

血清中エクソソームを利用した膵がん診断法の開発

名古屋市立大学大学院医学研究科

分子毒性学分野 講師 深町勝巳

膵がんは罹患数と死亡数がほぼ同数である予後不良な難治癌である。近年の研究により、膵臓に最初の突然変異がおきてから死亡するまでに 20 年以上かかっていることがシュミレーションされた。したがって、膵がんの予後が不良な理由は、他の固形がんと比べて進展が早いのではなく、早期診断がされていないためだと考えられる。膵がんの克服には早期診断/治療が重要であるが有効な診断方法は確立されておらず早期診断方法の開発が急務である。ヒト検体を用いた研究では、種々の遺伝背景や生活環境の違いにより多くのノイズが入るため膨大な数の検体を調べる必要がある。ヒトに対し、遺伝的に均一で同一の飼育環境で調べられる動物モデルは有用であり、膵がんモデル動物を用いることにより従来よりも簡便に膵がんの診断マーカーを同定できる可能性がある。

本研究においては、膵がんモデル動物を用いて膵がんが分泌する因子、特に核酸・タンパク等を内包し細胞間の情報伝達の役割を担っているエクソソームに着目し、膵がんの診断へ応用するための基礎的な研究を行った。がん細胞から分泌されたエクソソームは血液中でも存在すると考えられることから血液中のがん特異的なエクソソームを検出することが可能になれば膵がんの診断に応用できると考えられる。特に、小分子 RNA である miRNA は血清中エクソソーム中で安定に存在するため膵がんの診断の指標として有用であると考えられる。我々は、Cre/loxP システムを用いたヒト活性型 KRAS トランスジェニックラットを確立し、Cre recombinase 発現アデノウイルスを膵臓に感染させ、活性型 KRAS を発現させることにより、これまで動物に発生させることが困難であったヒト膵管がんの極めて類似した間質の豊富な膵管由来の膵管がんを発生させる方法を開発してきた。ヒト活性型 KRAS トランスジェニックラットにおいて活性型 KRAS を膵臓に発現させるために、Cre recombinase を発現するアデノウイルスをラットの膵臓に注入した。4 週間後に採血、解剖を行った。膵臓には多数の白い結節がみられ、それらは病理解析の結果、間質の豊富な膵

管がんであった。エクソソームを検出するための指標として、エクソソームに内包されている miRNA に着目した。エクソソームは血中にも放出されると考えられるため、血清より miRNA を抽出し、膵がんを発生したラットにおいて発現変化する miRNA をリアルタイム RT-PCR により検索した。Cre recombinase 発現アデノウイルスにより膵がんを発生させた膵がんラットおよび空ベクターを投与したコントロールラットの血清より RNA を抽出し miRNA リアルタイム RT-PCR 解析を行った。ヒト膵がん患者において既に発現増加が報告されている miRNA が本膵がんモデルラットの血清中においても同様に発現増加しているかリアルタイム RT-PCR により解析した。これまでに、ヒト膵がんにおいて発現亢進・低下している miRNA が多数報告されている。膵がん細胞の増殖に関与する miRNA としては、miR-150、miR-34a、miR-96a、miR-203、let-7、miR-124、生存に関与するものとして miR-27a、miR-21、miR-150、miR-424-5p 等が報告されている。また、浸潤や転移に関与するものとしては、miR-150、miR-27a、miR-143、miR-126、miR-146a、miR-10a、miR-34b 等が報告されている。さらに、前がん病変である PanIN-1、-2 において、miR-129-3p、miR-130b、miR-133a、miR-148a/b、miR-151-5p、miR-185、miR-200c 等が高発現していることも報告されている。これらヒト膵がんが発現変化する miRNA のうち、これまでに本研究により 3 個の miRNA がラット膵がんモデルの血清中においても共通に発現増加していることが分かった。今後、これら miRNA がエクソソームに含まれるか検討したい。miRNA によりエクソソーム精製不要で効率的で高感度な検出系が確立できれば膵がんの診断に有用である。

最近、エクソソームにより膵がんの診断が可能となる成果が報告された。細胞表面プロテオグリカンのグリピカン 1 (GPC1) というエクソソームに発現する膜タンパク質を検出することにより膵がんの診断を超早期に行うことが可能になったことが示されている。超早期の膵がんを検出するだけでなく、膵臓の良性疾患との鑑別も可能であり、エクソソームによる膵がんの診断に有用としている。したがって、画像診断では発見することができない早期の膵がんを血液中のエクソソームにより発見できる可能性がある。臨床的に実現するには多くの課題があるが、エクソソームによる診断の可能性が大きく期待される。