

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

ヒト膵管腺がんモデルラットのオミクス解析に関する研究

藪下 晴津子

2013年

目次

緒論	3
第 1 章 ヒト膵管腺がん (PDAC) モデルラットのプロテオミクス解析	7
第 1 節 緒言	7
第 2 節 材料と方法	8
第 3 節 結果	12
第 4 節 考察	17
第 2 章 ヒト PDAC モデルラットの miRNA 解析	19
第 1 節 緒言	19
第 2 節 材料と方法	20
第 3 節 結果	24
第 4 節 考察	33
第 3 章 ヒト PDAC モデルラットのメタボロミクス解析およびトランスクリプトミクス解析	36
第 1 節 緒言	36
第 2 節 材料と方法	36
第 3 節 結果	40
第 4 節 考察	58
総括	62

謝辭.....	65
参考文献.....	66
略語.....	71

緒論

毎年、日本では約 20,000 人、米国では約 30,000 人が膵がん罹患しており、膵がんは日米ともにがんの死亡原因の第 5 位である。膵がんは、治癒が期待できる早期に特有な症状はなく、診断が非常に難しいため、進行がんで見つかることが多い。そのため、患者の多くは 1 年以内に死亡し、5 年生存率は 5% 未満である [1]。膵臓は、膵液を産生する腺房、膵液を運ぶ膵管、および内分泌腺であるランゲルハンス島からなる。膵がんはこれらのいずれの組織からも発生しうるが、膵がんの 95% は膵管が腫瘍化した膵管腺がん (PDAC) と診断される。PDAC の組織学的特長は、膵管由来と考えられるがん細胞の増殖ならびにがん細胞の他の組織への浸潤である。間質の強い線維増生や他の器官への転移を伴うこともある。また、PDAC の分子生物学的特長として、がん全体ではがん遺伝子 Ras の活性化が 40% 以下であるのに対し、PDAC では 90% 以上において認められることが挙げられる [2]。膵がんのバイオマーカーとして臨床的に CA19-9 が広く用いられている。CA19-9 は血液型抗原の一種である Lewis A にシアル酸が付加した糖鎖抗原 (シアリル Lea 抗原) で、膵がんにおいて大量に作られ、血清中に増加する。しかし、胆管炎、膵炎および他のがん種においても上昇するため特異性に問題があり、感度も悪い [3-5]。よって、膵がんの早期診断には適当でない [6]。そのため、特異性と感度に優れたバイオマーカーを早急に確立することが期待される。

近年の分析技術の発達に伴い、タンパク、生体反応における代謝産物および

RNA (mRNA やタンパクをコードしない micro RNA (miRNA) 等) などの生体内物質の網羅的解析が可能となった。これらはそれぞれプロテオミクス解析、メタボロミクス解析およびトランスクリプトミクス解析と呼ばれ、これらを合わせてオミクス解析と呼ばれる。オミクス解析は疾病の診断、治療効果判定あるいは副作用検出などに対する新規バイオマーカーの探索に有用であると期待されている。この状況のもと、PDAC の新規バイオマーカー探索を目的とした多くのオミクス解析の成績が報告されているが、これらの解析の多くは、早期 PDAC 患者サンプルの入手が困難なため、進行期 PDAC 患者サンプルを使用している。また、PDAC 診断の新規バイオマーカーの特異性は、PDAC 患者サンプルと他の膵疾患患者サンプルを比較することにより検証される。そのため、PDAC 患者サンプルの入手だけでなく、他の膵疾患患者サンプルを入手する必要がある。このようなことから、解析に患者サンプルを必要とする新規バイオマーカー探索にはいくつかの制限や困難を伴う。一方、ヒト PDAC モデル動物では、がんの進行段階の限定、繁殖時期の統一、飼育環境の制御および標準化が可能であるため、個体間のばらつきを低減することができるという利点がある。したがって、ヒト PDAC モデル動物の使用は、PDAC 患者サンプルの使用よりも新規バイオマーカーの探索に現実的であると考えられる。実際に、現在までに次に述べるいくつかのヒト PDAC モデル動物が確立された。

Syrian ハムスターは propyl nitrosamine 投与によって組織学的にヒト PDAC と似たがんを発現する [7]。この動物の膵がんには、ヒト PDAC に特徴的であるがん遺伝子 *K-ras* の活性化が高頻度に認められた [8]。しかし、こ

のモデル動物には、発がん物質の臓器に対する非特異性、動物サイズが小さいために少ないサンプル量、specific pathogen free (SPF) 化の困難性などの欠点がある。

マウスモデルには、elastase プロモーターにより制御されるヒト *K-ras*^{G12V} あるいは *H-ras*^{G12V} 遺伝子を有する遺伝子組換えマウスがある [9, 10]。これらのモデルにおける PDAC は膵腺房細胞から発生していると考えられる。ヒト PDAC の組織発生母体は今のところ不明であるが、診断バイオマーカー検索の観点より、ヒト PDAC での関与が低い組織発生母体からがんが生じたモデル動物はヒトに対するモデルとしては適さないと考えられる。

Cytokeratin 19 プロモーターにより制御されるヒト *K-ras*^{G12V} 遺伝子組換えマウスでは膵腺房細胞や島細胞に形態的な変化はなく、膵管上皮細胞の過形成が認められたが、発がんには至らなかった [11]。最近、膵組織の前駆細胞において *K-ras*^{G12V} 変異タンパクが内因性 *K-ras* タンパクと同程度に発現したモデルマウスが作成され、組織学的にヒト類似の前がん病変が認められた [12]。がん抑制遺伝子 *Ink4a/Arf* を不活化した膵組織の前駆細胞において、この *K-ras*^{G12V} 変異タンパクを発現させた場合、がんは浸潤、転移しやすくなった [13]。これらの病変は、ヒト PDAC の前がん病変である上皮内腫瘍 (pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIn)) および PDAC 自体に類似しているが、組織発生母体が不明でシステム上、発がんを制御できないという欠点がある。PanIn の組織学的特長は、膵管上皮細胞の過形成や異形性が認められるものの、これらの細胞が上皮内に留まった病巣であり、他組織への浸潤や他器官への転移は

認められない。

導入されたヒトがん遺伝子の発現が Cre/lox システムによって制御されるヒト PDAC モデルラットが津田らの研究グループによって確立された [14-16]。本モデルラットでは Cre 遺伝子を有するアデノウイルスをヒト H-ras^{G12V} あるいは K-ras^{G12V} トランスジェニックラットの総胆管を通して膵管へ注入することによって Ras がん遺伝子発現を活性化、制御する。ウイルス注入後約 2 週間で PanIn および PDAC が発生する。これらの病変は免疫組織学的特長がヒトの PDAC に類似している。このように、前述のハムスターやマウスのモデルはヒト PDAC モデルとして不適切と考えられるが、本モデルラットはヒト PDAC のモデルとして適切であると考えられる特徴を有する。

また、血液サンプルは、採取に伴う生体への侵襲が小さいので、経時的に病気の進行をモニターするのに有用である。血液中の特定物質の量や発現が特定のがん種の進行度と一定の感受性と特異性を持つ場合に、これはバイオマーカーの有力な候補となる。

そこで、我々はヒト PDAC モデルラットから採取した膵組織および血清を用いて、プロテオミクス解析 (第 1 章)、miRNA 解析 (第 2 章)、およびメタボロミクス・トランスクリプトミクス解析 (第 3 章) を実施し、ヒト PDAC モデルラットがヒト PDAC の新規バイオマーカー候補の探索に有用であることを証明し、ヒト PDAC の血中における新規バイオマーカー候補を見出した。

第 1 章 ヒト膵管腺がん (PDAC) モデルラットのプロテオミクス解析

第 1 節 緒言

近年、プロテオミクス解析技術は、自動二次元電気泳動法、質量分析法や抗体アレイに見られるように急速に発達した。そのため、プロテオミクス解析を用いて、膵がんを含むがんの診断や進行のバイオマーカーの探索研究が広く実施されている [17-30]。質量分析のなかで *isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ)* 法は 2 つのタンパクサンプル間での発現比を求めるのに有用な解析法である。iTRAQ 試薬には 4 種類の試薬 (114、115、116、117) があり、1 回の分析で同時に最大 4 個のサンプル間でタンパク発現量の比較ができる。iTRAQ 試薬は酵素消化されたタンパクサンプルのペプチド N 末端アミノ基およびリジン残基と反応して共有結合する。次に、iTRAQ 試薬に結合したペプチドサンプルを質量分析すると、113~119 *m/z* の領域にピークが現れる。2 つのタンパクサンプル間でのピーク面積を比較することにより、ペプチドの相対量を測定することが可能である。すなわち、この値がタンパクサンプル間での発現比となる。

ヒト PDAC モデルラットがヒト PDAC の新規バイオマーカーの探索に応用可能であるためには、モデルラットにおいて増加するタンパクが PDAC 患者においても増加していることが望ましい。本研究では、我々が樹立したヒト *H-ras^{G12V}* トランスジェニックラットを用いてヒト PDAC モデルを作成し、PDAC 患者の膵がん組織において発現が増加することが報告されている

tropomyosin 4 および lamin-A の発現が本トランスジェニックラットの PDAC においても増加することを確認した。次に、iTRAQ および liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて本モデルラットの膵がんおよび正常膵組織を材料にプロテオミクス解析した。さらに、本トランスジェニックラットの膵がん組織で発現増加が認められたタンパクが PDAC 患者の膵がん組織においてもその発現が増加しているか否かを文献的に調査した。

第 2 節 材料と方法

2-1 動物

ヒト *H-ras*^{G12V} トランスジェニック (Hras250) 雄性ラットを室温 23±2°C、湿度 50±10%、12 時間/12 時間の明暗サイクルに制御された動物室にて、木屑を敷いたプラスチックケージ内にて飼育した (~3 匹/ケージ)。餌と水道水は自由に摂取させた。動物は試験終了まで毎日観察した。サンプル採取時にはイソフルランにて深麻酔し安楽死させた。動物試験は National Research Council (1996) の実験動物の飼育と使用のガイドラインおよび名古屋市立大学医学研究科の動物実験のためのガイドラインに従って実施した。実験計画書は本医学研究科の動物実験委員会によって承認された。

2-2 PDAC の誘発

4x10⁹ pfu/mL DMEM の *Cre* 遺伝子を有するアデノウイルスベクター (AxCANCre) 150 μ L を 4 匹の 6~30 週齢雄性 *Hras250* ラットの総胆管を通して膵管に注入し、*Hras250* PDAC ラットとした。AxCANCre 注入から 3~7 週後に動物を安楽死させた。

2-3 病理学的検索

膵臓を摘出し、リン酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋した。膵組織を 3 μ m の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡にて観察した。

2-4 免疫組織化学

膵組織より作成したスライドを 1 次抗体 (抗 tropomyosin 4 抗体、希釈率 1:200 ; ウサギポリクローナル、Chemicon International、CA あるいは抗 lamin-A 抗体、希釈率 1:50 ; ウサギポリクローナル、Abcam、東京) で 60 分間室温にてインキュベートした。次に 2 次抗体 (前者には Histofine Simple Stain Rat MAX-PO (MULTI、ニチレイ、東京)、後者には VESTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories、CA) にて室温でインキュベートし、diaminobenzidine (DAB) にて染色した。細胞の核をヘマトキシリンで弱く染色した。

2-5 タンパクサンプルの調製

2-3 のパラフィン包埋組織を 10 μm の厚さに薄切し、スライドグラスに載せ、60°C で 30 分間温めてパラフィンを溶解した。キシレンでの脱パラフィン、エタノール溶液と蒸留水での再水和後にヘマトキシリンで染色した。光学顕微鏡で観察しながら 8 mm^2 (約 30,000 細胞) の腓がん組織とその近接した正常腓組織をそれぞれスパチュラで採取した。Liquid Tissue 緩衝液 (Expression Pathology Inc、Gaithersburg、MD) を使い、採取した組織からタンパク溶解液を作成した。

2-6 iTRAQ サンプルの調製

4 匹の Hras250 PDAC ラットの腓がん組織より作成した 2-5 のタンパク溶解液をプールして 1 つのタンパク溶解液を作成した。また、4 匹の同動物の正常腓組織より同様にして 1 つのタンパク溶解液を作成した。タンパク溶解液の一部 (54 μL) に 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む denaturant を 2.7 μL 添加して変性させた。50 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) を含む Reducing Reagent を 5.4 μL 添加して 60°C にて 1 時間還元後、200 mM methylmethanethiosulfonate (MMTS) を含む Cystein-Blocking Reagent を 2.7 μL 添加して室温にて 10 分間アルキル化した。さらに、67.5 μg の trypsin および 599.4 μg の CaCl_2 を含む trypsin 溶液を 27 μL 添加し 37°C で一晩インキュベートしてペプチドに分解した。ペプチドサンプルを、遠心減圧濃縮機にて完全に乾燥し、0.5M triethylammounium biocarbonate (TEAB) を含む 30 μL Dissolution Buffer (pH8.5) に再混和した。正常腓組織

由来のペプチドサンプルは充分量の iTRAQ 試薬 116 と混和、がん組織由来のペプチドサンプルは充分量の iTRAQ 試薬 117 とそれぞれ混和して室温にて 1 時間インキュベートしてラベルした。正常膵組織由来のペプチドサンプルとがん組織由来のペプチドサンプルを混合し、陽イオン交換カラム (Cation exchange cartridge、Applied Biosystems、CA) にて精製し遠心減圧濃縮機にて乾燥した。乾燥サンプルは 500 μ L の 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid + 2% (v/v) acetonitrile 溶液に溶かし、Sep-Pac C18 カートリッジ (Waters Corporation、Ireland) にて固層抽出後、遠心減圧濃縮した。

