

膵臓がん患者血清中 microRNA の網羅的解析による 新規バイオマーカー探索

許 文 聰¹⁾ 永 川 裕 一¹⁾ 上 田 しのぶ²⁾
金 蔵 孝 介²⁾ 粕 谷 和 彦¹⁾ 黒 田 雅 彦²⁾
土 田 明 彦¹⁾

¹⁾東京医科大学消化器・小児外科学分野

²⁾東京医科大学分子病理学分野

【要旨】 (背景) がん細胞が miRNA を放出することにより転移能や浸潤能を促進することが報告され、がん患者の血中 miRNA の役割が注目を集めている。さらにはがんの種類によって血中を循環する miRNA のプロファイルが異なることから、がんの新規バイオマーカーとなり得る可能性が注目されるようになった。現在膵臓がんのバイオマーカーとして用いられている CA19-9 や CEA は、病初期では正常値であることが多く、膵臓がんの初期診断に有用なバイオマーカーの発見が熱望されてきた。(目的) 本研究では膵臓がん患者血清中の miRNA の網羅的プロファイルを解析し、膵臓がん特異的 miRNA のバイオマーカーの確立を試みた。(方法) 当大学病院で摘出術を行った膵臓がん患者血清と健常者の血清を、miRNA マイクロアレイを用いて発現量の網羅的解析をし、比較検討を行った。(結果) 膵臓がん患者において複数の miRNA の上昇を認め、その中で hsa-miR-1275 は膵臓がん患者で有意な上昇が見られた。さらにステージごとの比較では hsa-miR-1275 は健常者群と比較して stage III で有意な増加が認められた。(結論) hsa-miR-1275 は膵臓がんの新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

はじめに

miRNA は蛋白質をコードしない non-coding RNA と呼ばれる一群の RNA のうち、18 から 25 塩基程度の一本鎖 RNA と定義される。1993 年に線虫において翻訳阻害性の小分子 RNA が Ambros らにより発見されたが、その詳細は不明であった¹⁾。1998 年 Mello らは短鎖 RNA が mRNA と結合し分解を促進することにより遺伝子の発現を低下させる新規生命現象である RNA 干渉を報告し²⁾、ノーベル賞を受賞した。さらに Ambros らは線虫において miRNA と呼ばれる一連の小分子 RNA が存在し、ショウジョ

ウバエやヒトにまで進化的に保存され、生理的な役割を果たしていることを報告した³⁾。これらは DNA 上の遺伝情報が DNA-RNA-蛋白質というセントラルドグマにより翻訳されるという常識を覆し、蛋白質をコードしない miRNA が蛋白質の発現に影響するという全く新規の概念を与えた。

悪性腫瘍における miRNA の役割は、2002 年に白血病細胞における miRNA の発現低下、もしくは欠損が報告され、これらがアポトーシスを司る遺伝子の発現を低下させる miRNA 群であったことから、注目されるようになった⁴⁾。現在では onco-mir と呼ばれるがん遺伝子としての miRNA および anti-

平成 26 年 6 月 18 日受付、平成 26 年 8 月 1 日受理

キーワード：膵臓がん、microRNA、バイオマーカー、網羅的解析

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学消化器・小児外科学分野 許 文聰)

TEL : 03-3342-6111 FAX : 03-3340-4575

oncomir と呼ばれるがん抑制遺伝子としての miRNA という概念が確立し、各種悪性疾患における生理学的役割についての検討が行われている。さらにがん細胞は miRNA をエクソソームと呼ばれる小胞を通じて細胞外に分泌し、周囲の正常細胞およびがん細胞と情報伝達しうることが報告され⁵⁾、がん患者血清中の miRNA は病態生理学的にも重要であるのみならず、新たな診断マーカーとしても注目されている。

