

# 膵癌患者のオーダーメイド治療を目指した抗癌剤効果予測キットの開発

東北大学大学院 消化器病態学分野

准教授 正宗 淳

(共同研究者)

東北大学大学院 消化器病態学分野 助教 濱田 晋

## はじめに

膵癌は部位別癌死亡数の第5位を占め、根治するのは100人中3人でしかない。多くの症例が手術不能例であり、化学療法が治療上重要な位置を占める。しかしながらその効果は個人差が大きく、副作用により逆に生活の質の低下を招くことも少なくない。切除不能膵癌の生命予後は診断後1年未満しか期待できないため、化学療法の可否とその種類を最初から適切に選択することはQuality of Lifeの維持の点からも極めて重要である。

近年、タンパク質をコードしないマイクロRNAが種々の細胞機能を制御し、癌をはじめとする様々な疾患の病態に関わることが明らかとなった。膵癌においても、miR-21をはじめとする様々なマイクロRNAが膵癌細胞の悪性度や治療抵抗性、癌幹細胞性(stemness)を司ることが報告されている<sup>1)</sup>。実際に我々は、膵癌幹細胞ニッチを構成する膵星細胞が、膵癌細胞においてmiR-210を誘導して膵癌幹細胞性や上皮間葉変換を制御することを報告した<sup>2)</sup>。興味深いことに、miR-210は末梢血中でも検出され、膵癌患者の予後と逆相関するとされる<sup>3)</sup>。すなわち末梢血中のマイクロRNAが治療反応性のバイオマーカーとなりうる可能性がある。

本研究の目的は、膵癌の診断・治療に有用なバイオマーカーとなる末梢血中マイクロRNAを同定し、簡便な測定キットの開発につなげることである。

## 方 法

1. 対象は当科において膵疾患と診断された患者である。内訳は膵癌5名、慢性膵炎5名、自己免疫性膵炎3名。加えて5名の健常者に協力して頂いた。
2. 文書によるインフォームドコンセントを取得した後に血清を採取し、東レ社製3D-Gene® RNA Extraction Reagent from Liquid Sampleキットを用いてマイクロRNAを含む全RNAを分離した。分離したRNAの質はAgilent社製Bioanalyzer 2100を用いて評価した。膵癌患者については化学療法前後、また自己免疫性膵炎患者については、ステロイド治療前後で同様に血清を採取し、マイクロRNAを分離した。

- 東レ社製3D-Gene® Human miRNA Oligo chipを用いてマイクロアレイを行い、マイクロアレイによる血清マイクロRNA発現プロファイルの網羅的解析を行った。
- マイクロRNAの定量は、Life Technologies社製Taqman® Fast Universal PCR Master Mixを用いて、StepOnePlus 7300 Real-Time PCR Systemを使用して行った。
- 本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認のもとに行った。

## 結 果

### 1. マイクロRNAは末梢血から分離可能であった

最初に、末梢血から良質なマイクロRNAが抽出可能であるかを検討した。図1に示すように、血清から抽出したRNA中にマイクロRNAを含む小RNA分画を認め、以後の検討に耐えうると考えられた。

