

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890018

研究課題名(和文) 血漿中のIPMN関連miRNAを指標とした早期膵癌診断法の開発

研究課題名(英文) Malignant potential in intraductal papillary mucinous neoplasm : new insight provided Plasma microRNA

研究代表者

森村 玲 (Morimura, Ryo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70448736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、膵癌患者の血漿中遊離micro RNA (miR) を指標とした、早期診断を可能とする新規バイオマーカーの探索を行ってきた。膵管内乳頭粘液腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN) は、予後不良な膵悪性腫瘍の中で、腺腫から腺癌に緩徐に進行し早期の治療介入による予後の改善が期待しやすいと考えられている。今回、網羅的アレイ解析により、IPMN悪性化の有望なバイオマーカー候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) is an important type of tumor in pancreatic cancers which has one of the most poor prognosis, because it shows comparatively slow malignant progression from adenoma to carcinoma and patients could expect rather a good prognosis in early stage. However, it remains difficult to determine the surgical indication of a IPMN because the current pre-operative examination which relies on mainly imaging technology is not perfect. In the course of the microRNA array-based approaches to compare plasma microRNA levels of patients having pancreatic tumor, we identified novel plasma microRNAs for cancer detection and monitoring tumor dynamics. Using large-scale cohort, we validated that levels of miR-223 was significantly higher in pancreatic cancer patients than age-matched healthy volunteers. Interestingly high expression of miR-223 in plasma significantly related early stage pancreatic tumor including IPMNs.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：膵管内乳頭粘液腫瘍 microRNA マイクロアレイ バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

micro RNA(miRNA, miR)は約 20 塩基程度の短鎖 RNA であり、核内で前駆体として転写された後、RNA ポリメラーゼによる切断などを経て細胞質で成熟型となる。成熟型 miRNA は、標的配列を有する mRNA の 3'-UTR 領域に結合し、その mRNA の分解や転写の抑制により、発現を負に制御する事が知られている。これらの miRNA 群は正常細胞において恒常性の維持などに重要な役割を果たすが、癌を含む多くの疾患においても、その発現異常が病態の形成に深く関わる事が知られてきた。また miRNA に関しては細胞内だけでなく、多くの体液中(血漿、尿、母乳など)にも比較的安定した形で存在し、その安定性に Ago2 などのタンパクとの結合(Arroyo JD et al., 2011, PNAS)やエクソソームなどの小胞への埋包が関係する(Kosaka N et al., 2010, Cancer Science)事が報告されている。癌においては、血中 miRNA もその病態や予後と関係する事が知られ、biomarker としての報告が散見される。申請者らは、膵癌組織における変化が報告されている miR-18a、miR-221 に着目し、膵癌患者の組織、術前・後の血漿中の両 miRNA 量を real-time RT-PCR 法で検討した。その結果、膵癌患者において血漿中の両 miRNA が、その存在診断や腫瘍動態のモニタリングに極めて有用であり、次世代バイオマーカーとなり得る事を示した(Morimura R et al., 2010, BJC, Kawaguchi T et al., 2013, BJC)。血漿中 miR-18a は、健常者に比較して膵癌患者の術前血漿中で高く、また多くの膵癌患者で術後に有意な低下を示した。同様に血漿中 miR-221 でも術前膵癌患者で有意に高いことを報告している。

2. 研究の目的

しかし、これらのデータはすべて進行膵癌患者のものであり、膵癌の早期発見の biomarker には十分ではないと考える。今回着目した膵 IPMN は、その経過の中で徐々に異型度・悪性度を増し、上皮内がんを経て浸潤癌へと発育する事が知られている。そこで本研究では、膵癌の前駆病変と

考えられている膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)患者の組織・血漿を用いて、申請者らが進行膵癌の解析に用いたのと同様の手法で膵癌の早期診断につながる新規 biomarker 候補の開発を試みる。

早期癌の根治治療が可能になりつつある今日、より早期に癌を診断することの重要性が再認識されてきている。従来の多くの研究では、より進行した膵癌を対象として扱ってきたが、膵癌は非常に進行が早い事が知られており、その早期診断には前癌段階からの悪性化の解明がより重要であると考えられる。このため、IPMN の悪性化を指標として、膵癌への進展やその早期診断に関わる miRNA を同定できれば、有用な血漿 biomarker となる事はもちろん、癌化のメカニズムを解明できる可能性も高まり、その意義は極めて大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) IPMN 患者血漿中の miRNA 解析

IPMN 患者と健常人の術前血漿を用いて、miRNA microarray による解析を行う事で、健常人と比べ血漿中で増加または低下する miRNA を同定し、IPMN の新たな biomarker 候補を抽出する。