2-7 LC-MS/MS

前述の iTRAQ サンプルを 17 μ L の 0.1% (v/v) ギ酸に溶解し 5 μ L 溶解液を Dina-AI オートインジェクションシステム (KYA TECH Corporation、カラム HiQ Sil C18-3 (内径 0.15 mm x 長さ 50 mm)、溶出溶媒 A: 0.1% ギ酸、B: acetonitrile、濃度勾配 B: 2~70% (150 分、リニアグラジェント)) で溶出した。溶出液は QSTAR Elite LC-MS/MS システム (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies) により陽イオンナノフロー電子スプレー分析を行った。飛行時間型 (time-of-flight mass spectrometry (TOFMS)) サーベイスキャン (m/z 400~1800、0.5 秒間) を行い、Information-dependent acquisition モードにて MS/MS 分析するイオンを効率的に選択した。10 カウント以上の intensity の上位 3 個の多価イオンを MS/MS 分析した。サンプル間のタンパク発現の定量比較に用いられる m/z 113~119 のピークの分析精度を高めるた

めに、 m/z 50~2,000 の範囲のイオンスペクトルを Enhance All for the iTRAQ モードで 2 秒間蓄積した。LC-MS/MS 分析を 3 回行い、平均値を採用した。

2-8 データ解析

LC-MS/MS データは ProteinPilot v2.0 ソフトウェア (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies) を用いてタンパク同定および発現量比較を行った。ProteinPilot でのタンパク同定の信頼性が 66% 以上 (ProtScore \geq 0.47) のデータを採用した。

第 3 節 結果

3-1 肉眼および組織学的所見

肉眼的には膵組織全体に白色調の腫瘍が認められた。組織学的には膵に進行した PDAC 像を認めた。PanIn 像は認めなかった。腫瘍の間質は様々な量の線維の増生を伴っており、炎症性細胞浸潤が部分的に認められた。加齢に伴う病理組織学的変化は認めなかった。遠隔転移は認めなかった。Figure 1A および 1B に代表的な PDAC 像と正常膵組織像を示す。

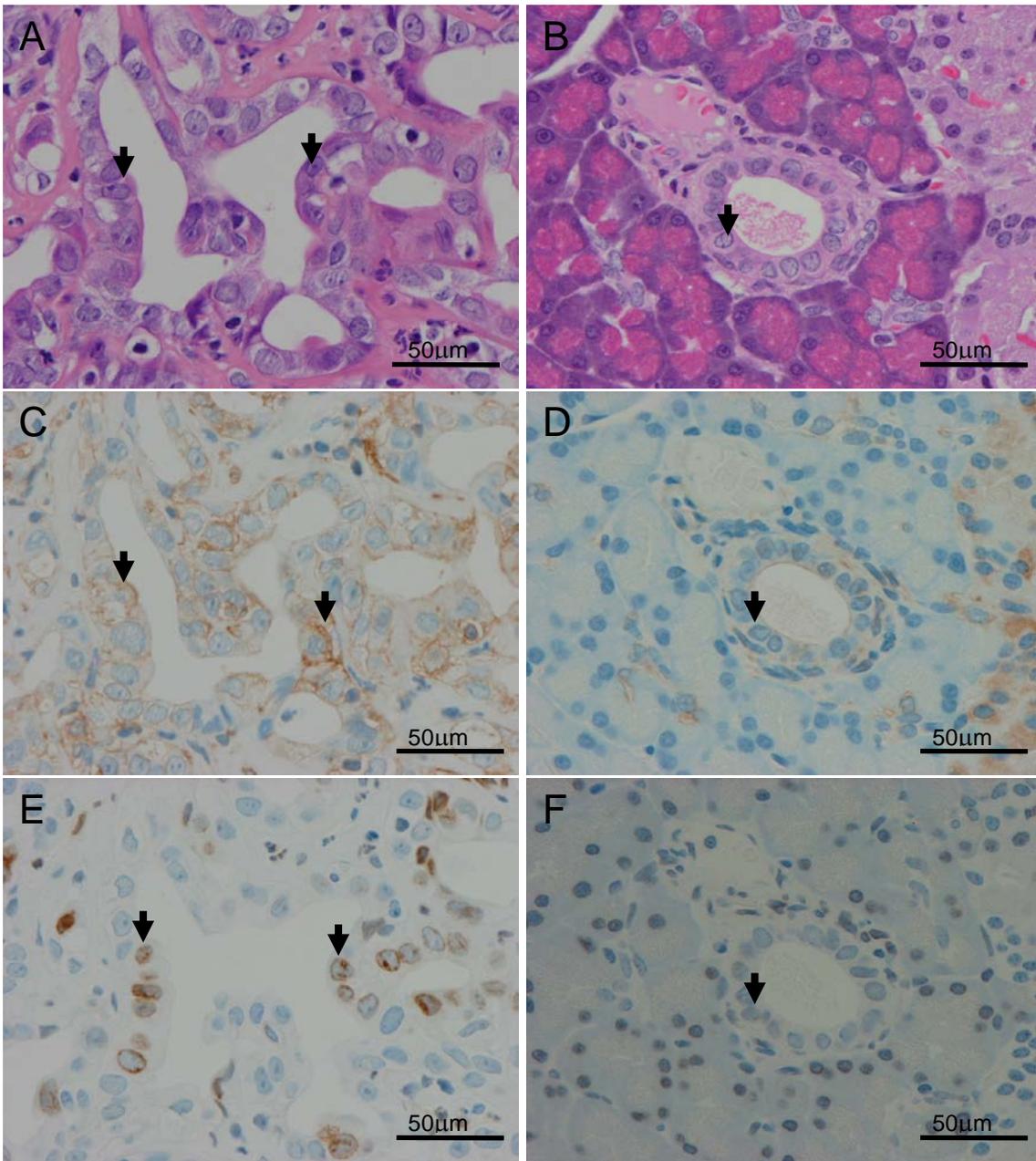


Figure 1. Histological and immunohistochemical appearance of pancreatic tissues of Hras250 PDAC rats sacrificed 3 to 7 weeks after injection of recombinant AxCANCre into the pancreas. Panels A, C, and E are adenocarcinomas, and panels B, D, and F are normal-appearing exocrine glands and a duct in rats given AxCANCre. The atypical glands in the adenocarcinoma show an irregular back-to-back appearance imposed by tumor cells with atypical nuclei. (A, B) HE staining. (C, D) Immunohistochemical staining for tropomyosin 4. (E, F) Immunohistochemical staining for lamin-A. Arrows point to ductal epithelial cells. Note the stronger positive staining for tropomyosin 4 in the cytoplasm and lamin-A in the nucleus of ductal adenocarcinoma cells compared to ductal cells in the adjacent normal-appearing tissue.

3-2 免疫組織化学的解析所見

プロテオミクス解析により文献上、ヒト PDAC で発現増加が認められた報告がある tropomyosin 4 および lamin-A について、Hras250 PDAC ラットにおいてこれらのタンパクの発現状況を調べるために膵がん組織および正常膵組織を免疫組織化学染色した。抗 tropomyosin 4 抗体による染色では、膵管がん細胞およびその周囲に存在する線維芽細胞の細胞質が弱く染色されたが (Figure 1C)、正常膵組織は染色されなかった (Figure 1D)。また、抗 lamin-A 抗体による染色では、一部の膵管がん細胞の核が染色されたが (Figure 1E)、膵管がん細胞の周囲に存在する線維芽細胞および正常膵組織は染色されなかった (Figure 1F)。したがって、少なくとも本実験の条件下で、本モデル動物の膵がん組織における tropomyosin 4 および lamin-A の発現は正常膵組織に比べて増加していることが示された。

3-3 プロテオミクス解析所見

Hras250 PDAC ラットの膵がん組織および正常膵組織を用いてプロテオミクス解析を行った。解析にはパラフィン包埋組織を用いた。膵がん組織および正常膵組織において、パラフィン包埋組織をトリプシン消化しペプチドに分解したサンプルを用いた解析で同定されたタンパクは合計 94 個であった。同定されたこれら 94 個のタンパクを Ingenuity Knowledge Base (www.ingenuity.com) の遺伝子オントロジー命名法により分類すると局在は細胞外間隙、細胞質、核、原形質膜および不明であった。

同定された 94 個のタンパクのうち 30 個のタンパクの発現が膵がん組織において正常膵組織に比べて 1.5 倍以上増加した (Table 1)。発現が増加した 30 個のタンパクのうち、20 個のタンパクおよび 1 個の mRNA [31]に関して、文献的にヒト膵がん組織での発現増加の報告が確認された [17-29, 31]。プロテオミクス解析では、膵がん組織において tropomyosin 4 および lamin-A の発現の増加を認めた。この所見は本研究の免疫組織学的解析所見の結果と矛盾しない。

Table 1. Upregulated proteins in PDAC compared to normal tissues

Gene symbol	NCBI accession number	Name of protein	Fold change	P-value	Sequence Coverage (%)	Cellular location	Reported in human PDAC
COL1A1	gi 83301554	Collagen α -1(I) chain precursor	10.21	0.00	78.7	ES	Yes
COL3A1	gi 83301602	Collagen α -1(III) chain precursor	8.94	0.00	64.7	ES	Yes
COL1A2	gi 19855071	Collagen α -2(I) chain precursor	8.41	0.00	75.4	ES	Yes
VIM	gi 401365	Vimentin	8.29	0.00	28.1	C	Yes
KRT19	gi 73920214	Keratin, type I cytoskeletal 19	6.71	0.00	57.8	C	Yes
TPM4	gi 136081	Tropomyosin α -4 chain	6.38	0.00	42.3	C	Yes
ANXA2	gi 584760	Annexin A2	6.23	0.01	24.5	PM	Yes
ANXA1	gi 113947	Annexin A1	5.66	0.01	44.2	PM	Yes
KRT8	gi 1708592	Keratin, type II cytoskeletal 8	4.99	0.00	67.7	C	Yes
ALB	gi 124028612	Serum albumin precursor	3.86	0.00	38.8	ES	Yes
GAPDH	gi 122065190	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3.69	0.01	34.2	C	Yes
	gi 90101450	Histone H2A type 1-E	3.33	0.00	66.2		Yes
HIST1H2 BC	gi 399856	Histone H2B type 1	3.22	0.00	56.0	N	
HIST1H1 D	gi 1170152	Histone H1.2 (H1d)	2.95	0.00	21.5	N	
TUBA1C	gi 55976169	Tubulin α -1C chain	2.89	0.00	27.8	C	
KRT18	gi 73621121	Keratin, type I cytoskeletal 18	2.89	0.00	49.9	C	
LMNA	gi 1346413	Lamin-A	2.86	0.00	45.6	N	Yes
YWHAB	gi 1345591	14-3-3 protein β/α	2.63	0.00	22.4	C	Yes†
LDHA	gi 126051	L-lactate dehydrogenase A chain	2.48	0.00	28.6	C	
PRSS3	gi 136417	Cationic trypsin-3 precursor	2.28	0.00	75.3	ES	
ANXA5	gi 4033508	Annexin A5	2.24	0.00	42.6	PM	Yes
TUBB2C	gi 81892373	Tubulin β -2C chain	2.24	0.00	29.0	C	Yes
PRSS2	gi 2851507	Anionic trypsin-2 precursor	2.24	0.00	55.7	ES	
HBA2	gi 122477	Hemoglobin subunit α -1/2	2.15	0.00	69.0	C	
HBB	gi 122514	Hemoglobin subunit β -1	2.13	0.00	59.9	C	
GDI2	gi 13626886	Rab GDP dissociation inhibitor β	2.12	0.01	21.8	C	Yes
ACTN1	gi 13123942	α -actinin-1	1.98	0.04	21.4	C	Yes
PDIA3	gi 1352384	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	1.88	0.00	25.3	C	Yes
VCP	gi 1174637	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1.54	0.02	29.2	C	Yes
TXN	gi 135776	Thioredoxin	1.50	0.01	12.4	C	Yes

P-values were calculated by ProteinPilot software.

ES: Extracellular space, C: Cytoplasm, PM: Plasma membrane, N: Nucleus, U: Unknown

†: A transcriptional increase was reported [31].