膵臓がんは本邦における臓器別がん死亡数では男女全体で肺がん、胃がん、大腸がんに次いで第4位であり、男性では第5位、女性では第4位であることから、我が国の公衆衛生上大きな問題となっている。近年のシーケンス技術の革新により、各種悪性腫瘍における変異遺伝子の網羅的解析が盛んに行われているが、最近報告された genome-wide study によると膵臓がんのうち大部分を占める膵管がんにおいて、*KRAS*, *TP53*, *SMAD4* は最も高頻度に変異が認められる遺伝子群であり、これらの変異により膵管上皮が悪性化し膵臓がんが発生すると考えられている⁶⁾。膵臓がんの初期バイオマーカーについても積極的な検討が行われているが、CEA や CA19-9 といった古典的腫瘍マーカーやアミラーゼ、リパーゼといった膵逸脱酵素は膵臓がんの病初期で

は正常値であることがほとんどであり、異常値を呈する時にはすでに進行期であることが多い。このような背景から我々は、膵臓がんのバイオマーカーとなりうる miRNA 探索を行った。

研究材料および方法

対象

対象は2012年から2013年の間に東京医科大学病院消化器外科にて膵臓腫瘍に対して外科的切除術を行った患者のうちインフォームドコンセントの得られた年齢50歳から81歳までの15例(平均67.08歳)を対象とした。性別は男性11例、女性4例であった。健常者群としては健常ボランティアの血清を用いた($n=2$ 、年齢26-37歳、男性1例、女性1例)。miRNA 定量的 real-time PCR にはさらに6例を追加して合計8例の健常者群[平均年齢49.5歳(39-58歳)、男性4例、女性4例]を用いた。

方法

研究の方法の概略を Fig. 1 に示した。

1. 病理学的診断

膵臓がん患者は血清採取後に東京医科大学病院において外科的膵臓がん摘出術を施行された。摘出標本は東京医科大学病院病理診断部にて固定および染色を行い、病理学的組織診断を行った。

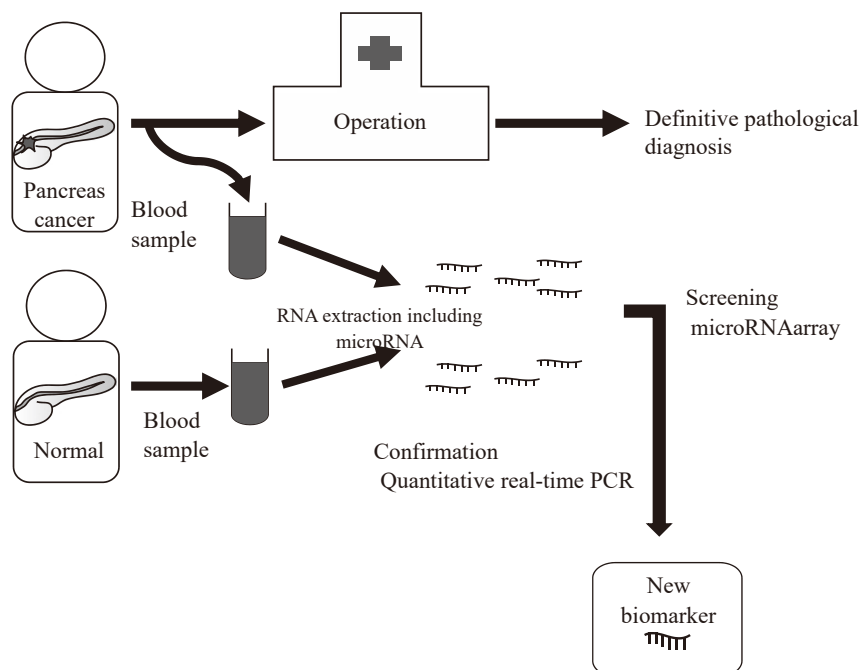


Fig. 1 Materials and methods used Serum samples were collected from patients undergoing resection of pancreatic cancer at Tokyo Medical University Hospital. After total RNA including microRNA was extracted from sera, microRNA array and quantitative real-time PCR were used to investigate which microRNAs species were over-expressed

