

## エクソソーム microRNA による膵癌再発予測マーカーの開発

札幌医科大学 消化器・総合、乳腺・内分泌外科  
及能 大輔、山口 洋志、永山 稔、今村 将史、木村 康利、竹政 伊知朗

### 1. 緒言

膵癌は現代においても難治性癌であり、膵臓癌全体の5年生存率は9.8%、特に Stage IV では1.4%とすべての癌の中で最も低い（国立がん研究センター がん登録・統計）。切除可能膵癌に対しては外科的治療を行うことが推奨されている一方で、生存率が低い一つの要因には、高率に根治切除後の再発・転移が起きることが挙げられる。術後再発症例の予後は極めて不良であり、さらに自験例において術後1年以内に再発した症例（術後早期再発例）は、それ以降に再発した症例に比して、有意に予後不良であった（unpublished data）。術後早期再発例では、手術時にすでに微小転移が存在している可能性が想定される。しかし、既存の画像検査、血液検査、病期診断や切除可能性分類による治療選択では、術後早期再発症例の選別や外科的治療介入の時期決定に限界がみられる。そのため、微小転移を同定できるような新規バイオマーカーの同定が急務である。

エクソソームは、癌細胞を含むすべての細胞から分泌され、全身を循環する 40-200 nm の細胞外小胞である。エクソソームには、タンパク質、核酸（mRNA, DNA, microRNA (miRNA)）、脂質などが内包され、細胞間コミュニケーションの手段と考えられている。癌細胞から分泌されるエクソソームには、腫瘍の遺伝子情報が安定した状態で包埋されており、その miRNA の組み合わせ（miRNA profile）は癌種特異的であることが知られている。

本研究は、膵癌切除予定患者の血液から、エクソソームに内包された miRNA を抽出し、手術後の再発リスクを予測可能な新規バイオマーカーを同定することで、膵癌患者の予後向上を目指すものである。

### 2. 方法

#### 1. 膵癌細胞株を利用した miRNA profile の測定と解析

転移能に差がある膵癌細胞株を利用して、抽出したエクソソーム内の miRNA を測定し比較する。細胞はラット膵癌細胞株 ASML を利用した。膵癌細胞株の転移能にタイト結合分子 Claudin-7 (cld7) の関与が報告されていること<sup>1)</sup>を利用して、本研究では転移能が低下し

ている stable cld7 knockdown (cld7kd) を行った細胞株を使用した。ASML wild type と cld7kd type からそれぞれエクソソーム内 miRNA を抽出し、差異を検証した。

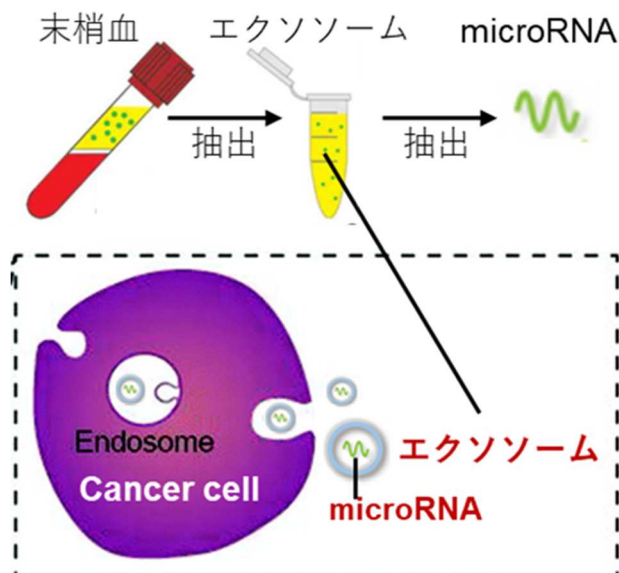
## 2. 手術前後、再発判明後の miRNA profile の測定と解析

膵癌切除術後の早期再発症例と無再発症例について、手術前の血清からエクソソーム内 miRNA を抽出し測定、比較を行った (図 1)。miRNA の網羅的解析を行い、有意差のある miRNA を特定する。膵癌症例の血清を保存し、早期再発判明症例、無再発症例、健常群 3 名ずつのエクソソーム内 miRNA についてマイクロアレイを行った。エクソソーム内 miRNA の抽出には exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit (QIAGEN) を用いた。