第 4 節 考察

本研究によりヒト PDAC において発現が増加することが報告されている tropomyosin 4 および lamin-A の発現は Hras250 PDAC ラットに発生した膵がんにおいても正常膵組織に比べて増加することが証明された。さらに、LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析では Hras250 PDAC ラットの膵がんにおいて発現が増加した 30 個のタンパクを同定した。これらのうち 20 個のタンパクと 1 個の mRNA [31]についてはヒト PDAC における発現増加が文献上報告されており [17-29, 31]、本モデル動物の膵がんにおいて発現が増加したタンパクの約 7 割がヒト PDAC において発現増加するタンパクと一致することが示された。本研究において解析用サンプルとして使用した膵がん組織は進行がんであったが、本モデル動物の PanIn などの前がん病変はヒト PDAC の早期病変と組織学的に類似している [14] ことから、本モデル動物の前がん病変において発現が増加するタンパクはヒト PanIn においても増加している可能性がある。したがって、本モデル動物はヒト PanIn などの早期病変をターゲットとするバイオマーカー探索に応用可能であると考えられた。本モデル動物の膵がん組織において発現が増加していた残りの 9 個のタンパクはヒト PDAC において発現増加したという報告はない。よって、これらのタンパクのヒト PDAC での特異性についてはさらなる検討が必要である。

本研究のプロテオミクス解析にはパラフィン包埋組織サンプルを使用した。このサンプルは新鮮組織や凍結組織に比べてタンパク発現測定之感度が劣るが、光学顕微鏡下に観察しながら組織サンプルを採取する事が可能なため次の利点

がある。(i) 膵がん組織と正常組織の混在を防ぐことができる。(ii) 膵管と腺房細胞のプロテオームプロファイルは異なっていると思われるが、膵がん組織と正常膵組織とのプロファイルを正確に比較することが可能である。(iii) 膵がん組織を病理組織学的に正確に診断することができる。したがって、膵がん組織のプロテオミクス解析にパラフィン包埋組織を使用するのは妥当な選択である。

まとめると、Hras250 PDAC ラットの膵がん組織および正常膵組織のプロテオミクス解析により膵がんにおいて発現が増加したタンパクの約 7 割がヒト PDAC においても増加することが報告されているタンパクと一致することが分かった。Hras250 PDAC ラットの前がん病変はヒト PanIn と類似しているため、本モデル動物はヒト PDAC の早期診断のためのバイオマーカー候補の探索に有用であると考えられた。

第 2 章 ヒト PDAC モデルラットの miRNA 解析

第 1 節 緒言

miRNA は配列が保存されている 18~24 塩基ほどの 1 本鎖 RNA であり、タンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA の 1 種である。miRNA は標的 mRNA の 3' 側非翻訳配列と相補的な塩基対によって mRNA の安定性や翻訳効率を制御する [32]。miRNA による転写制御は増殖、分化、組織発達および細胞死において重要な役割を果たすことが知られている [33]。また、膵がんを含む様々な疾患の主要病変での miRNA の異常発現が報告されている [34, 35]。近年、miRNA が血漿/血清においても検出できること、血漿/血清中の miRNA の異常発現は生理学的変化やがんを含む様々な疾患における病態を反映していることが示された。最近、PDAC 患者の血漿における miR-21、miR-210、miR-155 および miR-196a の発現増加が報告され [36]、血中 miRNA がヒト PDAC 診断の新規バイオマーカーとなりうる可能性が示された。

ヒトの膵がんにおいて高頻度で活性化が認められるがん遺伝子 Ras は K-ras であることから、本研究では、新たに *K-ras^{G12V}* トランスジェニックラットを樹立し、PDAC が発生した *K-ras^{G12V}* トランスジェニックラット (*Kras301* PDAC ラット) および PDAC を発生せず正常な膵臓を有する *K-ras^{G12V}* トランスジェニックラット (*Kras301* 対照ラット) を用い、PDAC 患者の血漿において発現増加が報告されている miRNA が *Kras301* PDAC ラットにおいても発現が増加するか否かを検証した。さらに、ヒト PDAC 診断に

有用な新規血中バイオマーカー候補を探索するために、Kras301 PDAC ラットの血清とがん組織および対照ラットの血清と正常膵組織を miRNA マイクロアレイ解析し、血清中 miRNA 発現量をリアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ鎖反応 (qRT-PCR) により定量した。

第 2 節 材料と方法

2-1 動物

ヒト *K-ras*^{G12V} トランスジェニック (Kras301) 雄性ラットを室温 23±2°C、湿度 50±10%、12 時間/12 時間の明暗サイクルに制御された動物室にて、木屑を敷いたプラスチックケージ内にて飼育した (~3 匹/ケージ)。餌と水道水は自由に摂取させた。動物は試験終了まで毎日観察した。試験終了時にはイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈から採血後に安楽死させた。動物試験は National Research Council (1996) の実験動物の飼育と使用のガイドラインおよび名古屋市立大学医学研究科の動物実験のためのガイドラインに従って実施した。実験計画書は本医学研究科の動物実験委員会によって承認を受けた。

2-2 PDAC の誘発

4x10⁹ pfu/mL DMEM の *Cre* 遺伝子を有するアデノウイルス (AxCANCre) あるいは *Cre* 遺伝子を持たない空ベクターを有するアデノウイルス (AxCAwt) 150 μL を 10~11 週齢雄性ホモ型 Kras301 ラットの総胆管を通

して膵管に注入した。AxCANCre を 6 匹の Kras301 ラットに、AxCAwt を 4 匹の Kras301 対照ラットに注入し、それぞれ Kras301 PDAC ラットおよび Kras301 対照ラットとした。注入 16~17 日後にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈から採血後にラットを安楽死させた。採取した血液を室温で凝固させ、3,000 r.p.m.、4°C にて 10 分間遠心分離して血清を得た。血清は -80°C にて保存した。

2-3 病理組織学的検索

安楽死させた動物から直ちに膵臓を摘出し、数片に分割した。Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および Kras301 対照ラットの正常膵組織を液体窒素で凍結した。残りの膵組織は 4% パラフォルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋した。膵組織を 3 μ m の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡にて観察した。

2-4 血清および膵組織からの RNA 抽出

ISOGEN (日本ジーン、富山) を用いて凍結した膵がんおよび正常膵組織からトータル RNA を抽出した。Kras301 対照ラットのトータル RNA は分解を防ぐために RNAsecure 試薬 (Applied Biosystems) に再けん濁した。Model Ultraspec 3100pro 分光光度計 (Amersham Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden) を用いてトータル RNA を定量し、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies、Palo Alto、CA) を用いて rRNA を対象に純度チェックを行っ

た。

miRVana PARIS キット (Applied Biosystems) を用いて凍結した血清からトータル RNA を抽出した。マイクロアレイ解析用のトータル RNA の抽出は 4 mL の血清を用い、血清と等量の acid-phenol chloroform (phenol:chloroform:isoamyl alcohol (125:24:1)、pH4.5) とを激しく混和して遠心分離後に上清を採取した。採取した上清と等量の acid-phenol chloroform とを激しく混和して遠心分離後に上清を採取し、この操作をさらに 1 回繰り返してタンパクを十分に除去した。qRT-PCR 用のトータル RNA は、0.24 mL の血清に内部標準として 0.2 fmol の *Drosophila melanogaster* の合成 miR-3 (dme-miR-3、Applied Biosystems) を添加した後に抽出した。抽出したトータル RNA を直ちに -80°C で保存した。

2-5 miRNA マイクロアレイ解析

膵がん、正常膵組織および血清から抽出したトータル RNA を材料に、350 個のラット miRNA プローブを有しているラット miRNA マイクロアレイキット (Agilent Technologies、Santana Clara、CA) を使用して miRNA マイクロアレイ解析を行った。miRNA マイクロアレイの各プローブの発現相対値 (Signal) および発現検出の信頼度 (Detection Call) を Feature Extraction (version 10.5) にて計算した。発現相対値をサンプル毎に 75 パーセンタイル補正して miRNA 発現量とした。miRNA 発現量は Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとの間で両側 Welch 検定を行い、 $P < 0.05$ にて有意差あり

と判定した。また、GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent Technologies) を用いて血清 miRNA の教師なし(unsupervised)階層的クラスタリング解析および教師あり(supervised)階層的クラスタリング解析を行った。これらのクラスタリング解析における各発現量に対する類似度測定では、遺伝子発現については Pearson 相関係数を、サンプルについては標準相関係数を用いた。

2-6 miRNA の qRT-PCR 解析

膵がん、正常膵組織および血清から抽出したトータル RNA を用い、miRNA の qRT-PCR 解析を行った。miRNA プローブ、TaqMan microRNA アッセイキットおよび 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) を用いて miRNA の qRT-PCR におけるサイクル閾値 (Ct) を測定した。PCR 反応で使用する RT 反応産物の量は、PCR 反応混和液の 1/4 量とした。各 miRNA の Ct から内在性コントロールである膵組織の U6 small RNA あるいは内部標準として血清に添加した dme-miR-3 の Ct を引いて ΔCt を得た。miRNA の発現相対値 $2^{-\Delta Ct}$ を miRNA 発現量とした。発現量を ARM EXSUS version 7.6 (Arm Systex Co Ltd、大阪) を用い、Kras301 PDAC ラット対 Kras301 対照ラットの等分散性を F 検定した。等分散である場合は Student の t 検定、そうでない場合は Aspin-Welch の t 検定を実施した。検定では、血清材料では片側検定、膵組織材料では両側検定を行った。P<0.05 にて有意差ありと判定した。また、6 匹のうち 4 匹以上の Kras301 PDAC ラットの miRNA 発現量が 4 匹の Kras301 対照ラットの miRNA 最高発現量よ

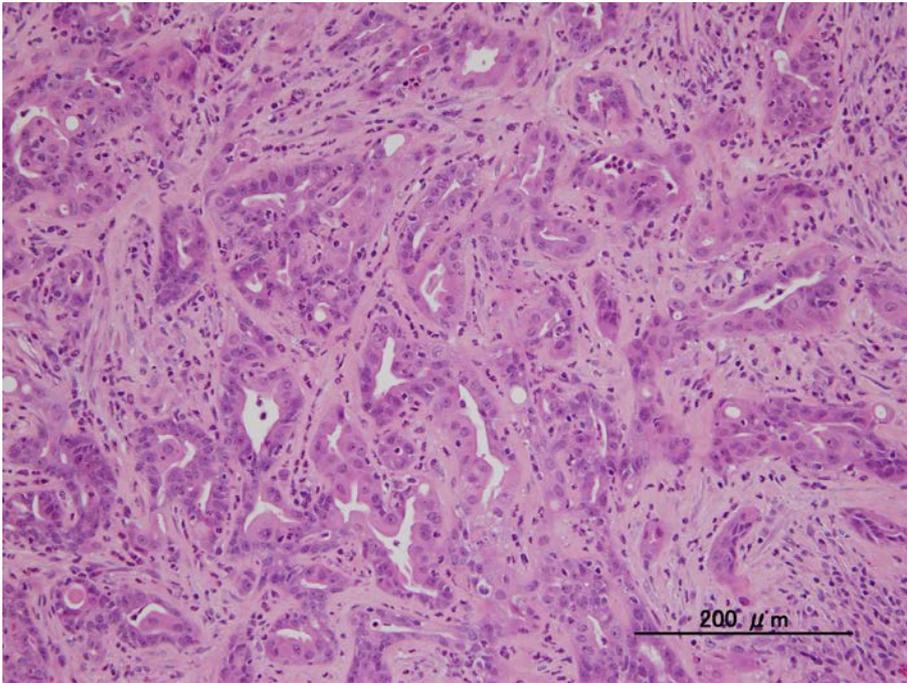
りも高値である場合、Kras301 PDAC ラットの miRNA 発現量は Kras301 対
照ラットに比べて高値であると評価した。

第 3 節 結果

3-1 病理組織学的検索

Kras301 PDAC ラットの膵全体に、白色調の腫瘍を認めた。組織学的には膵
に進行した PDAC 像を認めた。PanIn 像は認めなかった。腫瘍の間質は様々
な量の線維の増生を伴っており、炎症性細胞浸潤が部分的に認められた。遠隔
転移は認めなかった。Kras301 対照ラットの膵には、肉眼的および組織学的に
異常所見を認めなかった。Figure 2 に Kras301 PDAC ラットの代表的な PDAC
像を示す。

(A)



(B)

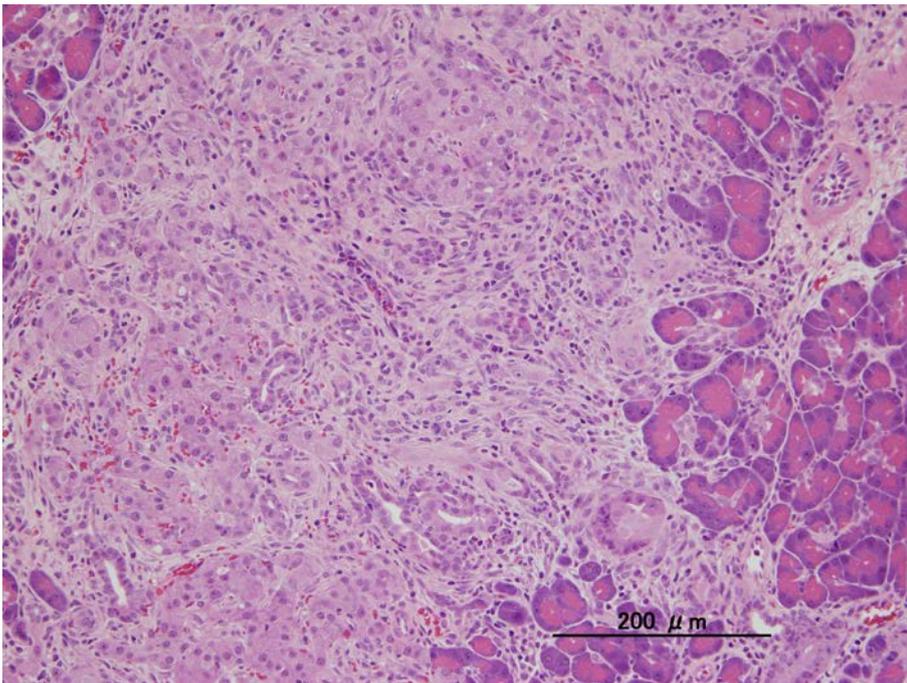


Figure 2. Typical lesions that developed in the Kras301 PDAC rats are shown. (A) An adenocarcinoma with desmoplastic appearance. (B) An adenocarcinoma invading the surrounding pancreas tissue.