2. RNA 抽出

患者血清は術前に真空管を用いて採血し、遠心分離により血清と血球成分を分離した。患者群および対照群の血清中の miRNA を含む Total RNA を miR-Neasy serum/plasma kit (Qiagen, Germany) を用いて Qiagen 社のマニュアルに従って採取した。RNA 濃度は Nanodrop スペクトロメーターを用いて測定した。

3. miRNA マイクロアレイ

血清中 miRNA の発現解析は miRNA マイクロアレイシステム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。まず、抽出した total RNA (36 ng) を Human microRNA Microarray kit (Agilent Technologies) を用い、プロトコール (Agilent microRNA microarrays Version 1.5) に従って Cyanine3-pCp を 3' 末端に付加した。ラベル化 RNA は 55°C で 20 時間ハイブリダイゼーションした後、DNA microarray scanner (Agilent Technologies) にてシグナルの検出を行った。検出したシグナルは Agilent feature extraction software (v9.5.3.1) を用いて、解析を行った。健常者と比較して膵臓がん患者で 2 倍以上の増加もしくは 0.5 倍以下に低下した miRNA をバイオマーカー候補とした。

4. 定量的 real-time PCR 法

アレイ解析の結果より選出した候補 miRNA 6 個のうち、定量的 PCR のための Taqman プローブが入手可能であった hsa-miR-1275、hsa-miR-188、hsa-miR-3648 において、TaqMan[®] microRNA assay (Applied Biosystems) を用いた定量的 real-time PCR 法により結果の再確認を行った。使用した primer の sequence を Table 1 に示す。定量的 real-time PCR 法は Applied Biosystems のプロトコールを一部改変して行った。total RNA (10 ng) を 5 µl の dH₂O に溶かし、dH₂O (ヌクレアーゼフリー) 6.16 µl、1X reverse transcriptase buffer、1 mM dNTP、RNase inhibitor 3.8 units、MultiScribe[™] reverse transcriptase 50

units、各 miRNA に特異的な 5X microRNA specific stem-loop primers (hsa-miR-1275 ; Cat.# 002840, hsa-miR-188-3p ; Cat.# 002320, hsa-miR-3648 ; Cat.# 464401 ; Applied Biosystems) 1 µl を加えて全量を 15 µl とし、16°C 30 min、42°C 30 min、85°C 5 min 反応を行って cDNA を合成した。続いて 20 倍希釈した cDNA 2 µl に PCR プライマーとプローブ (5'-FAM and 3'-TAMRA) を含む 1× TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystems)、TaqMan[®] Universal Master Mix, No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems)、dH₂O (ヌクレアーゼフリー) を加え全量を 20 µl とし、Light Cycler 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) を用いて 95°C 15 sec -60°C 1 min のサイクルを 50 回行った。データは Light Cycler 96 Software Ver. 1.1 (Roche Diagnostics GmbH) にて解析した。

結 果

1. 膵臓がんの病理組織診断

本研究の対象にした膵腫瘍患者 15 症例のうち病理組織検査で膵臓がんと診断された 13 例について解析を行った。良性腫瘍 intraductal papillary-mucinous adenoma (IPMA) と診断された 2 例は対象から除外した。膵臓がん患者の年齢、性別、組織型、ステージを Table 2 に示した。病理診断の結果、全て invasive ductal carcinoma (IDC) (13 例) であった。さらにステージ別では stage I 1 例 (6.7%)、stage II 1 例 (6.7%)、stage III 4 例 (26.7%)、stage IVa 5 例 (33.3%)、stage IVb 2 例 (13.3%) であった。miRNA マイクロアレイ健常者 2 例と膵臓がん患者群 (IDC) 13 例を用いた miRNA マイクロアレイの結果、健常者群と比較して 6 種の miRNA (miR-1275, miR-188, miR-3195, miR-3648, miR-4281, miR-762) が、膵臓がん患者血清で増加していた (Fig. 2)。