具体的には、切除後に腺腫(軽度あるいは高度異型)あるいは上皮内癌と病理学的に診断のついた患者の術前血漿を用いて、total RNA の抽出を行う。その後、microarray 解析を行い健常人と比べ血漿中で顕著な差を認める miRNA を候補マーカーとして選出する。

(2) IPMN 組織の異型度別の miRNA 解析

microarray 解析で候補として選出した miRNA に関して、血漿中と同様に組織においても段階的に発現上昇あるいは低下している miRNA を明らかにする。

方法としては腫瘍部分のパラフィン包埋組織から、RNA 抽出キット(Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)

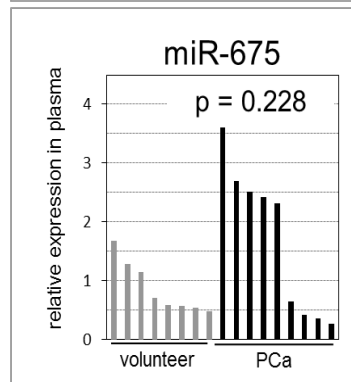
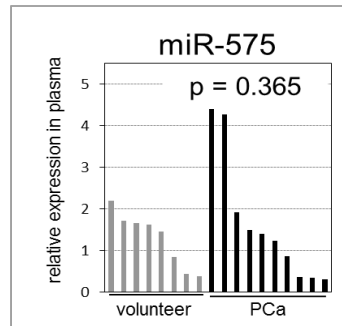
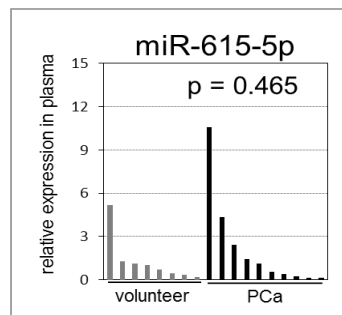
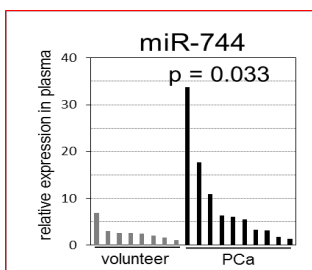
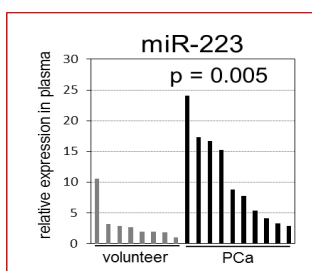
を用いて total RNA の抽出を行い、real-time RT-PCR 法により候補 miRNA の発現解析を行う。

(3)患者血漿中の候補 miRNA による腫瘍動態評価の確認

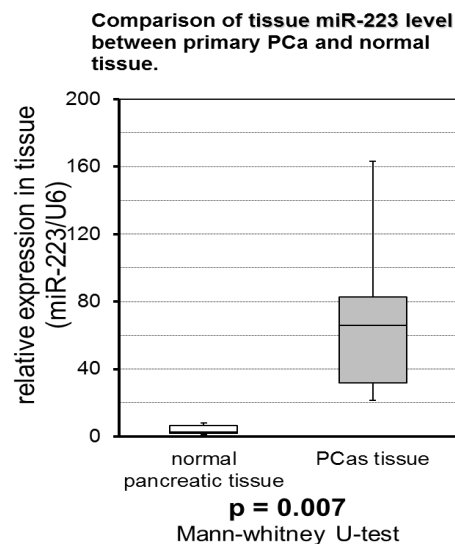
実際の患者検体において、新たな biomarker の候補 miRNA 量を RT-PCR 法を用いて測定し、その有用性を評価する。具体的には手術を施行した IPMN 患者（腺腫、上皮内癌あるいは浸潤癌）と健常人の血漿中の miRNA 量を比較し、候補 miRNA の臨床的な有用性を評価する。

4. 研究成果

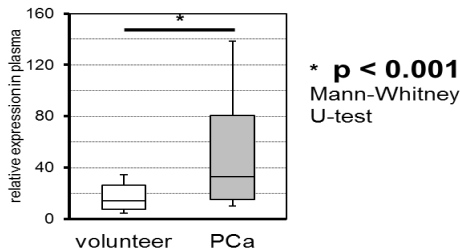
2010 年から 2013 年に治療を行った膵癌と膵管内乳頭粘液腫瘍患者 71 症例を用いた。また、対照として 68 例の健常人血漿を用いた。TORAY の 3D-GENE miRNA microarray TORAY による解析によって非担癌患者群と比して膵癌、膵乳頭粘液腫瘍患者 (IPMN) 群の血漿中で上昇している microRNA 群を選出した。Validation 解析は TaqMan assay を用いた。その結果、網羅的アレイ解析では、miR-223、575、615-5p、675、744 の 5 候補が選出され、更に TaqMan assay による test scale 解析で miR-223、744 が選出された。