## 3. 再発を予測する microRNA の特定

切除術前後、再発判明時に発現量が有意に変化する miRNA を同定した。前項の網羅的解析結果を参考に、切除術前後で発現量が有意に変化する miRNA を抽出し、さらに再発判明時に発現量の変化がみられるものを特定した。発現量は qRT-PCR で評価した。特定された miRNA の切除術前発現量と、症例の無再発生存期間、全生存期間、再発形式を用いて統計学的に解析を行い、術前の miRNA 発現量と早期再発の有無について解析を行った。その結果から、術後早期再発を予測可能な因子の組み合わせを探索した。

図 1: 研究方法の概要



### 3.結果

#### 1. 膵癌細胞株を利用した miR profile の測定と解析

膵癌細胞株 ASML の上清よりエクソソーム内 miRNA を抽出し、microRNA array を行った結果、18 種類の miRNA が wild type で 2 倍以上増加しており、19 種類が cld7kd type で半分以下に低下していた (図 2,3)。これらの miRNA 群から、予測される標的遺伝子を miRNA database (IPA (QIAGEN)、targetscan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/))) より探索した (表 1)。Wild type で増加している miRNA により変動する遺伝子は、癌細胞の増殖能 (cell cycle) や細胞内シグナル活性化に働いているものが多くみられた。