2. 定量的 real-time PCR

miRNA マイクロアレイにて増加傾向を示した 6 種の miRNA (miR-1275, miR-188, miR-3195, miR-3648, miR-4281, miR-762) のうち hsa-miR-1275、hsa-miR-188、hsa-miR-3648 の 3 個について quantitative PCR (qPCR) を行った。このうち、hsa-miR-1275 は健常者群と比較して膵臓がん患者の血清中で有意に増加 (3.45 倍、 $p=0.00028$) していることが示された (Fig. 3A)。hsa-miR-188-5p、hsa-miR-3648 についても膵臓がん患者で増加傾向が見

Table 1 Sequence of primers for quantitative PCR

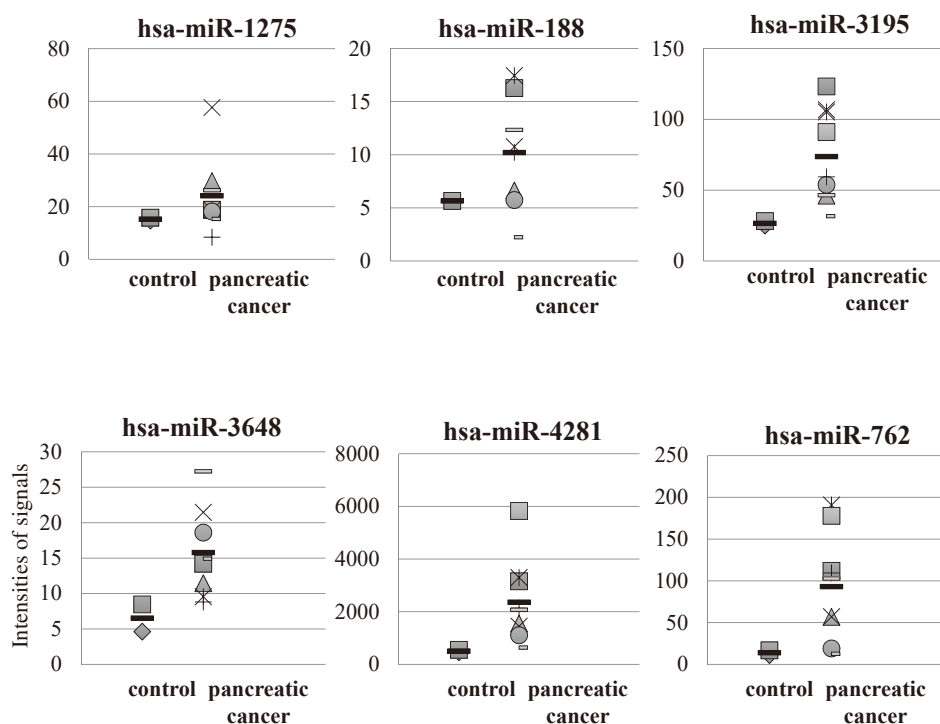
hsa-miR-1275
5'-GUGGGGGAGAGGCUGUC-3'
hsa-miR-3648
5'-AGCCGCGGGGAUCGCCGAGGG-3'
hsa-miR-188-5p
5'-CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG-3'

Table 2 Patient characteristics and pathological findings

This table shows patient characteristics and pathological findings on resected specimens.

Age	Sex	Pathological findings	Stage	Array	qPCR
66	F	invasive ductal carcinoma (IDC) (pap>tub2>tub1)	III	Y	Y
70	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub1)	IVa	Y	Y
50	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub1)	IVa	Y	Y
53	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub1)	IVa	Y	Y
61	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub1>tub2)	III	N	Y
73	F	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub2>por)	IVb	N	Y
54	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (por)	IVb*	Y	Y
65	M	invasive ductal adenocarcinoma (por>tub2)	IVa	N	Y
75	M	intraductal papillary-mucinous adenoma with IDC	III	N	Y
69	F	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub2>tub1)	I	Y	Y
81	F	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub2>pap)	III	Y	Y
73	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (pap>tub1)	II	Y	Y
70	M	invasive ductal carcinoma (IDC) (tub1)	IVa	Y	Y

M : male, F : female, Y : Sample examined, N : Sample not examined, * : peritoneal metastasis

**Fig. 2** Expression of circulating microRNA in serum obtained from pancreatic cancer patients and controls by microRNA array analysis. Six potential microRNA markers for pancreatic cancer were determined. Y axis shows intensity of signals.