3-2 qRT-PCR 解析 (ラット血清)

PDAC 患者の血漿で発現増加が報告されている 4 個の miRNA (miR-21、miR-210、miR-155 および miR-196a) について、6 匹の Kras301 PDAC ラットと 4 匹の Kras301 対照ラットの血清中での発現量を qRT-PCR により定量した。結果を Table 2A に示す。Kras301 PDAC ラットでは Kras301 対照ラットに比べて miR-155 発現が有意に高値であった (Figure 3A)。miR-21 および miR-210 発現は Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとの間で有意差は認められなかったが、Kras301 PDAC ラットにおいて高値であった。miR-196 は両ラット間での変化は認められなかった。PDAC 患者の血漿における発現増加が報告されている 4 個の miRNA のうち 3 個の miRNA 発現が Kras301 対照ラットに比べて Kras301 PDAC ラットの血清において高値であったことから、本モデル動物はヒト PDAC 診断の新規血清バイオマーカーの探索に有用であることが示唆された。

Table 2. Serum miRNAs quantified by qRT-PCR and their expression in the serum and pancreatic tissues of Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats

microRNA	Serum (a)					Pancreas (b)				
	Relative Intensity		Fold Change	<i>P</i>	PDAC patients (h)	Relative Intensity		Fold Change	<i>P</i>	PDAC patients (h)
	Control	PDAC				Control	PDAC			
(A) Serum miRNAs selected for quantification based on a previous report of increased plasma miRNAs in PDAC patients										
miR-210	0.48	0.84	1.7 ↑	0.075	↑ [36]	0.68	0.69	1.0	0.959	↑ [35, 37, 38]
miR-21	5.25	7.98	1.5 ↑	0.062	↑ [36]	28.24	453.46	16.1 ↑#	0.000	↑ [34, 35]
miR-155	0.08	0.11	1.5 ↑#	0.002	↑ [36]	0.02 (c)	0.05 (c)	2.9 ↑#	0.036	↑ [34, 35, 37-39]
miR-196a	0.0021	0.0023	1.1	0.334	↑ [36]	-0.19	-0.03		0.094	↑ [37, 38, 40]
(B) Serum miRNAs selected for quantification based on results of miRNA microarray analysis of serum in Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats										
Up-regulated miRNAs (d)										
miR-30b-5p	6.48	9.34	1.4 ↑	0.095		8.74	5.46	0.6	0.074	
miR-24-2*	0.68	0.93	1.4	0.213		-0.33	0.34	↑#	0.000	
miR-20b-5p	0.81	1.10	1.4	0.216		0.57	-0.04		0.564	
miR-874	0.007	0.008	1.2	0.181		0.73	0.05	0.1	0.218	
miR-125b-3p	0.00034	0.00027	0.8	0.246		-0.31	-0.04		0.020	
miR-125b*	0.006	0.005	0.1	0.325		0.95	0.29	0.3 ↓#	0.003	
Down-regulated miRNAs (e)										
let-7c	0.72	1.05	1.5	0.143		45.00	24.57	0.5 ↓#	0.030	
let-7b	0.92	1.30	1.4	0.153		40.04	17.72	0.4 ↓#	0.007	
miR-125a-5p	0.02	0.024	1.2	0.301		1.01	1.58	1.6 ↑#	0.018	↑ [35]
miR-375	0.16	0.11	0.7 ↓#	0.027		12.42	-0.01	↓#	0.002	↓ [35, 37, 38]
(C) Serum miRNAs selected for quantification based on results of miRNA microarray analysis of pancreatic tissues in Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats										
Up-regulated miRNAs (f)										
miR-541	5.00E-05	0.0029	63.2 ↑	0.069		-0.29	0.02	↑#	0.012	
						0.0005(c)	0.0039(c)	7.1 ↑#	0.019	
miR-369-5p	1.00E-05	0.0001	12.2 ↑#	0.046		-0.09	0.06	↑#	0.011	
						0.0002(c)	0.0010(c)	5.9 ↑#	0.020	
miR-376a	0.002	0.017	7.4 ↑#	0.046		-0.26	0.18	↑#	0.002	↑ [34]
miR-31	0.043	0.129	3.0 ↑	0.068		0.80	4.95	6.2 ↑#	0.000	↑ [37, 38]
miR-93	3.80	6.21	1.6	0.123		0.07	1.05	15.0 ↑#	0.000	↑ [37]
miR-18a	3.38	5.50	1.6 ↑	0.069		-0.26	0.31	↑#	0.002	
miR-301a	1.25	1.99	1.6	0.130		0.09	1.26	14.0 ↑#	0.000	↑ [34]
miR-542-3p	0.007	0.009	1.4	0.216		-0.19	0.47	↑#	0.001	
miR-203	0.158	0.205	1.3 ↑#	0.021		0.16	0.86	5.3 ↑#	0.011	↑ [37, 41, 42]
miR-145	2.63	3.00	1.1	0.418		0.41	0.91	2.2 ↑#	0.030	↑ [37, 38]
miR-205	0.018	0.019	1.0	0.468		-0.10	0.45	↑#	0.003	↑ [35, 37, 38]
miR-224	0.0003	0.0003	0.9	0.411		-0.23	0.01	↑#	0.013	↑ [37]
miR-222	0.433	0.265	0.6	0.099		-0.17	1.17	↑#	0.000	↑ [35, 37, 40, 41]
miR-16	111.13	45.41	0.4	0.143		13.14	43.04	3.3 ↑#	0.002	↑ [34]
Down-regulated miRNAs (g)										
miR-29c	4.79	6.58	1.4	0.135		8.62	3.22	0.4 ↓#	0.027	↓ [37]
miR-141	0.012	0.013	1.1	0.212		20.37	3.63	0.2 ↓#	0.004	↓ [37]
miR-217	2.70E-05	2.60E-05	1.0	0.474		1.10	-0.07	↓#	0.009	↓ [37, 38]
miR-216a	0.00028	0.00014	0.5	0.133		20.13	-0.07	↓#	0.007	↓ [37]

Fold Change: Calculated from the relative intensities of Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats.

Statistical significance ($P < 0.05$), ↑ Up-regulated; ↓ Down-regulated

(a) miRNAs in the serum of 4 Kras301 control rats and 6 Kras301 PDAC rats were quantified by qRT-PCR.

(b) miRNAs in pancreatic tissues of 4 Kras301 control and 4 Kras301 PDAC rats were quantified by miRNA microarray analysis.

(c) miRNAs in pancreatic tissue of 4 Kras301 control and 4 Kras301 PDAC rats were quantified by qRT-PCR.

(d) Up-regulated miRNAs in the serum of Kras301 PDAC rats as indicated by miRNA microarray analysis of serum in 3 Kras301 control rats and 3 Kras301 PDAC rats.

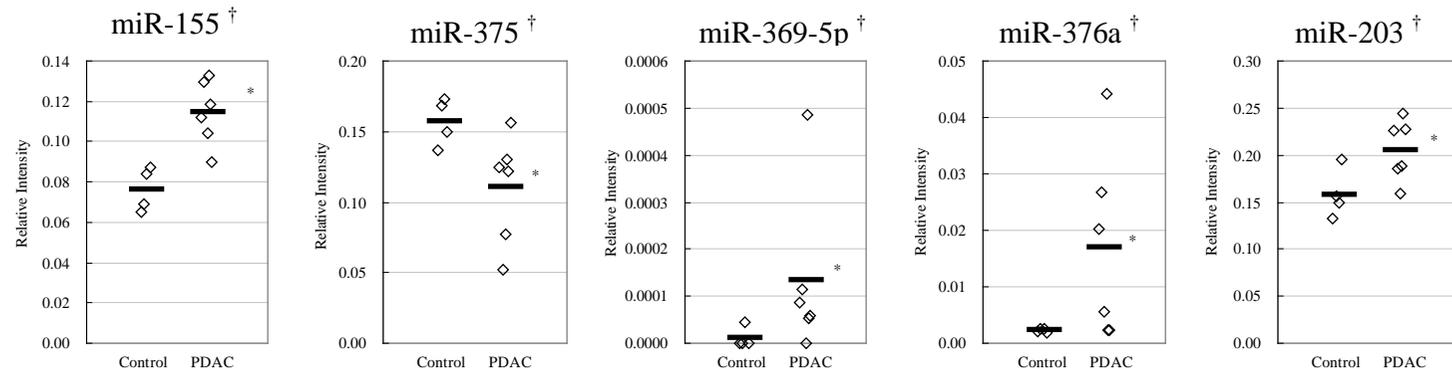
(e) Down-regulated miRNAs in the serum of Kras301 PDAC rats as indicated by miRNA microarray analysis of serum in 3 Kras301 control rats and 3 Kras301 PDAC rats.

(f) Up-regulated miRNAs in pancreatic tumor tissue of Kras301 PDAC rats as indicated by miRNA microarray analysis of normal and tumor pancreatic tissue in 4 Kras301 control rats and 4 Kras301 PDAC rats.

(g) Down-regulated miRNAs in pancreatic tumor tissue of Kras301 PDAC rats as indicated by miRNA microarray analysis of normal and tumor pancreatic tissue in 4 Kras301 control rats and 4 Kras301 PDAC rats.

(h) Up- and down-regulation reported in PDAC patients.

(A)



(B) pancreatic tissues

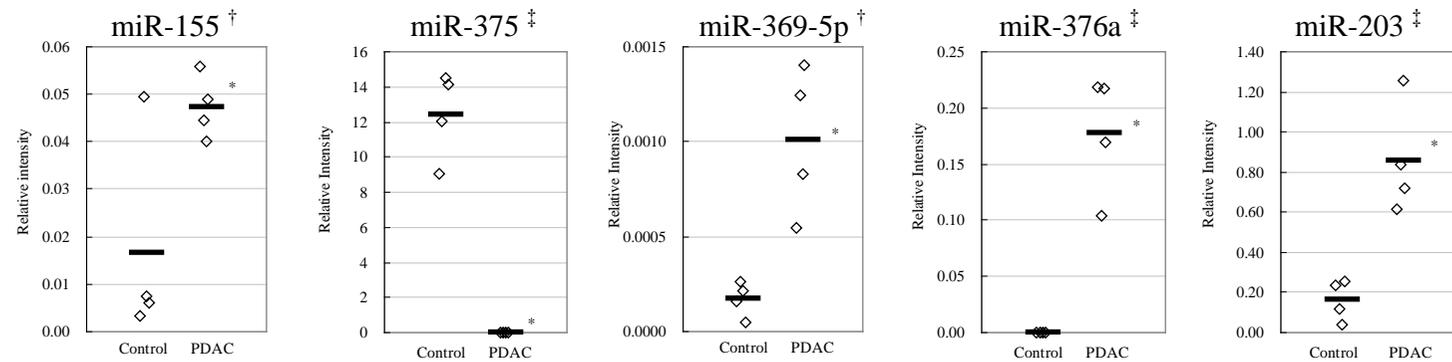


Figure 3. Change in the expression of mature miRNAs in the serum of Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats. The finding that miR-375, miR-369-5p, miR-376a and miR-203 are differentially expressed in the serum of Kras301 PDAC rats is new. MiR-155, which is known to be high in plasma of PDAC patients, was also elevated in Kras301 PDAC rats. * Significant with a $P < 0.05$, [†] Data of qRT-PCR, [‡] Data of microarray.

3-3 miRNA マイクロアレイ解析 (ラット血清)

3 匹の Kras301 PDAC ラットと 3 匹の Kras301 対照ラットの血清を材料に miRNA マイクロアレイ解析を行った。miRNA マイクロアレイ解析において得られた miRNA 発現量の全データを用いた教師なし階層的クラスタリング解析では Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとのクラスターは明確に分かれ (Figure 4A)、これら 2 つの strain を区別する血清 miRNA が存在する可能性が示唆された。

これら 2 つの strain を区別する血清 miRNA を検索するため、教師あり階層的クラスタリング解析を行った。教師あり階層的クラスタリング解析には Kras301 対照ラットに比べて Kras301 PDAC ラットの miRNA 発現量が有意に高値あるいは低値であった 15 個の miRNA の発現量を用いた。Kras301 PDAC ラットにおけるこれらの miRNA 発現量は Kras301 対照ラットに比べて 1.3~14.4 倍 (miR-30b-5p、miR-24-2*、miR-20b-5p、miR-874、miR-125b-3p、miR-125b*、miR-29a、miR-365、miR-370 および miR-878) および 0.2~0.6 倍 (let-7c、let-7b、miR-125a-5p、miR-375 および miR-466b) であった。教師あり階層的クラスタリング解析の結果、Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとのクラスターのプロファイルは明らかに異なっていた (Figure 4B)。したがって、これらの miRNA 群は Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとを区別するのに有用であることがわかった。

