

膵癌に対する化学放射線療法の効果予測に応用可能な血清 miRNA マーカーの探索

名古屋大学医学部附属病院 消化器外科 2 助教 園原史訓

名古屋大学大学院医学系研究科 消化器外科学 助教 林 真路

名古屋大学大学院医学系研究科 消化器外科学 講師 山田 豪

1. 研究の背景・目的

膵癌はしばしば進行した状態で発見され、70～80%の症例が診断時に手術不能である。現在の局所進行切除不能膵癌あるいは切除境界膵癌に対する治療戦略は、化学療法あるいは化学放射線療(CRT)を施行した後に、根治手術を検討することである(Unno et al., 2019)。この戦略過程において、CRT が奏功する群と群を治療前に識別することは、膵癌個別化医療への最も有効な手段の一つである。Non-coding RNA の一種である micro RNA (miRNA)は体液中にも多種含まれ、定量 RT-PCR(qPCR)法により検出可能である。我々はこれまでに血清検体の microarray 解析によって、数種の血中 miRNA が食道扁平上皮癌(ESCC)の術前補助化学療法効果予測バイオマーカーとしての意義を有することを発見した(Niwa et al., 2019)。また、各種細胞から分泌される小胞体的一种である exosome は細胞間の情報伝達に関わるとされ、miRNA を含む各種 RNA を内包している。膵癌の進展・転移には癌細胞の上皮間葉転移が大きく関わっており、化学(放射線)療法に対する感受性にも関係するとされている(Kuwada et al., 2018)。

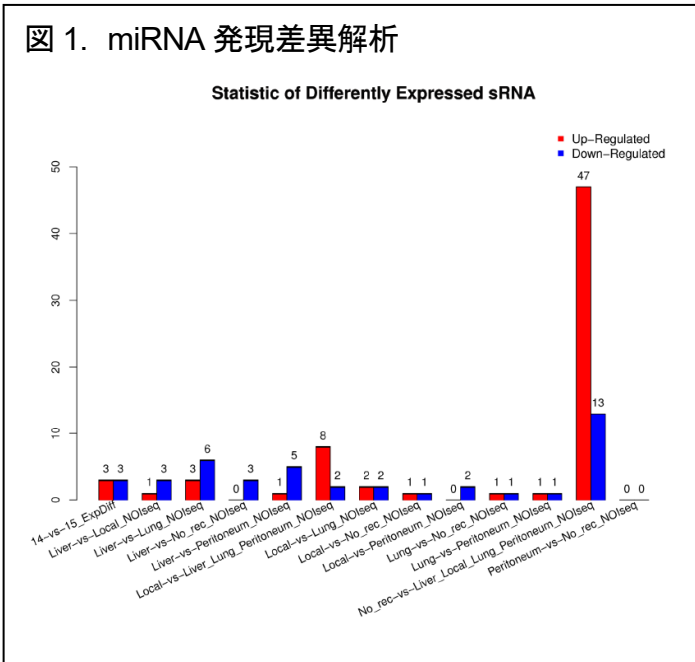
膵癌は後腹膜に位置する実質臓器であり、手術前組織検体の入手が胃癌、大腸癌など他の消化管癌と比較して困難である。また、依然として予後の不良な癌であり、予後改善のためには適切な治療対象群の抽出が必要不可欠である。よって、手術前の CRT を含む術前治療に対する治療効果を血液中の miRNA マーカーをもとに事前に予測することを目的として本研究を立案した。

2. 研究の対象ならびに方法

- 1) 膵癌細胞株を培養し、培養液に含まれる exosome を抽出し、電子顕微鏡で確認した。抽出された exosome からさらに miRNA を含む total RNA を抽出し、microarray による発現解析を行った。当教室で過去に検討された膵癌細胞株の上皮間葉転換状況とともに miRNA の発現差異解析を行った(Tanaka et al., 2018)。さらに膵癌・非膵癌腫瘍患者から採取された血液検体を用いて、先の解析によって抽出された膵癌の性質に関わると予想される miRNA について発現解析を行った。
- 2) 膵癌で術前治療を施行した上で手術を受けた症例と術前治療なしで手術を施行した症例の術前採血検体を用い、miRNA の網羅的発現解析を行った(miRNA シーケンシング:miRNA-Seq)。術前治療有無や術前治療の種類および、再発有無や再発形式別で症例を群分けし、miRNA の発現差異解析などを行った。