られた (hsa-miR-188-5p: 1.138 倍、 $p=0.42$ 、hsa-miR-3648: 1.72 倍、 $p=0.064$) ものの、統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3A)。また膵臓がんのステージ別に解析した結果、stage III では健常者群と比較して 4.2 倍に上昇しており、有意な差を認めた ($p=0.04$) (Fig. 3B)。

考 察

今回我々は膵臓がんのバイオマーカーの確立を目指し、血中 miRNA の網羅的解析を行った。東京医科大学病院消化器外科にて膵臓がん摘出術を施行した患者血清と、健常者血清中の miRNA の網羅的解析を行い、発現量の比較検討を行った。その結果

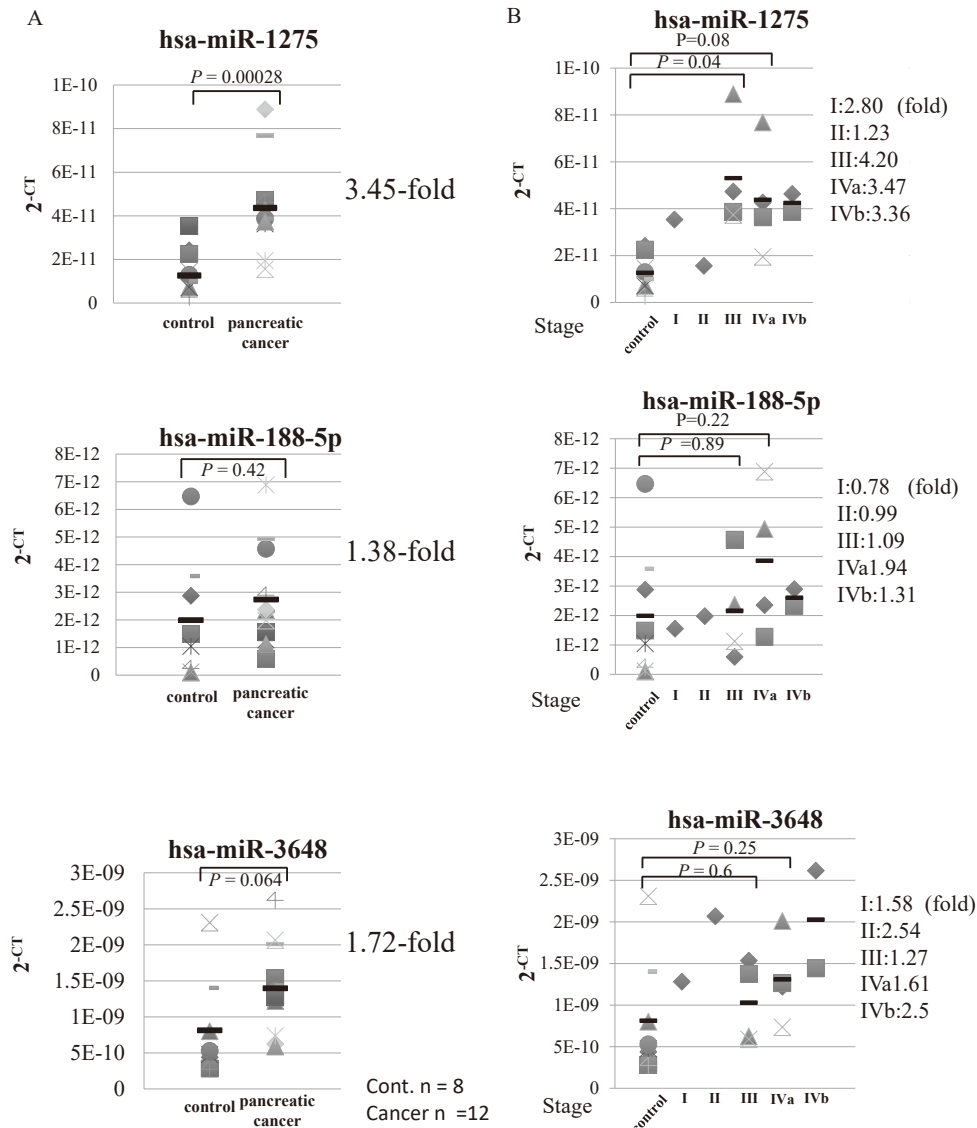


Fig. 3 Quantitative real-time PCR
 A), B) Serum levels of 3 potential miRNAs were measured by quantitative real-time PCR. Serum levels of hsa-miR-1275 in pancreatic cancer patients were significantly elevated compared to in controls ($p = 0.00028$).

miRNA マイクロアレイで6種類のmiRNA (miR-1275, miR-188, miR-3195, miR-3648, miR-4281, miR-762)の増加傾向を認め (Fig. 2)、miR-1275は定量的real-time PCR法により、健常者に比べて有意に膵臓がん患者血清中で上昇していることを確認したことから、miR-1275は膵臓がんの新規バイオマーカーとして有用であることが示唆された (Fig. 3A)。ステージ別の解析ではstage IIIの患者血清中で有意に上昇していた ($n=4, p=0.04$) (Fig. 3B)。stage Iでは2.8倍 ($n=1$)、IIでは1.23倍 ($n=1$)、IVaでは3.47倍 ($n=4, p=0.08$)、IVbでは3.36倍 ($n=2$)とがんの初期であるstage Iにおいても上昇傾向が見られた。ただし、今回は少数の検体数であったため有意差検