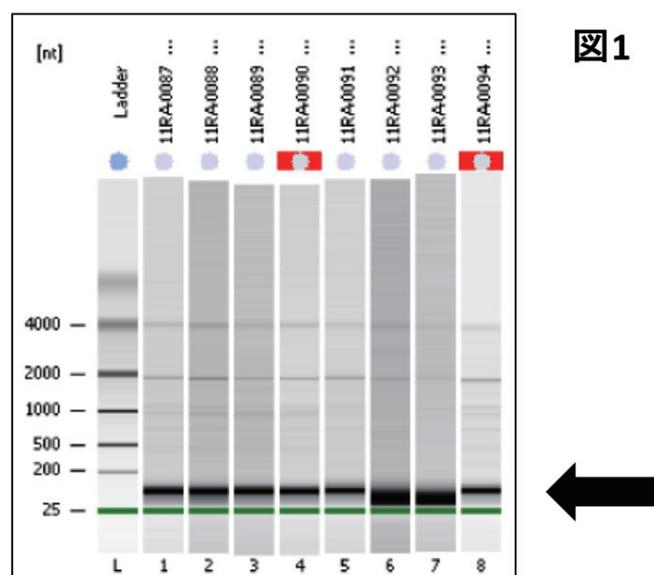


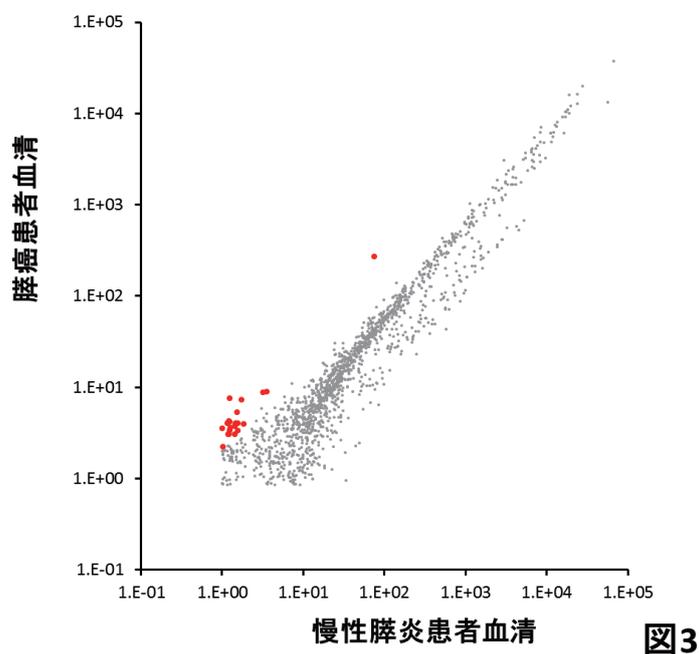
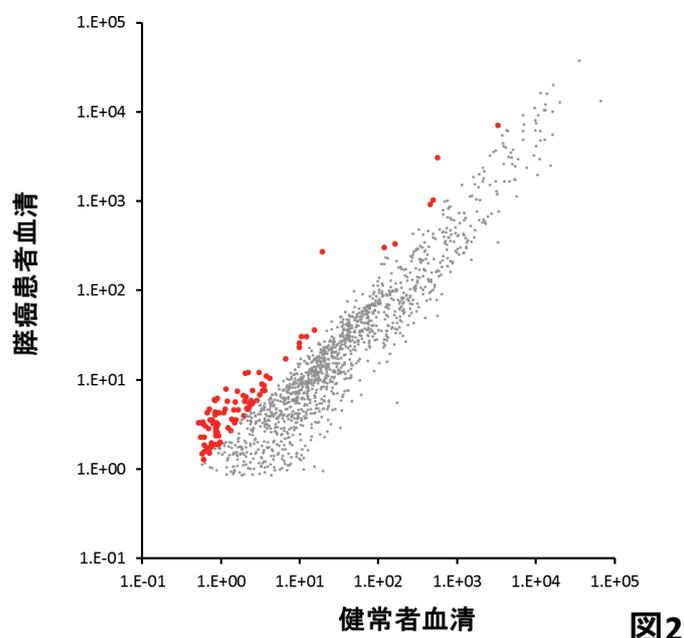
図1

### 2. 膵癌と他膵疾患におけるマイクロRNAプロファイルの比較検討

末梢血中マイクロRNAプロファイルの膵癌診療における有用性を明らかにするために、膵癌 (n=5) ならびに慢性膵炎 (n=5)、健常者 (n=5) の血清マイクロRNAプロファイルを、マイクロアレイにて比較検討した。

図2に示すように、健常者に比べて膵癌患者血清で発現量が2倍以上に増加するマイクロRNAが抽出可能であった。日常臨床において膵癌は、しばしば腫瘍形成する慢性膵炎との鑑別が困難である。また、慢性膵炎は膵癌の危険因子である。そこで、慢性膵炎と膵癌患者間での血清マイクロRNAプロファイルを比較した。図3に示すように、慢性膵炎患者と膵癌患

者間でもマイクロRNA発現プロファイルの差異が認められた。その他、自己免疫性膵炎と膵癌、膵癌の治療前後で発現変化のみられるマイクロRNAを複数同定することが可能であった。



### 3. リアルタイムPCRを用いた迅速なマイクロRNA定量

マイクロRNA発現を臨床応用するためには、迅速な定量が不可欠である。膵癌で高発現していたマイクロRNA（便宜上、hsa-miR-XとするリアルタイムPCRを用いてマイクロRNA発現が約2時間で定量可能であった。