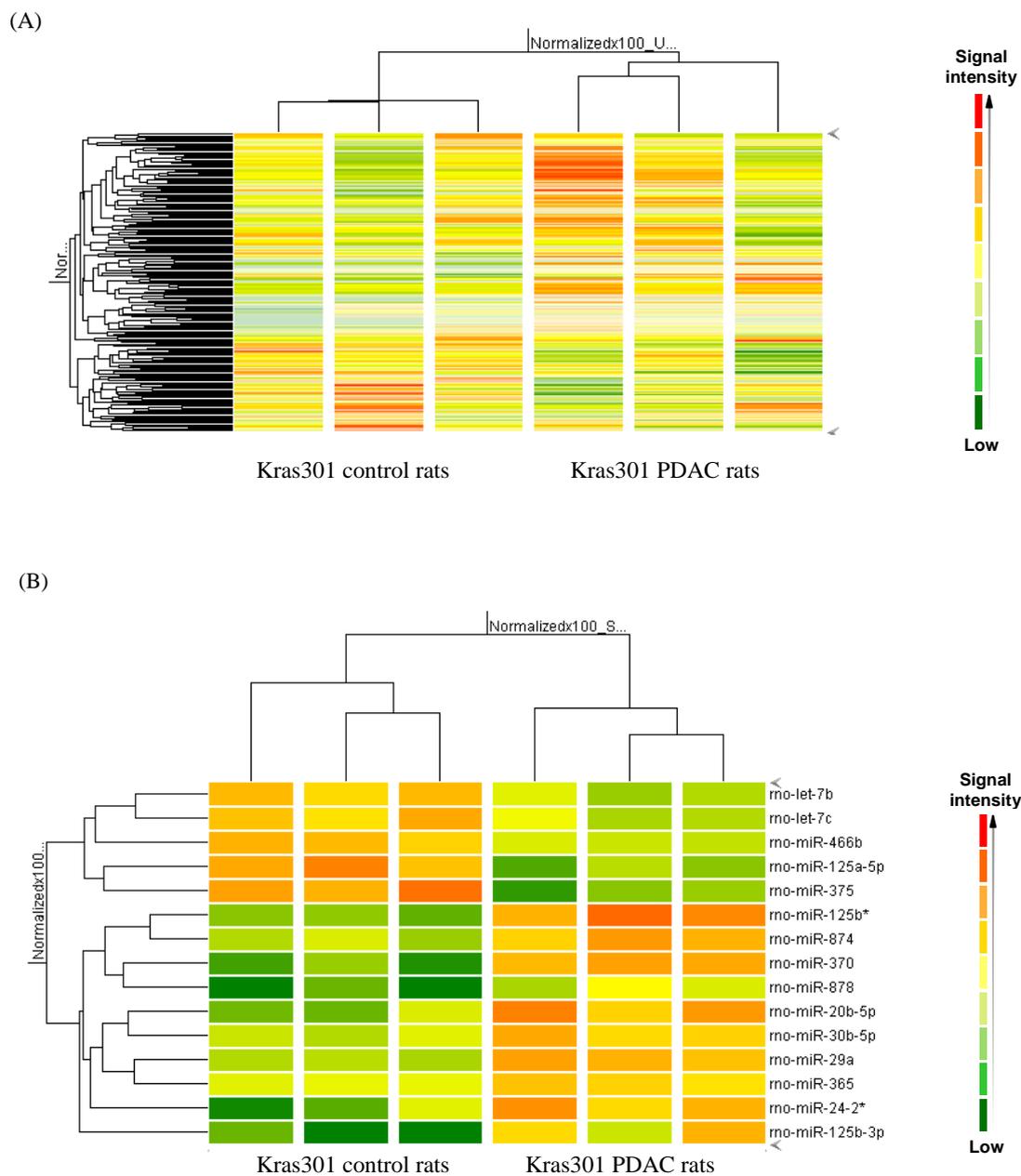


Figure 4. Hierarchical clustering of circulating miRNA profiles in the sera of Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats. The heat map diagram shows the result of the two-way hierarchical clustering of miRNAs and samples. Each row represents a miRNA and each column represents a sample. The miRNA clustering tree is shown on the left, and the sample clustering tree appears at the top. The color scale shown on the right illustrates the relative expression level of the miRNA. A clustering dendrogram shows differential expression profiles of circulating miRNAs in the sera of Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats. (A) Unsupervised hierarchical clustering. (B) Supervised hierarchical clustering.

3-4 miRNA マイクロアレイ解析結果にリンクした qRT-PCR 解析 (ラット血清)

3-3 において Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとの間に発現量の有意差が認められた 15 個の血清 miRNA のうち 10 個の血清 miRNA (miR-30b-5p、miR-24-2*、miR-20b-5p、miR-874、miR-125b-3p、miR-125b*、let-7c、let-7b、miR-125a-5p および miR-375) について、6 匹の PDAC Kras301 ラットと 4 匹の Kras301 対照ラットの血清 miRNA を qRT-PCR により定量した (Table 2B)。残りの 5 個の miRNA は次の理由のため qRT-PCR 解析の対象から除外した。すなわち、(i) miR-466b と miR-878 はヒトでの発現が不明である。(ii) げっ歯類の肝障害モデルにおいて血漿中 miR-29a と miR-365 の発現増加および肝臓中 miR-29a と miR-370 の発現低下の報告があり [43, 44]、臓器障害において変動する miRNA は炎症などの発がん以外の病態においても変動する可能性があり、特異性を欠くと判断した。

Kras301 PDAC ラットおよび Kras301 対照ラットの血清 miRNA を qRT-PCR 解析した結果、Kras301 対照ラットに比べて Kras301 PDAC ラットの miR-375 の発現は有意に低く (Figure 3A)、miR-30b-5p の発現は有意ではないが高いことが示された。qRT-PCR にて解析された他の miRNA は、miRNA マイクロアレイ解析では発現変化が認められたにもかかわらず qRT-PCR 解析では発現変化が認められなかった。miRNA マイクロアレイ解析と qRT-PCR 解析の結果の不一致の原因は miRNA マイクロアレイ解析の

低い定量精度にある可能性が考えられた。

3-5 miRNA マイクロアレイ解析 (ラット膵組織)

4 匹の Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および 4 匹の Kras301 対照ラットの正常膵組織を材料に miRNA マイクロアレイ解析を実施した (Table 2C)。miR-375、miR-376a、miR-203、miR-541 および miR-369-5p を含む多くの miRNA 発現量に膵がん組織と正常組織との間で有意差が認められた。有意差が認められた一部の miRNA のデータを Table 2C に示す。

有意な発現増加が認められた miR-541 および miR-369-5p は膵がん組織での発現量は低かった。また、miR-155 は当該プローブが miRNA マイクロアレイにないため解析できなかった。6 匹の Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および 4 匹の Kras301 対照ラットの正常膵組織における miR-541、miR-369-5b および miR-155 を qRT-PCR 解析した結果、いずれも正常膵組織に比べて膵がん組織における発現が高かった (Table 2C および Figure 3B)。qRT-PCR 解析で示された膵がん組織における miR-541 および miR-369-5p の発現増加は、miRNA マイクロアレイ解析で得られた結果と同じであった。

3-6 miRNA マイクロアレイ解析結果にリンクした qRT-PCR 解析 (ラット血清)

膵組織の miRNA マイクロアレイ解析において膵がん組織と正常組織との間で有意な発現差が認められた miRNA のうち 18 個の miRNA について、6

匹の Kras301 PDAC ラットと 4 匹の Kras301 対照ラットの血清を材料とした qRT-PCR 解析で発現量を定量した (Table 2C)。解析対象の miRNA はいずれもヒトにも存在する。Kras301 PDAC ラット膵がん組織において発現増加した 14 個の miRNA のうち、Kras301 PDAC ラット血清では miR-369-5p、miR-376a、miR-203、miR-541、miR-31 および miR-18a の発現が増加し、miR-369-5p、miR-376a および miR-203 の発現増加は有意であった (Figure 3A)。膵がん組織で低下が認められた 4 個の miRNA はいずれも Kras301 PDAC ラット血清において発現変化が認められなかった。

Kras301 PDAC ラット膵がん組織と Kras301 対照ラットの正常膵組織との間で有意な発現差があった 18 個の miRNA のうち 6 個の miRNA は Kras301 PDAC ラットの血清においても Kras301 対照ラット血清との間で発現差を生じ、そのうち 3 個の miRNA の発現差は有意であった。この実験事実に加え、解析対象の miRNA はいずれもヒトにも存在することを考慮すると膵組織および血清を材料とする miRNA 解析はヒト PDAC の血清診断バイオマーカー探索に有用であることを示している。

第 4 節 考察

PDAC 患者の血漿において文献的に発現増加が報告されている 4 個の miRNA (miR-21、miR-210、miR-155 および miR-196a) のうち 3 個の miRNA (miR-155、miR-21、miR-210) が Kras301 PDAC ラットの血清においても発現が増加していることがわかった。この結果は、本モデル動物がヒト

PDAC の血清診断のための新規バイオマーカー探索に有用であることを示している。

Kras301 PDAC ラット血清において有意な発現変化を示した miRNA のうち miR-155、miR-375、miR-369-5p、miR-376a および miR-203 は、Kras301 PDAC ラット膵がん組織においても血清と同様な発現変化を示したことから、これらの血清 miRNA の発現変化は膵がん組織での発現変化に由来すると考えられた。これらの miRNA のうち miR-155、miR-375、miR-376a および miR-203 は PDAC 患者の膵がん組織においても同様の発現変化が報告されている [34, 35, 37, 38, 41]。miRNA の発現変化は発がんに関連しており [45]、miR-155 は p53 の発現を抑制し、in vivo で膵がん細胞の増殖を促進すること [46]、miR-203 の発現増加はヒト膵がんおよび大腸がん患者の生存率と負の相関があることが報告されている [41, 47]。血清 miR-375、miR-369-5p、miR-376a および miR-203 の発現変化は PDAC 患者においてこれまでに報告がなく、ヒト PDAC 診断の血清バイオマーカーの新規候補である。血液中の miR-155 と miR-203 は膵がん以外のがんにおいても発現が増加することが報告されており（例えば、大細胞型リンパ腫における miR-155、卵巣がんにおける miR-203 [48]）、膵がんに対する特異性は低い。しかし、miR-375 [49] などの正常膵組織に特異的なバイオマーカーと組み合わせることで特異性をある程度確保できるかもしれない。miR-375 は、Kras301 PDAC ラットの血清および膵がん組織において低発現を示し、PDAC 患者の膵がん組織における低発現の報告がある [35, 37, 38]。したがって、PDAC 患者の血中 miR-375 発現

は低下すると予測される。

まとめると、PDAC 患者の血漿において発現増加が報告されている 4 個の miRNA のうち 3 個の miRNA が Kras301 PDAC ラットの血清においても発現が増加していた。よって、本モデル動物はヒト PDAC 診断の新規血清バイオマーカー候補の探索に有用であると期待される。Kras301 PDAC ラット血清において認められた血清 miR-375、miR-369-5p、miR-376a および miR-203 の発現変化は PDAC 患者での報告がないため、ヒト PDAC 診断の新規バイオマーカー候補である。

第 3 章 ヒト PDAC モデルラットのメタボロミクス解析およびトランスクリプトミクス解析

第 1 節 緒言

メタボロミクス解析は分子量 1,000 以下の生体内代謝産物を網羅的に解析する。解析には核磁器共鳴 (NMR)、ガスクロマトグラフィー (GC) あるいは液体クロマトグラフィー (LC) と連動した質量分析法 (MS) が用いられる。メタボロミクス解析は、バイオマーカーの探索、生物学的経路の解析、複雑な生物システムの理解に強力なツールである [50]。最近、メタボロミクス解析により尿中の前立腺がんバイオマーカーが発見された [51]。

本研究では、第 2 章で用いた Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットの血清および膵組織をノンターゲットガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) およびターゲット GC-MS にてメタボロミクス解析を行い、ヒト PDAC の新規血清バイオマーカー候補を探索した。さらに、mRNA マイクロアレイにより膵組織の mRNA を網羅的に解析するトランスクリプトミクス解析を実施した。

第 2 節 材料と方法

2-1 動物

第 2 章で用いた 6 匹の Kras301 PDAC ラットおよび 4 匹の Kras301

対照ラットから調製したサンプルを使用した。

2-2 膵組織および血清 (Kras301 PDAC ラット、Kras301 対照ラット)

第 2 章で凍結保存した血清と膵組織を使用した。

2-3 膵組織のトータル RNA (Kras301 PDAC ラット、Kras301 対照ラット)

第 2 章で凍結保存した膵組織のトータル RNA を使用した。

2-4 mRNA マイクロアレイ解析 (ラット膵組織)

膵組織のトータル RNA を用いて GeneChip System (Affymetrix、Santa Clara、CA) により mRNA マイクロアレイ解析 (31,000 遺伝子) した。5 μ g のトータル RNA から、SuperScript II 逆転写酵素および T7-oligo (dT) プライマーを用いて 1 本鎖の cDNA を合成し、*Escherichia coli* (*E. coli*) RNase H、*E. coli* DNA ポリメラーゼ I および *E. coli* DNA リガーゼを用いて 2 本鎖 cDNA を合成した。2 本鎖 cDNA からビオチン標識 1 本鎖 cRNA を作成し、15 μ g のビオチン標識 cRNA を断片化した。断片化されたビオチン標識 1 本鎖 cRNA を Rat Genome 230 2.0 アレイにハイブリダイゼーションし、アレイを R-Phycoerythrin Streptavidin (Molecular Probes、Eugenem OR)、GeneChip Hybridization、Wash および Stain Kit (Affymetrix) で染色および洗浄を行い、抗体増幅法により蛍光性を増大させた。Affymetrix Genechip Command Console (AGCC) および GeneChip Scanner 3000

(Affymetrix) を用いてアレイをスキャンした。スキャンで得られたイメージファイルを Affymetrix data suite システムの Expression Console (EC) バージョン 1.1 にて解析した。転写物の相対発現値 (Signal) および検出の信頼度 (Detection Call) のデータを得た。Signal 全体を 100 として実測値を標準化した。