定ができなかった。早期診断バイオマーカーとしての有用性については今後の検討課題である。

また本研究ではサンプルに用いる血清量が限られていたことからエクソソームや細胞外小胞といった血清の各分画でmiRNAのプロファイリングを行うことは出来なかった。血清の各分画でmiRNAのプロファイルが異なるのかどうかを明らかにすることで、血清miR-1275の機能的な意義について考察できるものとする。

近年、血中のmiRNAの発現量の変動はがんの進展や転移に関わっていることは報告されているものの⁵⁾、がん組織内の発現プロファイルと血液を含む体液など組織外のmiRNAの発現プロファイルが一

致するとは限らない。本研究により hsa-miR-1275 が膵臓がん患者血清中で有意に増加していることが明らかとなったが、がんの進展、転移においてどういう機能を持つのかは明らかでない。そこで hsa-miR-1275 が標的とする遺伝子を探索するためにバイオインフォマティクスによる考察を行った。hsa-miRNA-1275 の標的 mRNA を miRNA 標的データベース (miRNA.org) で探索したところ 7807 遺伝子が候補として提示された。候補遺伝子のうち、上位 50 遺伝子について遺伝子機能データベース PANTHER (protein annotation through evolutionary relationship) classification system を用いて機能群ごとに分類した。その結果、hsa-miRNA-1275 の標的遺伝子として数種の受容体を標的としうるということが予測された。これらのうち、TGFβ3 (Transforming growth factor receptor III, betaglycan) は膵臓がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がんを含む複数のがんにおいてがん抑制遺伝子として働きうることが示されている⁹⁻¹²⁾。今回我々が見出した膵臓がん患者血清で上昇していることを確認した miR-1275 は TGFβ3 の 3'UTR に 2 箇所 of 標的配列が存在しており、TGFβ3 の mRNA を標的とし得る miRNA である。膵臓がん患者血清の miR-1275 とがん細胞の TGFβ3 の mRNA の発現量との間に相関があるとすれば膵臓がん細胞では miR-1275 を細胞外へ分泌することにより、より転移しやすい環境を作り出している可能性がある。

