDAC patients and controls was 0.85, indicating sufficient diagnostic ability of the test.

研究分野：医歯薬学

キーワード：十二指腸液 細胞外小胞 microRNA 膵癌 早期診断

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵・胆道癌は臨床症状に乏しく、発見時には根治切除不能な状態となっていることが多い。そのため早期診断のためのスクリーニング法の開発が急務である。近年、体液を用いた liquid biopsy が注目され、特に体液中の exosome に関する報告が増えてきている。Exosome とは、癌細胞を含む全ての細胞から分泌される直径 50-100nm ほどの脂質二重膜で構成される小胞で、exosome に内包される蛋白質や核酸は、RNase や DNase から保護されているため、体液中においても安定して存在するといわれている。特に、Exosome 内の microRNA (ex-miR) は、様々な癌腫のバイオマーカーとして報告が相次ぎ、膵癌においても注目度が高い (Que et al, World J Surg Oncol, 2013 / Madhavan et al, Int J Cancer, 2015)。しかし、その多くは血液サンプルを用いた報告であり、血液中の exosome は様々な臓器由来のものが混在していると予想され、膵・胆道癌に特異的な分子が反映されているか判断が難しい。膵癌、胆道癌はそれぞれ膵管上皮、胆管上皮由来の腫瘍であると考えられており、腫瘍と直接接触している膵液および胆汁中には末梢血と比較して癌細胞由来の分子が豊富に含まれる可能性が高い。十二指腸液は膵液および胆汁が混在し、比較的簡便に採取できるが、強力な消化液であるがゆえに分子マーカーにとっては過酷な環境であると考えられてきた。しかし、十二指腸液中に exosome を同定し、安定性を示すことができれば、ex-miR などの内包される分子は有望なバイオマーカーとなる可能性がある。さらには、同定した十二指腸液中バイオマーカーを血液サンプルにフィードバックさせることで、膵・胆道癌の新たなスクリーニング法の開発につながる可能性が高い。本研究により膵・胆道癌の早期診断を可能とすることは、予後を大幅に改善することにつながり、社会的貢献度、緊急度は高いと考える。

### 2. 研究の目的

胆汁中および膵液中に exosome が安定して存在することは報告されているが、胆汁と膵液が混在する十二指腸液中には exosome の存在はまだ報告が少ない。胆汁と膵液は混在することで消化酵素が活性化し強力な消化能を得るため、十二指腸液中に安定した分子マーカーを検索することは困難と考えられてきた。しかし、当研究室では十二指腸液中から exosome の抽出に成功し、さらに十二指腸液中の ex-miR の安定性も証明することができた。次なる目的・目標は十二指腸液中 exosome に内包される分子を解析することで膵・胆道癌に特異的なバイオマーカーを同定し、同定した分子を血液中 exosome と対比させることでスクリーニングとしての可能性を評価することである。

### 3. 研究の方法

#### A. 十二指腸液中 exosome の抽出プロトコルの開発

十二指腸液中から超遠心法を用いて小胞を抽出し、電子顕微鏡およびナノ粒子トラッキング解析で小胞の大きさおよび数を確認する。さらに exosome 特有の膜蛋白 (CD63、CD81、TSG101 など) をウエスタンブロットで確認して小胞が exosome であることを証明する。また、超遠心法の条件を調整し、十二指腸液中 exosome を効率よく回収できるプロトコルを開発する。

#### B. 十二指腸液中 ex-miR の安定性の評価、候補 ex-miR の検索

十二指腸液を室温に放置、あるいは incubate してサンプル中の ex-miR を経時的に測定し、ex-miR の安定性を評価する。安定性が実証できれば、つぎに膵癌あるいは胆道癌患者と健常人の十二指腸液中 ex-miR をマイクロアレイ解析し、候補となる ex-miR をリストアップする。さらに、より大きなコホートで validation を行い、候補 ex-miR の診断能を評価し、既存のバイオマーカーである血中 CA19-9 などとの比較を行う。