膵癌、膵 IPMN の組織中の miR-223 レベルは正常組織と比べ有意に発現上昇を認めていた (p=0.0069)。

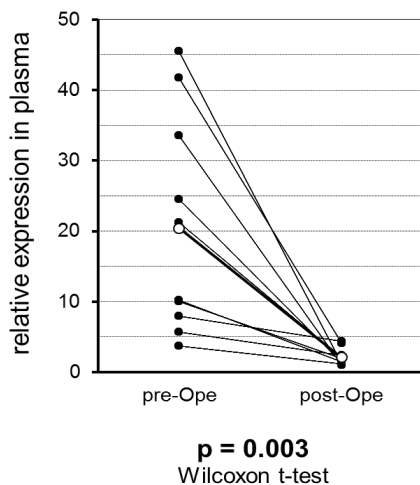


Validation 解析でも、miR-223 は健常人血漿比して有意な発現上昇を認めた ($p < 0.0001$)。

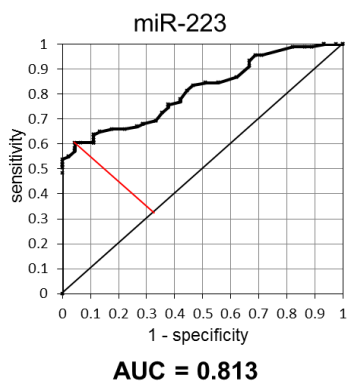


術前血漿中 miR-223 高発現患者群の術後の血漿中濃度は有意に低下していた ($p = 0.0297$)。

Comparison of plasma miR-223 level between pre -and post-operative samples in PCa patients

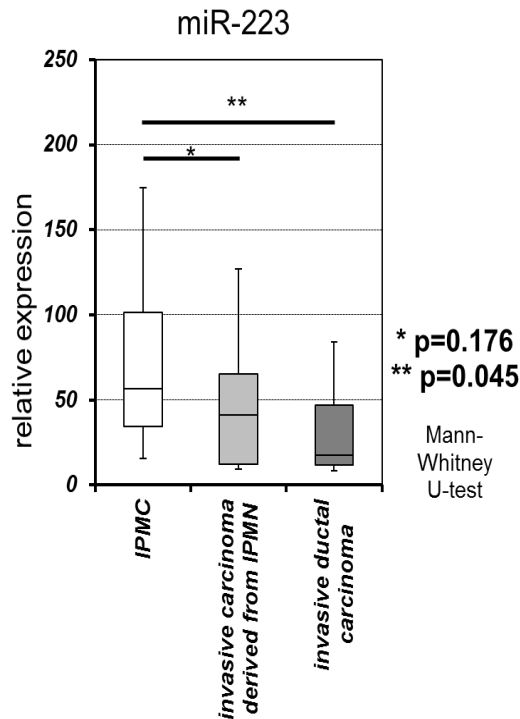


ROC 曲線を用いた解析では AUC 値は 0.81 であった。



If cut off value is 40, Yonden index becomes maximum

血漿中 miR-223 レベルは IPMN の悪性化するにつれて高くなる傾向にあった ($p = 0.0963$)。



血漿中 miR-223 を測定することで、膵 IPMN の悪性を予測することが可能である。

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 1 件)

Malignant potential in pancreatic neoplasm; new insights provided by circulating miR-223 in plasma

Shuhei Komatsu, Daisuke Ichikawa, Mahito

Miyamae, Tsutomu Kawaguchi,

Ryo Morimura, Shoji Hirajima, Wataru

Okajima, Takuma Ohashi,

Taisuke Imamura, Hiroataka Konishi,

Atsushi Shiozaki, Hisashi Ikoma,

Kazuma Okamoto, Hiroki Taniguchi & Eigo

Otsuji

Expert Opin Biol Ther. 2015 Mar 30:1-13.

査読 有

[学会発表] (計 3 件)

森村 玲

第 114 回日本外科学会定期学術集会

2014 年 4 月 5 日 京都国際会議場

膵癌のバイオマーカーとしての microRNA

の臨床応用

宮前 真人

第 114 回日本外科学会定期学術集会

2014 年 4 月 5 日 京都国際会議場

網羅的アレイ解析により同定した膵癌患者血漿中遊離 microRNA-223 および microRNA-744 の有用性

Masato Miyamae

American College of Surgeons 2014

October 26-30, 2014 San Francisco, USA

Plasma microRNA profiles: Identification of miR-223 and miR-744 as a novel plasma biomarker in pancreatic adenocarcinoma.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森村 玲 (Morimura, Ryo)

京都府立医科大学・医学研究科・消化器外科
助教

研究者番号：70448736

(2) 研究協力者

宮前 真人 (Masato, Miyamae)

京都府立医科大学大学院・医学研究科・消化器外科学