研究方法 2、3 の結果は現在解析中であり、論文にて公表を予定している。

図 2: Wild type exosomes で高発現する miRNAs

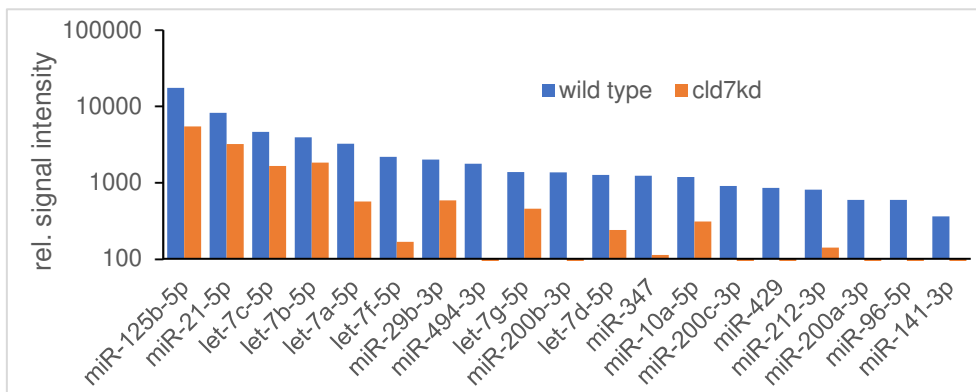


図 3: Cld7kd type exosomes で高発現する miRNAs

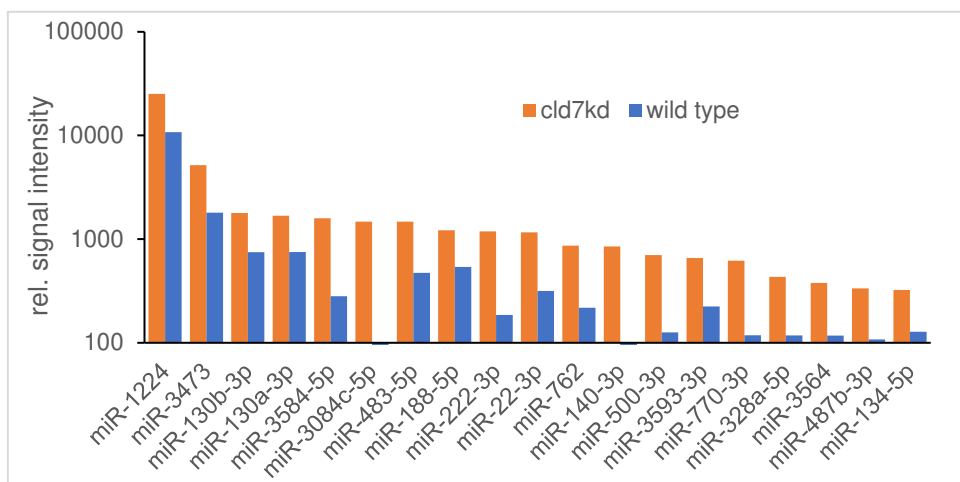


表 1 : Wild type exosomes で高発現する miRNAs の標的遺伝子

Target genes of the miRNAs		
Symbol	Expected	Type
AKT3	Up	kinase
BCL2	Up	transporter
BCL2L1	Up	other
CCND1	Up	transcription regulator
CDKN1A		kinase
EGFR	Up	kinase
ERBB2	Up	kinase
FGFR1	Up	kinase
KRAS	Up	enzyme
PLD1	Up	enzyme
PTGS2	Up	enzyme
RAF1	Up	kinase
TGFBR1		kinase
TGFBR2		kinase
TP53		transcription regulator
VEGFA	Up	growth factor

#### 4.考察

近年、膵癌に新規化学療法が導入され、また 2019 年の ASCO-GI で海野らによって切除可能膵癌に対する術前化学療法の有効性が報告されたことで、一定の成績向上が期待されている。しかし膵癌の生存率改善を図るためには、根治切除後の再発率を低値に抑えることも必要である。術後早期再発をきたす症例では、診断時に全身を循環する癌幹細胞や、画像検査で捉えられない微小転移が存在しているものと考えられており、膵癌の動態をとらえることが可能なバイオマーカーが求められている。

癌細胞から分泌されるエクソソームには、腫瘍の遺伝子情報が安定して包埋されていることが知られている。近年では、膵癌細胞から分泌されたエクソソーム内の *Kras* 遺伝子の変異が、原発巣の *Kras* 遺伝子の変異と完全に一致していたことから、エクソソーム内に保存されている遺伝情報は原発巣の情報を反映することが明らかとなった<sup>2)</sup>。さらにはエクソソーム内 miR-451a が、Stage II 膵癌患者の術後再発や生存率と相関するという報告がなされ<sup>3)</sup>、特定の miRNA が再発・予後予測因子となることが判明した。これらの結果から、

エクソソーム内 miRNA は膵癌の病態を反映しており、早期再発や外科的治療介入後の予後について有効な予測ツールとなるのではないかと考え、本研究計画を立案した。

術後早期再発に関する既存の検討では、術前 CA19-9 高値が術後早期再発のリスク因子であるという報告がみられ<sup>4)</sup>、自験例の検討でも同様であった。CA19-9 は他の要因でも上昇するため、そのみで術後早期再発を予測するのは困難と考えられるが、本研究結果から得られた miRNA profile を CA19-9 と組み合わせて解析することで、さらに正確な予測が可能となることが期待される。

本報告で提示した結果は *in vitro* によるものであるが、抽出された miRNA は癌のシグナル伝達経路や cell cycle の発現に影響を与えることが予想された。この結果は、ヒト体内においても、膵癌細胞から分泌されたエクソソーム内の miRNA が、癌の進展に関係することを示唆する結果である。膵癌患者における miRNA profile は解析中であり、症例の集積を経たうえで発表したいと考えている。

## 5.結語

膵癌細胞株のエクソソームを用いた結果から、miRNA profile が癌の病態を反映し、再発や予後を予測できる可能性が示唆された。膵癌切除後の再発リスク予測により、個々の病態に即した治療戦略が選択可能となり、膵癌患者の予後向上が得られると考えている。

## 6.文献

- 1) Thuma F, Zoller M. EpCAM-associated claudin-7 supports lymphatic spread and drug resistance in rat pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2013;133:855-866.
- 2) Allenson K, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28:741-747.
- 3) Takahashi K, et al. Usefulness of exosome-encapsulated microRNA-451a as a minimally invasive biomarker for prediction of recurrence and prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2018;25:155-161.
- 4) Nishio K, et al. Preoperative predictors for early recurrence of resectable pancreatic cancer. *World J Surg Oncol* 2017;15:16.