2-5 サンプルの調整

GC-MS 分析のために腓組織および血清を次の手順で誘導体化した。腓組織 (45-84 mg) の重量を測定し、氷冷しながら x12 容量のメタノール/水/10 mM 2-hydroxyundecanoic acid (800:100:1、v/v/v) 溶液内でポッター式ホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジナイズ後、15,000 r.p.m.、4°C にて 10 分間遠心分離した。血清 (50 μ L) は x8 容量のメタノール/水/10 mM 2-hydroxyundecanoic acid (800:100:1、v/v/v) 溶液を添加して脱タンパクし、15,000 r.p.m.、4°C にて 5 分間遠心分離した。2-hydroxyundecanoic acid を内部標準物質として使用した。遠心分離後の上清 200 μ L を凍結乾燥し、10 mg/mL の methoxylamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) ピリジン溶液 30 μ L を誘導体化剤として添加して 30°C で 90 分間インキュベートした。その後、N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (GL Science、東京) 30 μ L を誘導体化剤として添加し、40°C で 30 分間インキュベートした。

2-6 GC-MS 分析

Agilent Technologies VF5-ms キャピラリーカラム (内径 0.25 mm x 30 m、フィルム厚 0.25 μ m) を用いて Bruker Daltonics 1200 GC/MS/MS システム (Bruker Daltonics K.K.) にて GC-MS 分析した。注入温度は 230°C、ヘリウムガスの流速は 1 mL/分とした。カラムオーブンの温度は 2 分間 60°C で、10°C/分の速さで 300°C まで上昇させ、この温度で 5 分間維持した。電子衝撃エネルギー 70 kV でイオンを発生させ、 m/z 70~800 の範囲でイオン強度を記録した。

2-7 データ解析

GC-MS データを LineUp (Infometrix、Bothell、WA) と PiroTrans (GL Science) に取り込み、内部標準物質 2-hydroxyundecanoic acid のピーク強度と保持時間を比較対象にクロマトグラム化した。得られたピークリストは Pirouette ソフトウェア (Infometrix、Woodinville、WA) に取り込み、多変量解析した。多変量解析では、多くの特性を持つ多変量のデータを互いに相関の無い少ない個数の特性値にまとめる手法である主成分解析 principal component analysis (PCA) を行い、Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットの群 (クラスター) 分けに寄与する代謝産物を探した。20 万個以上の電子衝撃スペクトルパターンを有するデータライブラリー NIST 05 Mass Spectral Library (NIST) から代謝産物を推測した。代謝産物の推測においては、類似性スコアに基づく自動ライブラリ検索に加え、目視によりスペクトルの類似性を評価した。

2-8 Palmitoleic acid の同定と定量

上述 2-7 の NIST で得られた推測が正しいかを検証するために palmiteladic acid およびその異性体である palmitoleic acid の標品 (MP Biomedicals, CA) を臍組織あるいは血清と一緒にクロマト分析した。代謝産物と 2 つの標品の保持時間とフラグメントパターンから代謝産物を同定した。

6 個の既知濃度 (0.05~100 p.p.m.) の palmitoleic acid ピリジン溶液を用いて臍組織および血清中の palmiteladic acid を定量した。サンプル中の palmitoleic acid 濃度は全イオン電流 (total ion current, TIC) クロマトグラムあるいは m/z 311 質量クロマトグラムの標準曲線より算出した。

2-9 統計学的解析

代謝産物のピーク強度、定量値および遺伝子発現の Signal 値について Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとの間で Student の t 検定を行った。代謝産物のピーク強度については、有意差がなく、Kras301 対照ラットに比べた Kras301 PDAC ラットの変化率が 1.5 倍以上および 0.7 倍以下の場合にはそれぞれ増加傾向および低下傾向であると評価した。

第 3 節 結果

3-1 GC-MS 分析

膵組織と血清の代表的な GC-MS TIC クロマトグラムを Figure 5 に示した。内部標準物質の保持時間はいずれの測定においても同じであった。膵組織と血清のクロマトグラムパターンは非常に異なっていた。膵組織および血清のいずれも、Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットのクロマトグラムパターンには部分的に差異が認められた。

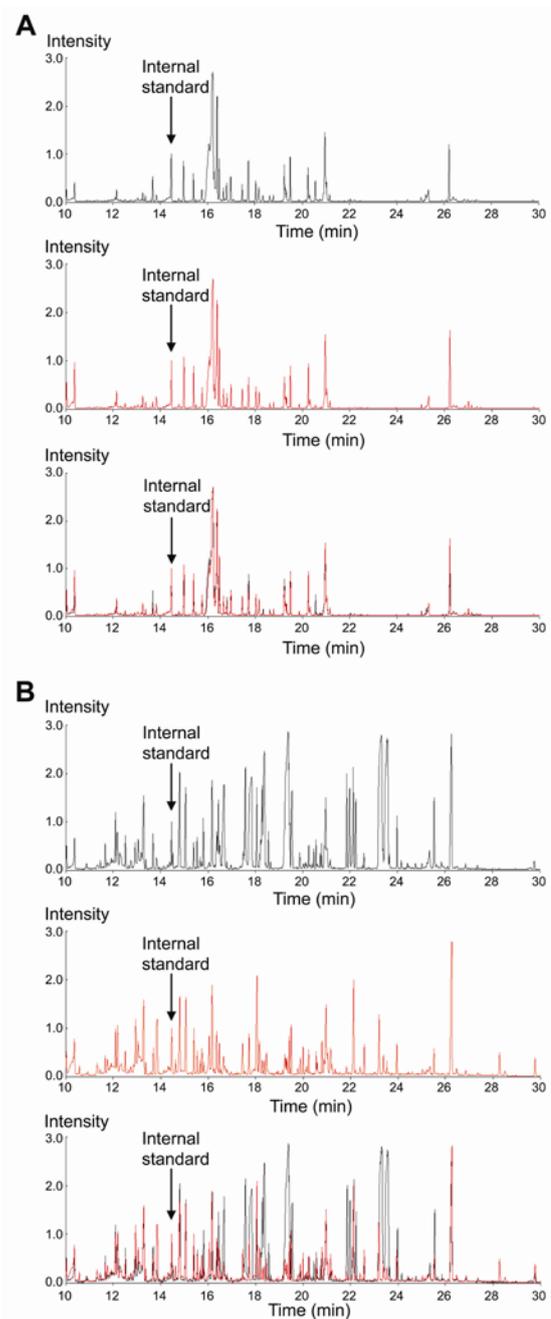


Figure 5. Typical GC/MS total ion current (TIC) chromatograms of serum and pancreatic tissues from Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats. A: Serum from Kras301 control rats (black); serum from Kras301 PDAC rats (red); overlapping chromatograms of serum from Kras301 control rats (black) and Kras301 PDAC rats (red). B: Pancreatic tissues from Kras301 control rats (black); PDAC lesions from Kras301 PDAC rats (red); overlapping chromatograms of pancreatic tissues from Kras301 control rats (black) and Kras301 PDAC rats (red). The internal standard, 2-hydroxyundecanoic acid, was detected at RT=14.47(min).

3-2 Kras301 PDAC ラットおよび Kras301 対照ラットでのスコアプロット

Principal component analysis (PCA) アルゴリズムによるスコアプロットを Figure 6 に示した。PCA アルゴリズムに示される 1 個の点は 1 サンプル中の代謝産物と濃度を示しており（スコアプロットの各点は 1 匹のラットを示す）、近い点同士はサンプル同士の組成が似ていることを示す。血清 (Figure 6A) および膵組織 (Figure 6B) のいずれのスコアプロットも Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットが 2 つの異なる群 (クラスター) に分かれている。よって、代謝産物プロファイルはふたつの strain 間で異なることがわかった。

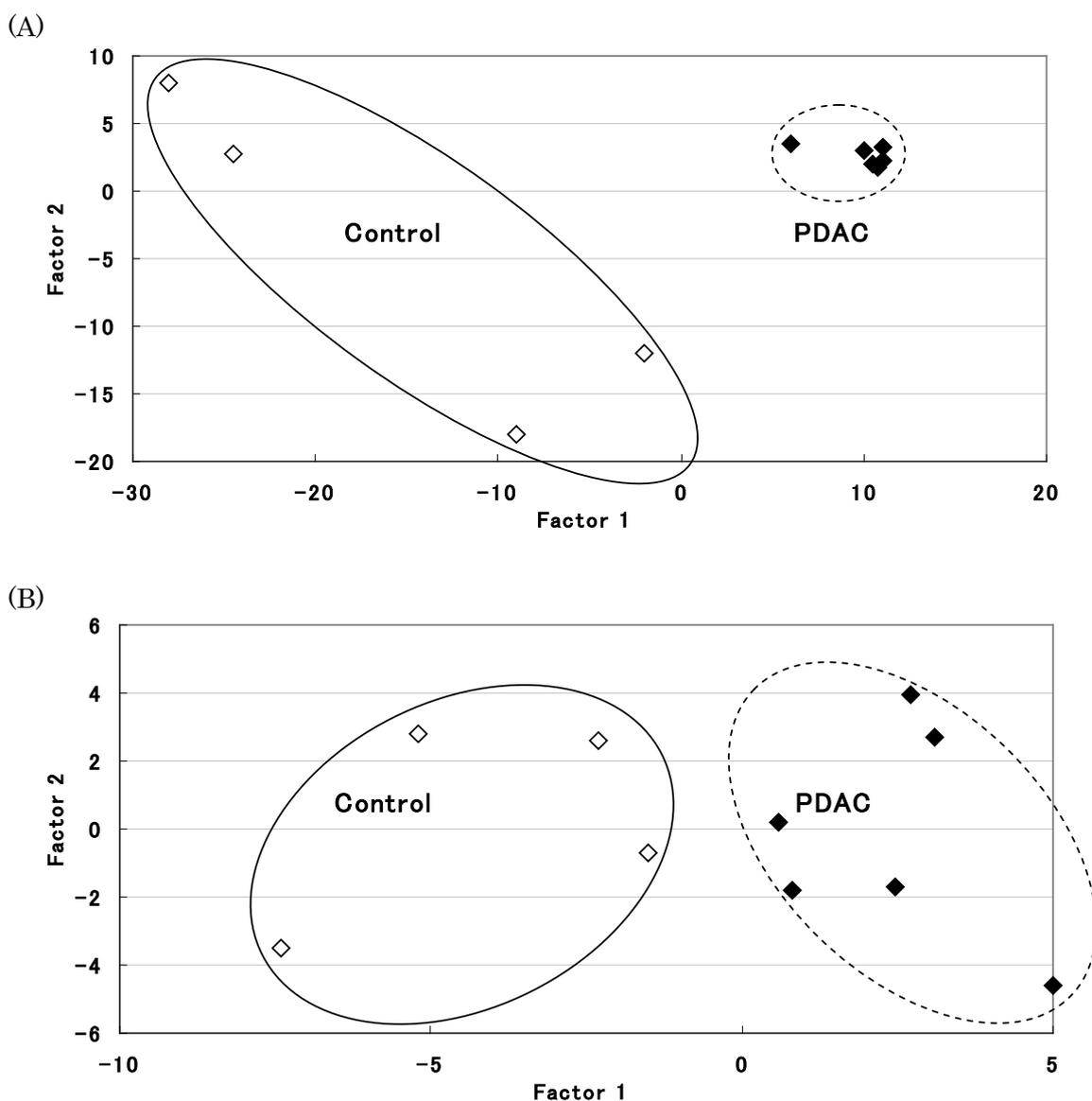


Figure 6. Score plots of PCA based on the metabolite profile data of Kras301 PDAC rats and Kras301 control rats. The rhombus plots (filled and open) indicate the results for Kras301 PDAC rats ($n = 6$) and Kras301 control rats ($n = 4$), respectively. (A) Score plots of PCA based on the metabolite profile data for pancreatic tissues discriminating between Kras301 PDAC rats and Kras301 control rats. The principal components PC1 ($t[1]$) and PC2 ($t[2]$) described 59.6 and 14.9% of the variation. (B) Score plots of PCA based on the metabolite profile data of serum discriminating between Kras301 PDAC rats and Kras301 control rats. The principal components PC1 ($t[1]$) and PC2 ($t[2]$) described 32.8 and 18.0% of the variation.

3-3 Kras301 PDAC ラットおよび Kras301 対照ラットでのローディングプロット

PCA アルゴリズムを用いてローディングプロットを作成した。ローディングプロットにより、スコアプロットにおいてふたつの strain 間のクラスターの分離に寄与した代謝産物を特定し、その代謝産物の電子衝撃スペクトルをデータライブラリーの NIST と照らし合わせた。スコアプロットにおいてふたつの strain 間のクラスターの分離に寄与した膵組織および血清における代謝産物を Table 3 に示した。Kras301 対照ラットに対する Kras301 PDAC ラットにおける代謝産物の量的変化率および P 値を GC-MS の TIC より算出した。

K301 ラット血清における aminomalonic acid、2-aminoethyl dihydrogen phosphate、citrate および lantionine が有意な増加、chenodeoxycholic acid が増加傾向を示した。しかし、膵がん組織由来サンプルでこれらの代謝産物は増加せず、aminomalonic acid の量は有意に低下した。

いくつかの脂肪酸が膵がん組織で低下した。すなわち、palmitelaidic acid、linoleic acid、octadecanoic acid、myristic acid、arachidonic acid および hexadecanoic acid は有意に低下し、tridecanoic acid、12-methyl-、methyl ester および heptadecanoic acid は低下傾向を示した。これら脂肪酸のうち、血清でも低下したものは palmitelaidic acid および arachidonic acid であった。

Palmitelaidic acid および arachidonic acid 以外に膵組織と血清の両方で

変化した代謝産物は 2(1H)-pyrimidinone であった。この物質は腓組織において有意に低下し、血清において低下傾向を示した。

Beta-alanine、xanthine および uridine は腓組織において増加あるいは増加傾向を示したが、血清では増加しなかった。Aspartic acid、alpha-glycerophosphoric acid、tyrosine、2-monopalmitin、adenosine monophosphate および purine は腓組織において低下したが、血清では低下しなかった。

以上のように、腓組織および血清の代謝産物のプロファイルは Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットとの間で異なっており、いくつかの代謝産物がプロファイルの差異に寄与していた。また、Kras301 対照ラットに対する Kras301 PDAC ラットにおける代謝産物の増減は腓組織と血清の間で必ずしも同じではなかった。

Table 3. Fold changes for the discriminatory metabolites characterizing PDAC tissues and serum.