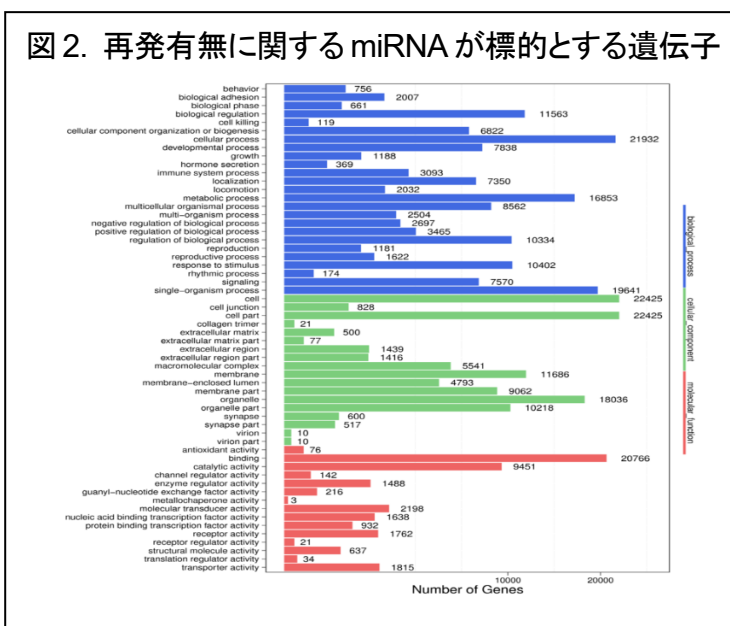
3. 研究結果

1) 膵癌細胞株 Mesenchymal type と epithelial type の exo-miRNA 発現解析から miR-196b-3p が mesenchymal type マーカー、miR-204-3p が epithelial type マーカーであることが示唆された。公共データベースである、The Cancer Genome Atlas の miRNA データ解析では、正常膵組織と比較して膵癌組織で mir-196b 発現が高い傾向にあり ($P = 0.18$)、mir-204 発現が低い傾向にあった ($P = 0.33$)。また、mir-196b 高発現患者は低発現患者に比べ無再発生存期間 (RFS) が有意



に不良であり ($P = 0.0003$)、mir-204 高発現患者は低発現患者に比べ RFS が有意に良好であった ($P = 0.014$)。当教室で切除された膵癌組織の解析では、正常組織と比較して膵癌組織で miR-196b-3p 発現は有意に高く ($P = 0.009$)、mirR-204-3p 発現は差が無かった ($P = 0.85$)。膵癌、IPMN、MCN 患者から採取された血漿検体の解析では、miR-196b-3p 発現は IPMN に比べ膵癌患者血漿において高い傾向があり ($P = 0.4$)、miR-204-3p は MCN に比べ膵癌患者血漿において有意に低かった ($P = 0.007$)。

2) 当教室で手術治療を受けた膵癌患者のうち、20 例を血漿検体中 exo-miRNA 解析患者として抽出した。これらの内訳は 10 例が術前治療なく、膵癌に対する膵切除を受けた症



例、残り 10 例が術前治療 (化学療法 4 例・化学放射線療法 6 例) を施行された症例だった。これらの手術前に採取された血漿検体について、Total exosome isolation Kit (from serum) (Thermo Scientific, USA) を用い、exosome 検体の抽出を行った。抽出された exosome からさらに small RNA を含む total RNA を抽出し、BGISEQ-500 Small RNA (BGI genomics) による small

RNA-sequencing 解析を行った。この膵癌 20 症例は再発有無(無再発・局所再発有り・遠隔転移再発有り)によっても群分可能であり、再発様式の観点から行った miRNA 発現差異解析は図 1 の如くとなり、exosome 内の miRNA について異なる発現を示すものが、各組み合わせで抽出された。また、gene ontology (GO) 解析の一例として、再発有無に関して発現差異のある miRNA が標的とする遺伝子群の GO term に基づいた生物学的機能のクラス分けを行うと図 2 のようになった。今後は再発有無や再発様式における miRNA 発現差異の解析に加え、術前治療の種類や病理学的・臨床的(画像診断的)奏効率などや他の従来から用いられている腫瘍マーカー(CA19-9 など)との関連を解析し、特に有望な miRNA については既に収集されている他の患者の血漿検体での発現状況(血漿中の total RNA および exosome 中の RNA)を定量 PCR 法などで解析し、化学(放射線)療法と特に関連するバイオマーカーとして利用可能か検証する実験・解析を引き続き継続する。

4. 考察

本研究ではまず、膵癌細胞株の培養液から exosome を抽出し、そこに含まれる miRNA 発現解析を行うことで、膵癌細胞から分泌されると考えられる exosome 中に含まれる miRNA が、もともとの腫瘍細胞の性質を反映するかどうかを検証した。この結果を基に、膵癌細胞からはその主病変の性質を予測可能な miRNA を含む exosome が体液中に分泌されていると判断し、実際の膵癌患者の血液検体を用いた網羅的解析実験を行った。結果として、膵癌から分泌された exosome はもともとの膵癌の生物学的悪性度を反映する可能性が十分あると考え、さらに近年その重要性がますます高まっている膵癌に対する術前治療の反応性を予測するためのバイオマーカーとして応用可能性があると考えられた。ただし、本研究は現時点で術前治療に対する反応性予測のバイオマーカーのためのさらなる解析実験・検証実験を要し、継続中の課題である。