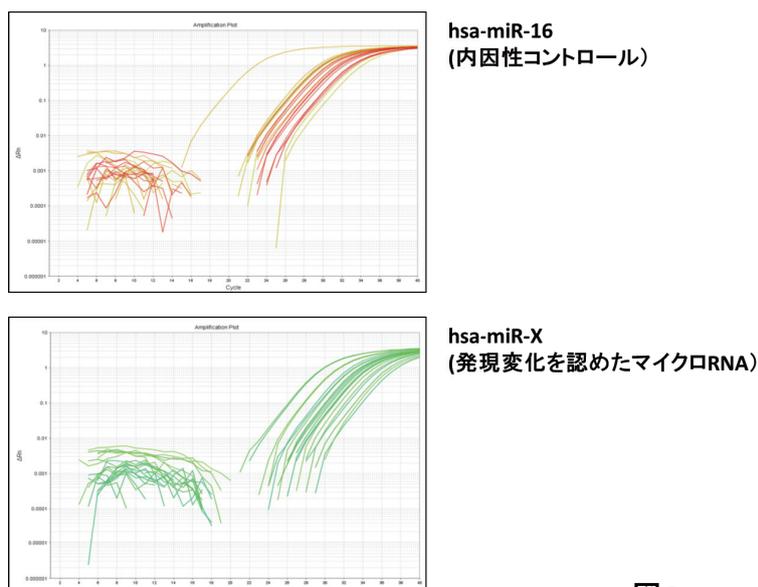


図4

## 考 察

膵臓癌は全症例の平均生存期間が1年程度であり、手術不能膵癌ではさらに短い。現在ではゲムシタビンを第一選択として、無効例にはTS-1投与が行われることが多い。2011年よりゲムシタビンに加えてエルロチニブの投与が、最近ではFOLFIRINOX療法も行われ始めている。さらにペプチドワクチンなど臨床試験が進行中のものもあり、将来は膵癌に対する抗癌剤の選択肢も大幅に増えることが予想される。本研究では、個々の患者さんにあった抗癌剤を的確に選択するオーダーメイド治療を可能とするために、血清マイクロRNAに注目し、膵癌の診断や抗癌剤治療の予測因子となる新規バイオマーカーを同定し、さらに簡便に定量可能な検出系作製のための基礎的検討を行った。

本研究により、膵癌をはじめとする種々の膵疾患において血清マイクロRNA発現プロファイルの差異が明らかとなり、さらに膵癌や自己免疫性膵炎の治療前後で発現変化するマイクロRNAも同定可能であった。研究開始から1年となり、予後が判明してきている症例も多く、抗癌剤別の感受性と予後の関連を含めて、さらに症例を集積し検討を行っている。

血清中のマイクロRNAの由来としてエクソソームと呼ばれる小胞顆粒が注目されている<sup>4)</sup>。エクソソームは細胞から分泌される40～100nm程の小胞で、核酸やタンパク質を内包しながら細胞間を移動する。また脂質二重膜を有することから血液中などの体液内でも安定して存在することができる。エクソソームを介する情報伝達機構は、核酸やタンパク質を含んだ複合体が細胞間を移動する点でこれまでの単一分子による情報伝達の形態とは大きく異なったものである。また体液中でも安定して存在できるエクソソームは、血中バイオマーカーとしての利用やエクソソームを用いたドラッグデリバリーシステムの開発などへの応用も期待されている。本研究において膵癌患者中で高発現が確認されたマイクロRNAが、膵癌細胞ならびに膵星細胞のエクソソーム中で高発現していることを、われわれは最近見出した（正宗

ら、未発表データ)。本研究のような患者さんの検体を用いた臨床研究と、培養細胞を用いた基礎研究がトランスレーショナルリサーチとして融合することが必要である。

日常臨床で有用なバイオマーカーとするためには、簡便な測定系の開発が不可欠である。膵癌で高発現する血清マイクロRNAについて、既存のTaqManプローブを用い2時間で定量する検出系は構築可能であった。しかし一般の臨床現場で使用するためには、より安価で普及している検出系での定量法が開発されることが望まれる。特異配列を標的とした検出系を現在作製中である。本研究のさらなる進展により、同定したマイクロRNAが膵癌治療効果の向上や治療効果判定の指標となるのみならず、副作用の軽減、生活の質の維持など、難治性膵癌の予後改善につながることを期待される。

## 要 約

難治性癌である膵癌の診断・治療に有用なバイオマーカーとなる末梢血中マイクロRNAを同定するために、マイクロアレイを用いて膵癌、慢性膵炎、自己免疫性膵炎、健常者の血清マイクロRNAの網羅的解析を行った。血清から高品質のマイクロRNAを含む低分子RNAが抽出可能であり、それぞれの膵疾患や治療前後で発現変化するマイクロRNAが同定可能であった。現在、より簡便に定量できる検出系を作製中である。

## 文 献

1. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26:442-452, 2007.
2. Masamune A, Nakano E, Hamada S, Takikawa T, Yoshida N, Shimosegawa T. Alteration of the microRNA expression profile during the activation of pancreatic stellate cells. *Scand J Gastroenterol.* 49:323-331, 2014.
3. Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, et al. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. *Transl Oncol.* 3:109-113, 2010.
4. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 9:654-659, 2007.