Metabolites	Retention time (min)	Serum		Pancreatic tissues	
		Fold changes	p-values	Fold changes	p-values
Threonine	10.37	1.2 #	0.373	1.3	0.330
Beta-alanine	10.94	ND		1.7 #	0.072
Aminomalonic acid	11.46	1.3	0.011 *	0.8 #	0.019 *
Aspartic acid	12.07	1.3	0.106	0.7 #	0.005 *
Tridecanoic acid, 12-methyl-, methyl ester	14.53	ND		0.1 #	0.051
Alpha-glycerophosphoric acid	14.79	1.4	0.060	0.8 #	0.000 *
2-Aminoethyl dihydrogen phosphate	15.04	1.2 #	0.035 *	1.0	0.257
Citrate	15.40	1.3 #	0.017 *	1.2	0.522
Tyrosine	16.67	1.2	0.086	0.3 #	0.024 *
Xanthine	17.45	1.1	0.405	1.7 #	0.016 *
Palmitelaidic acid	17.54	0.6 #	0.002 *	0.1 #	0.001 *
Heptadecanoic acid	18.62	0.9	0.277	0.3 #	0.062
Linoleic acid	19.24	0.9	0.683	0.2 #	0.000 *
Octadecanoic acid	19.57	ND		0.7 #	0.001 *
Lanthionine	19.87	1.4 #	0.027 *	1.0	0.949
Myristic acid	20.46	0.9	0.138	0.1 #	0.020 *
Arachidonic acid	20.56	0.4 #	0.098	0.6 #	0.021 *
Uridine	21.22	ND		3.2 #	0.001 *
2-Monopalmitin	21.97	1.0	0.205	0.05 #	0.001 *
Hexadecanoic acid	22.22	0.9	0.203	0.1 #	0.038 *
2(1H)-Pyrimidinone	23.96	0.5	0.316	0.5 #	0.000 *
Adenosine monophosphate (AMP)	25.55	0.9	0.304	0.5 #	0.000 *
Purine	25.85	ND		0.4 #	0.000 *
Chenodeoxycholic acid	27.14	1.9 #	0.148	1.1	0.643

Sera and pancreatic tissues from Kras301 PDAC rats (n=6) and Kras301 control rats (n=4) were analyzed.

ND: Peaks were not detected.

#: Metabolites that contributed to the differentiation of PDAC and control samples in the PCA analysis.

*: p-values lower than 0.05

3-4 標品を用いた膵組織中 palmitoleic acid の同定および定量

Kras301 PDAC ラットの膵組織および血清において有意に低下した代謝産物は、NIST により palmitelaidic acid と推測された。この推測を検証するために、palmitoleic acid および palmitelaidic acid を標品として GC-MS 分析を行った。標品の保持時間とフラグメントパターンから代謝産物は palmitoleic acid と同定された。

定量の直線範囲が 0.1~100 p.p.m. ($R^2=0.9857$) の palmitoleic acid の検量線を用いてサンプル中の palmitoleic acid を定量した。膵組織と血清の個体別 palmitoleic acid 濃度を Table 4 に示した。膵組織の palmitoleic acid 濃度は Kras301 PDAC ラットおよび Kras301 対照ラットでそれぞれ 7.5 ± 4.6 および 266.5 ± 186.2 p.p.m.、P 値 =0.069 であった。血清の palmitoleic acid 濃度は Kras301 PDAC ラットおよび Kras301 対照ラットでそれぞれ 1.2 ± 0.1 および 2.6 ± 0.8 p.p.m.、P=0.031 であった。

Table 4. Concentration of palmitoleic acid in the tissue and serum of Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats.

	Concentration in tissue		Concentration in serum		
	(ppm#)	p-values	(ppm\$)	p-values	
Kras301 control rat	347.72	266.5±186.2	2.77	2.6±0.8	
	490.90		3.65		
	127.08		1.97		
	100.33		2.10		
Kras301 PDAC rat	10.58	7.5±4.6	1.15	1.2±0.1	0.031*
	2.01		0.96		
	3.78		1.34		
	13.77		1.28		
	4.97		1.09		
	10.18		1.20		

ppm is μg palmitoleic acid per g tissue.

\$ ppm is μg palmitoleic acid per mL serum.

*: p-values lower than 0.05

3-5 解糖系および TCA 回路における代謝産物

いくつかの脂肪酸が膵がん組織で低下した。脂肪酸は機能的に解糖系経路と関連する。また、がん細胞では酸素が十分に供給されている状態でも細胞質における嫌気性解糖が顕著に増加する、すなわち glucose を素早く lactate へ変換する Warburg 効果¹⁾が、がん細胞の典型的な代謝経路として知られている [52, 53]。したがって、3-1 で得られた GC-MS クロマトグラムにおける解糖系および trichloroacetic acid (TCA) 回路に関連する代謝産物のピークを探索

したところ、glucose、pyruvate、lactate、succinate、fumarate、malate および alpha-keto-glutarate のピークを見つけることができた。これら代謝産物について、Kras301 対照ラットに対する Kras301 PDAC ラットの膵組織および血清における代謝産物の量的変化率を GC-MS クロマトグラムの TIC より算出した (Table 5)。いずれの代謝産物も K301 PDAC ラットと K301 対照ラットとの間に有意差は認めなかったが、Kras301 PDAC ラットの膵がん組織では malate 量の低下傾向が、血清では succinate 量の低下傾向が認められた。

Table 5. Fold changes of the putatively identified metabolites related to glycolysis and the TCA cycle.

Metabolites	Retention time (min)	Serum		Pancreatic tissues	
		PDAC/Control		PDAC/Control	
		Fold changes	p-values	Fold changes	p-values
glucose	16.17	1.0	0.510	1.0	0.940
pyruvate	5.87	1.1	0.177	1.0	0.198
lactate	5.95	1.0	0.456	1.0	0.373
succinate	9.46	0.6	0.065	1.1	0.693
fumarate	9.62	1.1	0.144	ND	
malate	11.67	0.9	0.803	0.7	0.054
alpha-keto-glutarate	12.75	1.0	0.832	0.8	0.631

Sera and pancreatic tissues from Kras301 PDAC rats (n=6) and Kras301 control rats (n=4) were analyzed.

ND: Not detected.

3-6 解糖系、TCA 回路、脂肪酸生合成、アラキドン酸代謝およびヌクレオチド分解における mRNA 発現

膵がん組織と正常膵組織における 31,000 遺伝子の mRNA 発現をマイクロアレイ解析した。解糖系、TCA 回路、脂肪酸生合成、アラキドン酸代謝およびヌクレオチド代謝に関連する遺伝子について、正常膵組織に対する膵がん組織の mRNA 発現変化率を Table 6 に示した。

膵がん組織において、嫌氣的解糖系に関連する多くの遺伝子 (hexokinase (Hk)、glucose phosphate isomerase (Gpi)、phosphofructokinase (Pfkp)、aldolase (Aldo)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)、phosphoglycerate kinase (Pkg)、phosphoglycerate mutase (Pgam)、enolase (Eno)、pyruvate kinase (Pk) および lactate dehydrogenase (Ldh)) の mRNA 発現が増加し、TCA 回路に関連する多くの遺伝子 (pyruvate dehydrogenase (Pdh)、aconitase (Aco)、isocitrate dehydrogenase (Idh2、Idh3B、Idh3g)、succinate-CoA ligase (Sucl)、succinate dehydrogenase (Sdh) および malate dehydrogenase (Mdh)) の mRNA 発現が低下した。脂肪酸合成に関連する酵素の adenosine triphosphate citrate lyase (Acly) の mRNA 発現は低下、fatty acid synthase (Fasn) の mRNA 発現は増加した。

アラキドン酸代謝において、arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5) 活性化に必要な arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (Alox5ap) の mRNA 発現が膵がん組織で増加した。

Purine および pyrimidine ヌクレオチド代謝に関連する多くの遺伝子 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt)、guanine deaminase (Gda)、adenosine monophosphate deaminase (Ampd3)、adenosine deaminase (Ada、Adarb1、Adarb2)、hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt)、xanthine dehydrogenase (Xdh)、cytidine deaminase (Cda) および uridine phosphorylase (Upp)) の mRNA 発現が増加した。しかし、pyrimidine ヌクレオチド分解の beta-alanine より下流の代謝に関する遺伝子

(glutamic-pyruvate transaminase (Gpt)および aldehydo dehydrogenase (Aldh6A1)) の mRNA 発現は低下した。

Abat、Alox5、Dpyd、Dpys、Nt5、Uox および Upd 遺伝子については mRNA 発現量が非常に低かったため、発現変化を正確に評価することは困難であった。

Table 6. Microarray analysis of mRNA from pancreatic tissues from Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats.

Gene Symbol	Representative Public ID	Gene Title	Fold	p-value
Abat	U29701	4-aminobutyrate aminotransferase	0.0	0.077 §
Acly	NM_016987	ATP citrate lyase	0.6	0.000 *
Aco2	NM_024398	aconitase 2, mitochondrial	0.6	0.000 *
Ada	NM_130399	adenosine deaminase	3.9	0.000 *
Adar	NM_031006	adenosine deaminase, RNA-specific	0.4	0.018 *
Adar	BI292196	adenosine deaminase, RNA-specific	0.8	0.408
Adarb1	NM_012894	adenosine deaminase, RNA-specific, B1	0.6	0.294
Adarb1	AW253867	adenosine deaminase, RNA-specific, B1	0.1	0.066
Adarb1	AW522471	adenosine deaminase, RNA-specific, B1	3.4	0.000 *
Adarb2	NM_133302	adenosine deaminase, RNA-specific, B2	3.3	0.012 *
Adat3	AI029510	adenosine deaminase, tRNA-specific 3, TAD3 homolog (S. cerevisiae)	0.4	0.139
Aldh6a1	NM_031057	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	0.2	0.001 *
Aldoa	NM_012495	aldolase A, fructose-bisphosphate	4.0	0.001 *
Aldob	M10149	aldolase B, fructose-bisphosphate	0.0	0.146
Aldoc	NM_012497	aldolase C, fructose-bisphosphate	0.6	0.100
Alox5	NM_012822	arachidonate 5-lipoxygenase	2.1	0.081 §
Alox5ap	NM_017260	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	3.0	0.000 *
Ampd1	J02811	adenosine monophosphate deaminase (isoform M)	1 0.8	0.707
Ampd2	BE111787	adenosine monophosphate deaminase (isoform L)	2 0.7	0.029 *
Ampd2	BE100752	adenosine monophosphate deaminase (isoform L)	2 1.5	0.068
Ampd3	NM_031544	adenosine monophosphate deaminase 3	2.6	0.006 *
Cda	AA859352	cytidine deaminase	2.7	0.031 *
Cs	NM_130755	citrate synthase	1.1	0.119
Cs	AI009657	citrate synthase	1.2	0.020 *
Cs	H33235	citrate synthase	1.3	0.013 *
Dpyd	NM_031027	dihydropyrimidine dehydrogenase	0.2	0.106 §
Dpys	NM_031705	dihydropyrimidinase	0.0	0.377 §
Eno1	NM_012554	enolase 1, (alpha)	3.7	0.000 *
Eno2	AF019973	enolase 2, gamma, neuronal	5.9	0.000 *
Eno3	NM_012949	enolase 3, beta, muscle	0.7	0.457
Fasn	NM_017332	fatty acid synthase	0.8	0.433
Fasn	AI179334	fatty acid synthase	2.1	0.000 *
Fh1	NM_017005	fumarate hydratase 1	0.9	0.355
Gapdh	AFFX_Rat_GAPDH_3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3.0	0.001 *
Gapdh	AFFX_Rat_GAPDH_5	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.7	0.003 *
Gapdh	AFFX_Rat_GAPDH_M	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.6	0.003 *
Gapdh ///		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ///		
Gapdh-ps 2	NM_017008	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pseudogene 2	4.0	0.001 *
Gck	NM_012565	glucokinase	0.3	0.152
Gda	AF245172	guanine deaminase	3.8	0.001 *
Got1	D00252	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	1.1	0.589
Got2	NM_013177	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	2, 2.1	0.002 *

Pancreatic tissues derived from Kras301 PDAC rats (n=6) and Kras301 control rats (n=4) were analyzed.

§: Expression levels were too low to be analyzed accurately by microarray analysis

*: p-values lower than 0.05.

Table 6 (continued). Microarray analysis of mRNA from pancreatic tissues from Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats.

