

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800006

研究課題名(和文) 血中 anti-sense 解析による膵がんの早期診断と層別化治療の開発・研究

研究課題名(英文) Analysis of functional RNAs in the blood streams of pancreatic cancer patients

研究代表者

榎本 剛史 (ENOMOTO, Tsuyoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10628762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：膵がんは非常に予後の悪い疾患で根治的な治療法は手術しかない。膵がんの治療成績を上げる最良の方法は早期診断法の確立である。血清中には腫瘍から200nm程度の微小なカプセルであるエクソソームが流出し、その中のmicro RNAが注目されている。健常人と膵がん患者の血清からエクソソームの抽出に成功した。エクソソームからRNAを回収し、micro RNAのマイクロアレイを行った。得られたデータから健常人と膵がん患者の層別化の解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the most miserable cancers and the radical treatment is curative resection. To improve the prognosis of pancreatic cancer is to diagnosis in early stage. Micro RNAs are incorporated in exosomes from cancer into blood. We analyzed blood serum from pancreatic cancer patients and healthy volunteers. We collected exosomal micro RNAs and performed microarray analysis. Most of the micro RNAs were down regulated in pancreatic cancer patients.

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：膵癌 エクソソーム micro RNA

## 1. 研究開始当初の背景

平成 19 年度厚生労働省人口動態調査では膵臓癌による死亡は 24634 人であり、部位別癌死亡数は男女とも第 5 位と年々増加している。しかし通常型膵臓癌の平均生存月数は 10 か月、5 年生存率は 11.6%と治療成績は極めて不良である。唯一の根治を得る手段は、外科的に病巣を切除すること以外にはない。しかし診断された時点で手術を受けることが可能な患者の割合は約 20%程度でしかなく、多くの患者さんは発見された段階で根治手術の可能性がない進行した状態で発見されている。現在、膵臓癌が根治できる新たな治療法の開発が難渋しているため、唯一の根治的治療法を受ける機会を多くすることも治療成績改善に寄与すると考えられる。従って早期診断が可能なモダリティの開発は急務である。

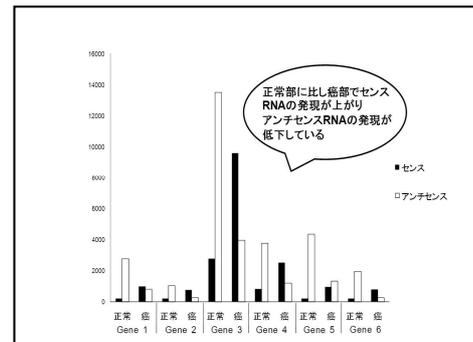
従来膵臓癌の診断には US、CT などの画像診断法、CA19-9、Span-1、Dupan-2、Erastase-1 などの血清学的な診断法があるが、いずれの方法においても早期に膵臓癌を検出可能な精度に至っていない。膵臓癌早期診断のためには簡便で、鋭敏かつ特異度の高いバイオマーカーの開発が必要である。

近年、DNA からメッセンジャーRNA の転写が起きる際、タンパク質の翻訳に関係のない機能性 RNA が多く作られていることが明らかになっている。その一つがアンチセンス RNA で、約 70%の遺伝子においてメッセンジャーRNA の転写の際にその相補的な RNA であるアンチセンス RNA が同時に転写されていることが明らかになった。また、癌抑制遺伝子である p15 のアンチセンス RNA が発癌の制御に関与していることが報告されており (Yu W et al, *Nature* 2008)、癌の研究においてアンチセンス RNA がにわかに脚光を浴びている。

我々はこのアンチセンス RNA に着目し、

2010 年に世界で初めて大腸癌のアンチセンス RNA を網羅的に解析し報告した (図 1 Kohno et al, *Int J Oncol* 2010)。

図 1.大腸癌組織におけるマイクロアレイによるセンス/アンチセンス RNA 発現量の解析



また血液に含まれる 200~300nm の直径を有するエクソソームが近年注目されている。エクソソームは癌組織から遊離して、癌の情報を保有している可能性が示唆されている。また、酸や RNase にも耐えるため、血清から回収して解析することが可能である。エクソソームには機能的 RNA の一種である micro RNA が存在することが報告されている。

## 2. 研究の目的

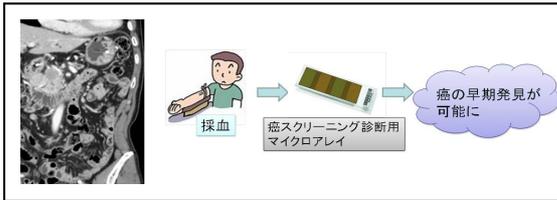
アンチセンス RNA や micro RNA などの機能的 RNA は消化器癌の癌化や進展において、DNA の修飾や mRNA をコントロールしていると考えられ、それらの変化が血液中でも鋭敏にとらえることが可能となってきた。そこで末梢血中において、より早期膵臓癌の段階で鋭敏に癌の分化度や進展度を反映する特異的なバイオマーカーとしてのアンチセンス RNA を基礎的実験で特定することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

筑波大学附属病院において、膵臓癌根治切除術手術予定の患者さんを対象に、同意を得た上で末梢血を採取する。

採取した末梢血からエクソソームを抽出し、micro RNA のマイクロアレイを行う。膵臓癌患者と対照健常人の micro RNA のプロファイリングを行い、患者の層別化や、血液による膵臓癌の早期診断が可能か検討する(図2)。

図2.研究方法



#### 4. 研究成果

膵臓癌患者 10 例と対照健常人 4 例の血清からエクソソームを抽出した。

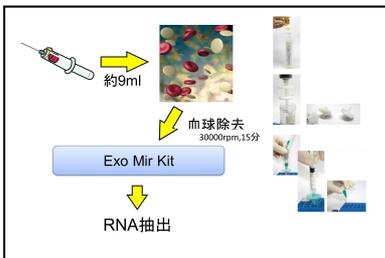
患者のプロフィールは以下のとおりである(図3)。

図3.プロフィール

Characteristics	大腸癌患者(n=10)
Gender (M/F)	6/4
Median age	71(61-83)
Organ of tumor	
head	9
body	1
UICC stage	
1	0
2	8
3	2
4	0

抽出方法は Exo mir のプロトコールに従った(図4)。

図4.プロトコール

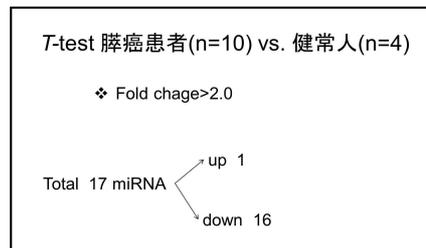


エクソソーム RNAをバイオアナライザ (Agilent Technologies社)によりmicro RNA の存在を確認する。血清エクソソーム中の

RNAは微量であるため、そのままではマイクロアレイ解析を行うことができない。そこで、Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN 社)を使用して血清エクソソーム RNA を増幅する。増幅された RNA を Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies 社)を使用して Cy3 蛍光色素を標識した cDNAを合成する。Micro RNAの発現をAgilent社のmicro RNA用のマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、膵臓癌に関連して特異的に発現が変化する血清エクソソーム中のmicro RNA を同定した。

膵臓癌と対照健常人の間で2倍以上の変異を有するmicro RNAは図5の通りである。

図5. fold change 2倍以上のmicro RNA



残念ながらほとんどの micro RNA が膵臓癌で低下していた。さらに膵臓癌患者と対照健常人のクラスター解析を行ったが、今回の検討では両者を層別することが出来なかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎本 剛史 (ENOMOTO, Tsuyoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10628762