膵癌は他の消化器癌と比べて悪性度が高く、根治切除後にも局所・遠隔転移再発を起こして予後不良である。とはいえ、化学療法・分子標的治療薬・放射線療法についても完全に癌を制御することは困難なため、切除可能であっても根治手術とこれらを組み合わせた集学的治療を要すると考えられている。特に近年、術前治療によって膵癌の予後を改善が得られることを示した報告が認められ、その重要性が認識されつつある。このような状況の中で、手術治療前に術前治療の反応性を予測可能となれば、適切な術前治療法の選択が可能となり、過剰な治療を避けることで、個別化医療の提供につながると考えられる。本研究では exosome が膵癌腫瘍細胞から分泌され、その中に含まれる miRNA がもともとの腫瘍の性質を反映する可能性を示した。この上で、実際の膵癌患者から得られた血漿中に含まれる exo-miRNA を解析し、再発有無や形式によって異なる発現をもつ miRNA を抽出した。これまでに膵癌の化学(放射線)療法に対する感受性に関係する非侵襲的バイオマーカーとしての miRNA を検討した報告はごく限られている(Khan et al., 2016)。一方、膵癌よりも早く術前治療の有用性が示された食道扁平上皮癌においては

術前治療の非侵襲的バイオマーカーとしての miRNA の有用性を検証した報告もみられる (Wen et al., 2016)。本研究の継続により、近年注目されている膵癌術前治療の反応性を予測する非侵襲的バイオマーカーとしての miRNA を抽出することは、難治癌である膵癌治療の個別化に有用な可能性があり臨床的にも有用であるため、引き続き研究を通して候補分子の抽出・有用性検証を行っていく予定である。

5. 文献

- ① KHAN, K., CUNNINGHAM, D., PECKITT, C., BARTON, S., TAIT, D., HAWKINS, M., WATKINS, D., STARLING, N., RAO, S., BEGUM, R., THOMAS, J., OATES, J., GUZZARDO, V., FASSAN, M., BRACONI, C. & CHAU, I. miR-21 expression and clinical outcome in locally advanced pancreatic cancer: exploratory analysis of the pancreatic cancer Erbitux, radiotherapy and UFT (PERU) trial. *Oncotarget*, 7, 12672-81. 2016
- ② KUWADA, K., KAGAWA, S., YOSHIDA, R., SAKAMOTO, S., ITO, A., WATANABE, M., IEDA, T., KURODA, S., KIKUCHI, S., TAZAWA, H. & FUJIWARA, T. The epithelial-to-mesenchymal transition induced by tumor-associated macrophages confers chemoresistance in peritoneally disseminated pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 37, 307. 2018
- ③ NIWA, Y., YAMADA, S., SONOHARA, F., KURIMOTO, K., HAYASHI, M., TASHIRO, M., IWATA, N., KANDA, M., TANAKA, C., KOBAYASHI, D., NAKAYAMA, G., KOIKE, M., FUJIWARA, M. & KODERA, Y. Identification of a serum-based miRNA signature for response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemotherapy. *J Transl Med*, 17, 1. 2019
- ④ TANAKA, N., YAMADA, S., SONOHARA, F., SUENAGA, M., HAYASHI, M., TAKAMI, H., NIWA, Y., HATTORI, N., IWATA, N., KANDA, M., TANAKA, C., KOBAYASHI, D., NAKAYAMA, G., KOIKE, M., FUJIWARA, M., FUJII, T. & KODERA, Y. Clinical Implications of Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Expression in Pancreatic Cancer. *Sci Rep*, 8, 9846. 2018
- ⑤ UNNO, M., HATA, T. & MOTOI, F. Long-term outcome following neoadjuvant therapy for resectable and borderline resectable pancreatic cancer compared to upfront surgery: a meta-analysis of comparative studies by intention-to-treat analysis. *Surg Today*, 49, 295-299. 2019.
- ⑥ WEN, J., LUO, K., LIU, H., LIU, S., LIN, G., HU, Y., ZHANG, X., WANG, G., CHEN, Y., CHEN, Z., LI, Y., LIN, T., XIE, X., LIU, M., WANG, H., YANG, H. & FU, J. MiRNA Expression Analysis of Pretreatment Biopsies Predicts the Pathological Response of Esophageal Squamous Cell Carcinomas to Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Ann Surg*, 263, 942-8. 2016.

6. 論文発表

本研究は継続中であり、論文未発表である。