#### 4. 研究成果

##### A. 十二指腸液からのエクソソーム抽出

膵癌患者と良性疾患患者から十二指腸液を採取し、超遠心法でエクソソームの抽出を行った。以前われわれが膵液からエクソソームを抽出したプロトコルよりも超遠心時間を延長することで十二指腸液中の介在物の排除をおこない、その存在を電子顕微鏡およびnanoparticle tracking analysis, western blotting法で確認した。

##### B. 膵癌診断を目的としたマーカー探索と臨床検体を用いた miRNA 発現解析

複数の膵癌細胞株と正常膵管上皮細胞株から分泌されたエクソソームの miRNA の発現解析から miRNA-20a

を有用なマーカーと

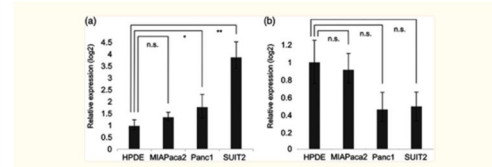


FIGURE 3

Comparison of microRNAs in extracellular vesicles (EV-miR)-20a expression in various cancer cell lines. (a) Comparisons of the expression of EV-miR-20a in human pancreatic duct epithelial cells (HPDE), MIA-Paca2, Panc1, and SUI2 revealed an increase in EV-miR-20a in MIA-Paca2, Panc1, and SUI2 when compared to HPDE samples. \* $p = 0.03$ , \*\* $p = 0.006$ . Wilcoxon signed-rank test was used. n.s., not significant. (b) Expression of EV-miR-21 in HPDE, Panc1, MIA-Paca2, and SUI2. No significant differences were observed between these groups.

図 1. miRNA-20a は正常膵管上皮よりも膵癌細胞株由来のエクソソームにおいて発現が高い(図, 左). コントロールとして採用した miRNA21 の発現に有意な差は認めなかった。

として同定し(図 1), 臨床検体での解析を行ったところ, 膵癌のステージ, 発生部位による影響を受けることなく, 膵癌患者の十二指腸液中エクソソームから miRNA-20a がコントロール群よりも発現が高いことが明らかとなり(図 2), 無症状の患者にも適応できる膵癌早期診断の新たな方法として期待できることが示唆された。以上の結果は 2023 年に論文発表を行った (Taniguchi T, Nakamura S, et al. DEN open. 2023)

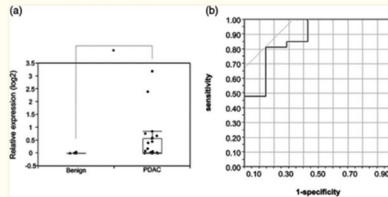


FIGURE 4

Comparison of microRNAs in extracellular vesicles (EV-miR)-20a expression in 22 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and seven control samples. (a) Relative expression levels of EV-miR-20a in the duodenal fluid were significantly higher in PDAC patients than in the control. \* $p = 0.006$ . Wilcoxon signed-rank test was used. (b) ROC curve for EV-miR-20a expression in PDAC samples producing an AUC value of 0.85. ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under the curve.

図 2. miRNA-20a は膵癌患者において良性疾患群よりも十二指腸液エクソソームに高発現していた。本検査は AUC=0.85 と十分な診断能を有している。

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 1件）

1. 著者名 Taniguchi Takashi, Ideno Noboru, Araki Tomoyuki, Miura Shun, Yamamoto Masahiro, Nakafusa Tomoki, Higashijima Nobuhiro, Yamamoto Takeo, Tamura Koji, Nakamura So, Abe Toshiya, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Ohtsuka Takao, Nakamura Masafumi	4. 巻 4
2. 論文標題 MicroRNA 20a in extracellular vesicles derived from duodenal fluid is a possible biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DEN Open	6. 最初と最後の頁 333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/deo2.333	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中房 智樹
2. 発表標題 膵液・十二指腸液中 Exosomal miRNA 発現解析による膵癌診断のためのバイオマーカー開発
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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