本研究結果より膵臓がん患者血清中の hsa-miR-1275 の発現量増加は膵臓がんのマーカーとなりうるだけでなく、膵臓がんの進展や予後に関わる重要なメカニズムの一つを担っている可能性があり、治療法や予後評価への応用が期待される。

結 論

本研究において膵臓がん患者血清中 miRNA の網羅的解析を行った結果、hsa-miR-1275 が膵臓がんの新規バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

COI 申告の開示

著者の COI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、患者検体の採取にご協力頂きました東京医科大学消化器・小児外科医局員、染色および miRNA 解析にご協力頂きました東京医科大学分子病理学分野教室員の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843-854, 1993
- 2) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811, 1998
- 3) Lee RC, Ambros V: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 862-864, 2001
- 4) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15524-15529, 2002
- 5) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**: 654-659, 2007
- 6) Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, Mollaei M, Wagner KU, Koduru P, Yopp A, Choti MA, Yeo CJ, McCue P, White MA, Knudsen ES: Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* **6**: 6744, 2015
- 7) He Y, Lin J, Kong D, Huang M, Xu C, Kim TK, Etheridge A, Luo Y, Ding Y, Wang K: Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers. *Clin Chem* **61**: 1138-1155, 2015
- 8) Coenen-Stass AM, Mager I, Wood MJ: Extracellular microRNAs in Membrane Vesicles and Non-vesicular Carriers. *EXS* **106**: 31-53, 2015
- 9) Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, Kelly P, Moeller BJ, Marks JR, Blobel GC: The type III TGF-beta receptor suppresses

- breast cancer progression. *J Clin Invest* **117** : 206-217, 2007
- 10) Hempel N, How T, Dong M, Murphy SK, Fields TA, Blobe GC : Loss of betaglycan expression in ovarian cancer : role in motility and invasion. *Cancer Res* **67** : 5231-5238, 2007
- 11) Turley RS, Finger EC, Hempel N, How T, Fields TA, Blobe GC : The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Res* **67** : 1090-1098, 2007
- 12) Gordon KJ, Dong M, Chislock EM, Fields TA, Blobe GC : Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis* **29** : 252-262, 2008

Comprehensive analysis of circulating microRNA and detection of novel biomarkers in patients with pancreatic cancer

Bunso KYO¹⁾, Yuichi NAGAKAWA¹⁾, Shinobu UEDA²⁾, Kohsuke KANEKURA²⁾,
Kazuhiko KASUYA¹⁾, Masahiko KURODA²⁾, Akihiko TSUCHIDA¹⁾

¹⁾Department of Gastrointestinal and Pediatric Surgery, Tokyo Medical University

²⁾Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

Abstract

Several miRNAs released from malignant cells play an important role in tumor invasion and metastasis. This suggests that circulating miRNAs might serve as potential biomarkers in the diagnosis and prognosis of cancer. Biomarkers that have already been identified for detection of pancreatic cancer, such as CA19-9, are inadequate to allow early detection. Therefore, a great need exists for new biomarkers for pancreatic cancer. The purpose of this study was to evaluate and comprehensively analyze circulating microRNA isolated from patients with pancreatic cancer and controls with the aim of identifying novel biomarkers for the early diagnosis of pancreatic cancer. Several specific microRNA markers were identified. Expression of hsa-miR-1275, in particular, was confirmed to be significantly elevated in patients with pancreatic cancer in comparison with in the controls, particularly in patients with stage III disease. These findings suggest that miR-1275 offers a novel specific marker for pancreatic cancer.

〈Key words〉 : Pancreatic cancer, MicroRNA, Biomarker, Comprehensive analysis
