

厚生労働科学研究委託費
(革新的がん医療実用化研究事業)
研究報告書

エクソソーム中 miRNA を利用した早期膵癌診断マーカーの開発

分担研究者 村上善基

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学・准教授

研究要旨

本邦において膵癌は増加傾向にあり、年間死亡者数は約 2 万人に達している。膵癌の根治療法として切除術が行われているが、切除可能例が少なく予後は非常に悪い。今回我々はエクソソーム中の miRNA の発現プロファイルを利用して、早期膵癌診断法の作成を行う。

A. 研究目的

本邦における膵癌死亡者は約 2 万人である。根治的な治療は切除であるが切除例が 20-40%程度で、1 年生存率も切除可能例は 68.9%であるのに対し、切除不能例で 20.6%、5 年生存率は切除可能例で 26.8%であるのに対し切除不能例は 0%であり、非常に予後不良である。この原因としては早期に診断することが非常に困難であることによる。

エクソソームは血中など体液中に存在している細胞膜成分を持つ直径 100nm 程度の小粒子である。エクソソームは細胞間情報伝達を担うことが報告されており (Thery C et al. Nat Rev Immuno 2009)、その中に miRNA を含んでいる。我々はエクソソーム中の miRNA の発現を利用して慢性肝疾患の原因検索、炎症、線維化の程度を診断する

ことが可能であることを報告した (Murakami Y et al. PLoS ONE 2012)。

また次世代シーケンサー (NGS) 技術の発達により高感度かつ網羅的に小分子 RNA の発現解析を行うことが可能になった。我々は肝細胞癌組織中の total RNA を利用し miRNA の発現解析を NGS にておこなった。マイクロアレイ解析と遜色のない発現感度と、またマイクロアレイでは行うことのできない新規 miRNA の検出を行うことが可能であることを示した (Murakami Y et al. PLoS ONE 2014)。

今回我々はエクソソーム中の miRNA を NGS にて解析し、早期膵癌診断方法の開発を行う。

B. 研究方法

NGS 解析

血清よりエクソクイック(SBI)を使用してエクソソーム成分を濃縮し total RNA を miRNeasy mini kit (Qiagen)を使って抽出する。TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina)を用いライブラリーを作成し、MiSeq (Illumina)を用い、その後 miRDeep2 にて miRbase 20 に準拠した precursor、mature miRNA の発現を解析した。その結果をと miRDeep*にて確認を行った。

(倫理面の配慮)

今年度はなし

C. 結果

エクソソーム回収方法

従来の超遠心法、エクソクイック、ExoRNeasy Kit (Qiagen)を用いてエクソソーム内、とエクソソーム外の miRNA の発現プロファイルを作成した。ゲル濾過法を使って miR-16, 92a はエクソソーム外に多く存在しており、let-7a はエクソソーム内に多く存在していることを利用した(Arroyo JD et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。超遠心法と ExoRNeasy Kit はエクソソーム外の miRNA を効率よく除去できるため、特異度は高いが感度が低くなる可能性があることに対し、エクソクイックではエクソソーム外の miRNA も回収してしまうので、特異性は低いが感度が高くなる可能性を示した。

エクソソーム中の miRNA 解析

マイクロアレイ解析では total RNA とし

て 50-60ng 程度でも解析可能であったが、NGS 解析では 200-300ng 程度の total RNA が必要であることが判った。

エクソソーム中の small RNA は miRNA だけではなく piwi RNA、ribosomal RNA (rRNA)、transfer RNA (tRNA)、messenger RNA (mRNA)、YRNA などが含まれており、特に YRNA が多く含まれていることが報告されている(Vojtech L et al. Nucleic Acid Res 2014)、そのため NGS 解析の彩に問題になる非特異的な read を減らし、より特異性を高めるために、LNA を用いて YRNA の中でもっとも多く含まれている Y4RNA を除去した。その結果 mapping rate は除去前が 54.8%であるのに対し、除去後は 85.1%となった。LNA にて Y4RNA を除去後に miRDeep2、miRDeep*で解析を行ったところヒト miRNA の中で mir-486-1 と mir-486-2 の read が全体の 70%以上を占めることが判った。そのため LNA にて mir-486-1/2 の除去を行った解析が妥当であるか否かの検討を現在行っている。

D. 考察

エクソソーム中の miRNA 解析には手間が簡便で現在まで慢性肝疾患の診断で実績のあるエクソクイックを用いて行うことが適当であると考えている。また NGS 解析においてエクソソーム中の miRNA 以外の small RNA の存在が解析の阻害になることを考え、それらを subtraction した後に解析をすることが適当と考えている。またヒト由来の miRNA であるが

mir-486-1/2 が大半の read を占めていることの意義を理解した上で診断ツールとして除去することが適当であるかどうかを検討する必要がある。

E. 結論

超早期肝癌診断のためエクソソーム中の miRNA を NGS にて解析し、診断アルゴリズムを作成する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi Y-h, and Azuma T. High-throughput Analysis of miRNA Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma using Next Generation Sequencing. PLoS One. 2014 Sep 12;9(9):e106314. doi: 10.1371/journal.pone.0106314. eCollection 2014.

2. Taguchi Y-h and Murakami Y. Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases? BMC Res Notes. 2014 Aug 30;7:581. doi: 10.1186/1756-0500-7-581.

学会発表

1. 藤井英樹、豊田秀徳、村上善基. エクソソーム中のマイクロ RNA 発現解析は脂肪肝診断に有用である. 第 18 回 日本肝臓学会大会 シンポジウム 平成 26 年 10 月 23 日 神戸市
2. 村上善基 miRNAによる肝線維化の抑制 第41回日本毒性学会学術集会 シンポジウム 平成26年7月3日 神戸市

H. 知的財産権の出願、登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし