

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	後藤 拓磨
<p>学位論文題目</p> <p>An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker</p> <p>: 血清エクソソーム中microRNA-191, -21, -451aは膵腫瘍の有用な診断マーカーとなり得る</p> <p>共著者名</p> <p>藤谷幹浩, 小西弘晃, 笹島順平, 藤林周吾, 林明宏, 内海辰哉, 佐藤裕基, 岩間琢哉, 井尻学見, 坂谷慧, 田中一之, 野村好紀, 上野伸展, 嘉島伸, 盛一健太郎, 水上裕輔, 高後裕, 奥村利勝</p> <p style="text-align: right;">BMC cancer 2018;18:116.</p> <p>研究目的</p> <p>膵癌は極めて予後不良であるため, 早期診断が可能な新規バイオマーカーの開発は急務とされている。血清中microRNAのマーカーとしての可能性は示唆されているが, 膵癌や前癌病変と考えられる膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)における意義は明らかになっていない。近年, 血清中のmicroRNAはエクソソームという小胞体に包埋され安定化していることが報告されており, 本研究では, 膵腫瘍における血清エクソソーム中microRNAの有用性につき評価することを目的とした。</p> <p>材料・方法</p> <p>膵癌32例, IPMN29例, そして腫瘍性病変のないコントロール22例, の3群を対象とした。サンプルは血清250<math>\mu</math>lを用い, Exoquick-TCによるポリマー充填法にてエクソソームを精製した。まず各群におけるエクソソーム量の差を表面マーカーであるCD63のELISA法にて比較した。続いて次世代シーケンサーによる網羅的解析により3群間で有意差のあるエクソソーム中microRNA(ExmiR)を検索し, その候補ExmiRsの発現をqRT-PCRにて確認した。さらに候補ExmiRsについて, 疾患ごとのみならず, 転移のない膵癌と転移性膵癌における診断能についても, ROC曲線により評価した。また膵癌においては治療効果や予後, IPMNにおいては福岡クライテリア (High risk stigmata:悪性を強く示す所見, Worrysome feature : 悪性の疑いを示す所見) に則した臨床所見とExmiRsとの関連についても解析した。</p>			

(ページを入れる)

※用紙の大きさは, A 4判とし23×17cmの枠内におさめ, パソコン等で印字すること。

※用紙は, 各自で作成すること。

## 成 績

CD63ELISAにて3群間のエクソソーム量に有意差は認めなかった。次世代シーケンサーを用いた網羅的なExmiRの発現解析により、ExmiR-191, -21, -451aが3群間で有意な診断マーカー候補miRとして抽出された。3つの候補miRはコントロール群と比較し、IPMN群および膵癌群で有意に発現が亢進していることが、qRT-PCRにて確認された。またエクソソームを回収せず血清からそのまま精製したmiR (Circulating miR; CmiR) の発現は、コントロール群に比べてIPMN群および膵癌群で有意差は認めなかった。ROC解析においても、ExmiRsの膵癌およびIPMNの正診率は高く、特にIPMNや転移のないStage1/2a膵癌での正診率が既存の腫瘍マーカーよりも高い傾向を示した。IPMNにおいては、福岡クライテリアで進行度の指標となる結節を持つ症例にて有意にExmiR-451aの発現が高く、その他リスクとなる嚢胞径や主膵管拡張との関連も認めた。膵癌においては、ExmiR-21の発現が高い症例で、有意に化学療法は不応であり、また予後も悪かった。

## 考 案

本検討は、膵癌およびIPMNの血清ExmiRを次世代シーケンサーにて解析し、その臨床的意義を明らかにした初めての研究である。既報のCmiRsは膵腫瘍群とコントロール群で差がなく、ExmiRsでのみ有意差を認めたことは、ExmiRsのバイオマーカーとしての可能性を示したと考える。またIPMNや転移のない膵癌の診断において既存の腫瘍マーカーよりも診断能が高い傾向を示したことは、早期診断マーカー開発につながる可能性もある。miR-191および-21は腫瘍関連miRと報告されており本研究結果と合致する一方、miR-451aは腫瘍抑制miRとする報告が多い。451aのエクソソーム中での発現亢進は腫瘍増殖に伴うフィードバックを捉えている可能性が考えられる。実際にIPMNの進行度が高くなるにつれて発現が亢進していたのはExmiR-451aであった。これらより、ExmiRsは膵腫瘍の進展過程のなかで、IPMNの発生から癌へと進展する過程で上昇することが明らかになり、ExmiR-451aは癌化の早期マーカーとなる可能性が示唆された。また、膵癌においては、化学療法の不応例でExmiR-21が高い結果となり、それとともに予後不良となることも明らかとなった。ExmiRsは膵腫瘍の発生と進展過程のみならず、その治療経過における指標としても有用であることが示唆される。

## 結 論

血清中ExmiRsを解析することにより、早期の段階から膵腫瘍の診断が可能となり、また膵癌の治療経過や予後予測の指標となり得る。これらの知見は、非侵襲的な新規バイオマーカー戦略の開発を促進し得る。




引用文献

- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. PLoS One. 2012; 7: e30679.
- Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishi T, Iwatsuki M, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. Cancer. 2013; 119(6): 1159-67.
- Köberle V, Pleli T, Schmithals C, Augusto Alonso E, Hauptenthal J, Bonig H, et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers. PLoS One. 2013; 8(9): e75184.

参考文献

- Takuma Goto, Junpei Sasajima, Kazuya Koizumi, Yoshiaki Sugiyama, Toru Kawamoto, et al. Primary Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinoma of the Extrahepatic Bile Duct. Internal medicine. 2016; 55: 1581-1584.
- 後藤拓磨, 齋藤博哉, 柳川伸幸, 藤永明裕, 斎藤義徳. 切除不能胆嚢癌における動注化学放射線療法 (AI+RT) の検討. 胆道. 2013; 27(5): 795-804.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	後藤 拓磨
		審査委員長	西川 祐司 
		審査委員	谷口 隆信 
		審査委員	古川 博之 
学位論文題目			
<p>An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker (血中エクソソーム中 microRNA-191, -21, -451a は膵腫瘍の有用な診断マーカーとなりうる)</p> <p>掲載雑誌 : BMC Cancer 18:116, 2018</p>			
<p>膵癌は最も予後不良の悪性腫瘍の 1 つであり、早期診断のためのバイオマーカーの開発が切望されている。近年、血清中 microRNA (miRNA) のバイオマーカーとしての有用性が注目されているが、膵癌の早期診断や前癌病変である膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の診断における意義は不明であった。</p> <p>本研究は、多数の対照患者、膵癌患者、IPMN 患者の血液から miRNA を含むエクソソームを精製し、新たなバイオマーカーを見出す試みである。申請者は各グループから 5 例ずつを無作為に選び、次世代シーケンサーで網羅的に解析し、miR-191, -21, -451a が患者群で上昇することを見出した。その後、RT-PCR による解析で、実際にこれらの miR が対照患者に比べ、膵癌患者、IPMN 患者で有意に高値であることを確認した。なお、エクソソームに含まれずに血中に遊離して存在する miRNA (CmiR) の解析では有意な差は認められず、エクソソーム内で安定化した ExmiR がマーカーとして優位性を持つことが明らかになった。特にステージ 1/2a 膵癌や IPMN での正診率は CEA や CA19-9 などの既存のマーカーよりも高い傾向がみられた。IPMN では画像上より高い進行度が疑われる症例で miR-451a が高値であった。さらに、化学療法不応性で予後の悪い膵癌症例では miR-21 がより高い傾向が認められた。</p> <p>これまで miR-191 と miR-21 は腫瘍関連 miR であることが報告されており、本研究で得られた結果と矛盾しない。一方、miR-451a は腫瘍抑制 miRNA であることを示す実験結果が報告されている。申請者らは IPMN を含めた膵腫瘍の進展においてフィードバックにより miR-451a の発現が増加するとともに、エクソソームに包埋され、腫瘍細胞外に放出されているとの仮説を提唱しており、今後の検証が待たれる。</p> <p>申請者は審査委員の質問に適切に応答し、関連領域の知識も十分であると考えられた。慎重な討議の結果、本論文は学位論文にふさわしいとの結論に至った。</p>			