Gene Symbol	Representative Public ID	Gene Title	Fold	p-value
Got2 LOC2977 93 LOC3141 23	/// /// BI296539	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2) /// similar to Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (Transaminase A) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2) /// similar to Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (Transaminase A) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2)	1.6	0.029 *
Gpd1	NM_022215	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	1.3	0.737
Gpd1	BI277042	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	0.3	0.048 *
Gpi	BI283882	glucose phosphate isomerase	3.9	0.000 *
Gpt	NM_031039	glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)	0.1	0.009 *
Hk1	NM_012734	hexokinase 1	0.8	0.476
Hk1	AFFX_Rat_Hexokinase_3	hexokinase 1	2.4	0.056
Hk1	AFFX_Rat_Hexokinase_5	hexokinase 1	0.8	0.559
Hk1	AFFX_Rat_Hexokinase_M	hexokinase 1	0.7	0.319
Hk2	NM_012735	hexokinase 2	1.3	0.366
Hk2	BI294137	Hexokinase 2	1.8	0.001 *
Hprt1	M86443	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1.3	0.047 *
Idh2	AI172491	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	0.5	0.000 *
Idh3a	NM_053638	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	2.3	0.001 *
Idh3B	AI171793	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	0.7	0.000 *
Idh3g	BI277627	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD), gamma	0.6	0.001 *
Ldha	NM_017025	lactate dehydrogenase A	2.6	0.004 *
Ldhb	AA848319	lactate dehydrogenase B	2.3	0.005 *
Ldhc	NM_017266	lactate dehydrogenase C	0.4	0.334
Ldhd	AI145761	lactate dehydrogenase D	0.7	0.380
Ldhd	AI501131	lactate dehydrogenase D	0.4	0.051
Mdh1	NM_033235	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	0.6	0.003 *
Mdh1	BG671530	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	0.6	0.004 *
Mdh2	NM_031151	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	0.6	0.009 *
Me1	M30596	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	3.1	0.003 *
Me1	NM_012600	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	2.0	0.035 *
Nt5c3	AI409146	5'-nucleotidase, cytosolic III	0.8	0.151
Nt5c3l	BF412799	5'-nucleotidase, cytosolic III-like	0.9	0.360
Nt5e	NM_021576	5' nucleotidase, ecto	1.1	0.745
Nt5e	BI289470	5' nucleotidase, ecto	1.1	0.696

Pancreatic tissues derived from Kras301 PDAC rats (n=6) and Kras301 control rats (n=4) were analyzed.

§: Expression levels were too low to be analyzed accurately by microarray analysis

*: p-values lower than 0.05.

Table 6 (continued). Microarray analysis of mRNA from pancreatic tissues from Kras301 control rats and Kras301 PDAC rats.

Gene Symbol	Representative Public ID	Gene Title	Fold	p-value
Nt5m	AA819763	5',3'-nucleotidase, mitochondrial	2.6	0.052
Ogdh	BI277513	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	1.3	0.004 *
Ogdh	BE103050	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	1.0	0.968
Pc	NM_012744	pyruvate carboxylase	0.4	0.016 *
Pdha1	AI411413	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	0.7	0.005 *
Pdha1	BF561717	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	0.5	0.006 *
Pdha2	NM_053994	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2	0.1	0.302
Pdhb	BM389223	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	0.4	0.001 *
Pfkl	NM_013190	phosphofructokinase, liver	1.0	0.952
Pfkm	NM_031715	phosphofructokinase, muscle	0.8	0.001 *
Pfkm	AI071717	phosphofructokinase, muscle	0.3	0.143
Pfkm	BI291434	phosphofructokinase, muscle	0.4	0.165
Pfkp	BM389769	phosphofructokinase, platelet	3.5	0.001 *
Pgam1	NM_053290	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	1.8	0.004 *
Pgam2	NM_017328	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	0.7	0.287
Pgk1	NM_053291	phosphoglycerate kinase 1	0.3	0.131
Pgk1	NM_053291	phosphoglycerate kinase 1	3.4	0.005 *
Pgk1	BI279760	phosphoglycerate kinase 1	2.2	0.011 *
Pklr	NM_012624	pyruvate kinase, liver and RBC	0.1	0.207
Pklr	M17685	pyruvate kinase, liver and RBC	0.3	0.273
Pkm2	NM_053297	pyruvate kinase, muscle	7.7	0.001 *
Sdha	NM_130428	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0.8	0.009 *
Sdhb	AI172320	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	0.9	0.099
Sdhc	AI009817	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein	0.7	0.001 *
Sdhd	AI410703	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	1.0	0.911
Sdhd	AI176608	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	0.8	0.009 *
Sucla2	BF412750	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	0.9	0.680
Sucla2	H31112	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	0.6	0.596
Sucla2	AA923982	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	0.7	0.001 *
Suclg1	NM_053752	succinate-CoA ligase, alpha subunit	0.5	0.000 *
Suclg2	AI237518	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	0.4	0.000 *
Tpi1	NM_022922	triosephosphate isomerase 1	3.0	0.001 *
Uox	M24396	urate oxidase	0.1	0.221 §
Upb1	NM_053845	ureidopropionase, beta	0.1	0.387 §
Upp1	BI292558	uridine phosphorylase 1	9.8	0.000 *
Xdh	NM_017154	xanthine dehydrogenase	2.5	0.001 *

Pancreatic tissues derived from Kras301 PDAC rats (n=6) and Kras301 control rats (n=4) were analyzed.

§: Expression levels were too low to be analyzed accurately by microarray analysis

*: p-values lower than 0.05.

3-7 メタボロミクス解析およびトランスクリプトミクス解析の統合解析

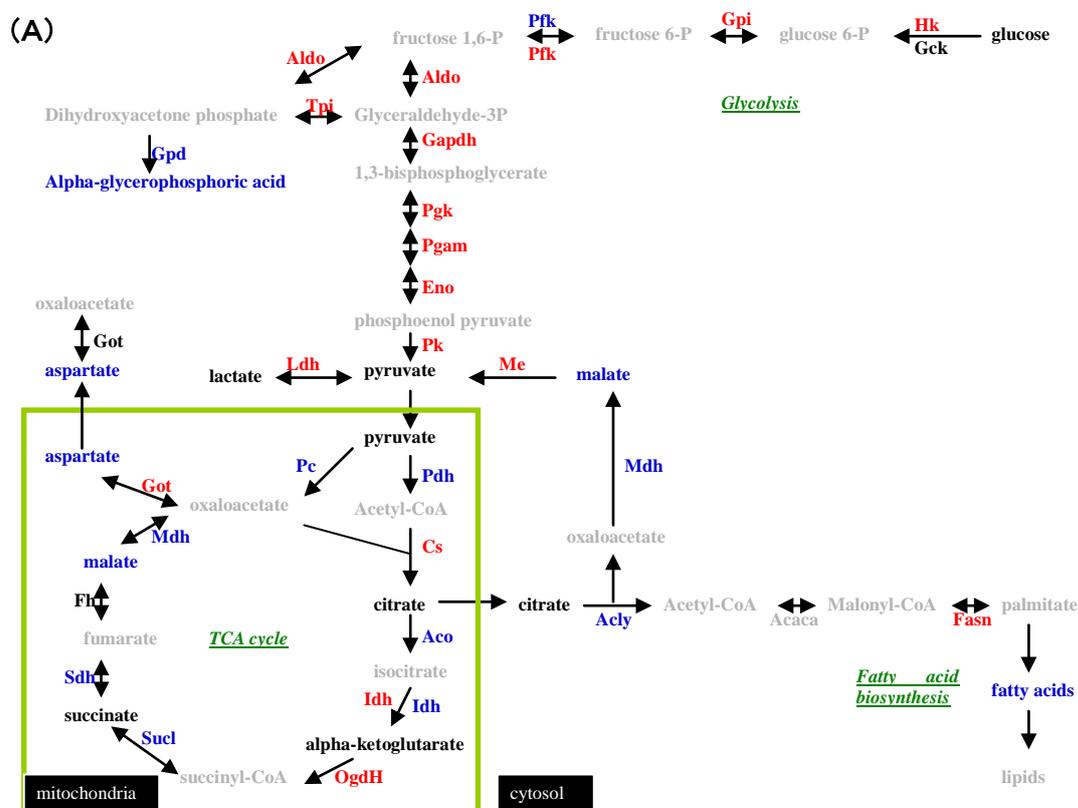
メタボロミクス解析およびトランスクリプトミクス解析を統合解析した結果を Figure 7 に示した。代謝物量および mRNA 発現は Kras301 対照ラットと Kras301 PDAC ラットとの間において有意差が認められたものは変化したと評価した。また、有意差がなく、増加傾向（変化率 1.5 倍以上）および低下傾向（変化率 0.7 倍以下）を示した代謝物量についてもそれぞれ増加および低下したと評価した。

膵がん組織において、嫌氣的解糖系に関連する多くの遺伝子の mRNA 発現が増加し、TCA 回路に関連する多くの遺伝子の mRNA 発現が低下した (Figure 7A)。Malate の低下が認められたが、glucose、pyruvate および lactate の変化は認められなかった。脂肪酸生合成に関連する酵素の adenosine triphosphate citrate lyase (Acl) の mRNA 発現は低下、fatty acid synthase (Fasn) の mRNA 発現は増加し、いくつかの脂肪酸の量が低下した (Figure 7A)。

Arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5) 活性化に必要な arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (Alox5ap) の mRNA 発現が膵がん組織で増加した (Figure 7B)。アラキドン酸代謝経路において arachidonic acid は linoleic acid より生合成され、Alox5 によって leukotriene へ代謝される。したがって、Alox5ap の mRNA 発現増加は膵がん組織の linoleic acid 量および arachidonic acid 量の低下と関連しているかもしれない。

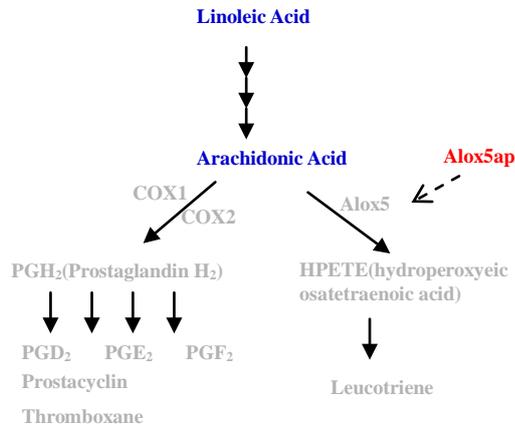
膵がん組織において、purine および pyrimidine ヌクレオチド分解に関連

する多くの遺伝子の mRNA 発現が増加した (Figure 7C)。しかし、pyrimidine ヌクレオチド分解の beta-alanine より下流の代謝に関する遺伝子の mRNA 発現は低下した。これらの変化は、膀胱がん組織における adenosine monophosphate の低下、xanthine、uridine と beta-alanine の増加という代謝状態に関連しているかもしれない。



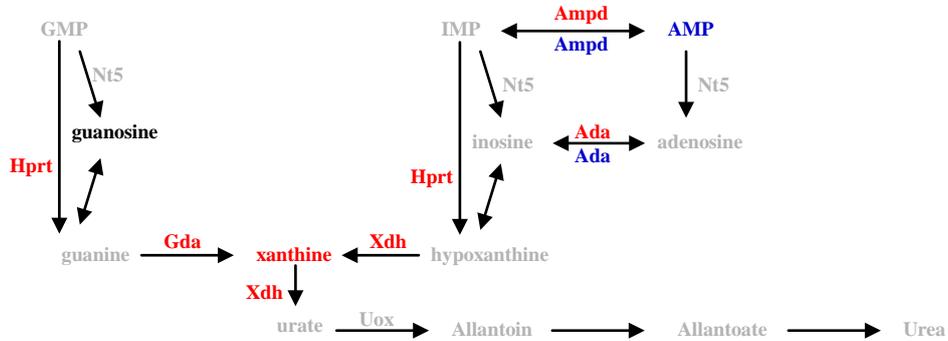
(B)

Arachidonic acid metabolism



(C)

Purine nucleotide degradation



Pyrimidine nucleotide degradation

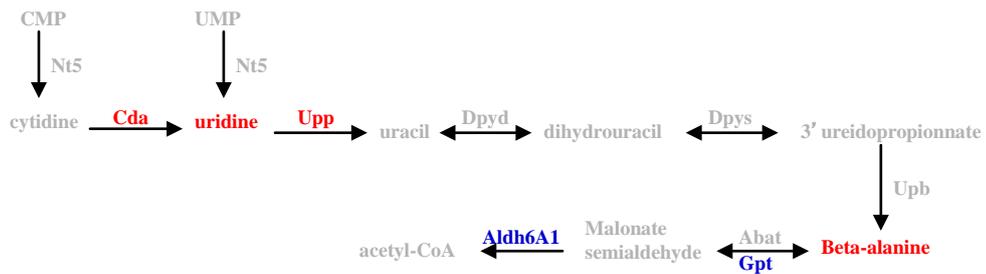


Figure 7. Schematic representations of the most relevant metabolic and transcriptional differences in pancreatic tissues between Kras301 PDAC rats and Kras301 control rats. Red, higher concentration in Kras301 PDAC rats. Blue, lower concentration in Kras301 PDAC rats. Black, not changed. Grey, not determined or unclear. 1 Pfkf was increased while Pfk m was decreased. 2 Idh3a was increased while Idh2, Idh3B, and Idh3g were decreased. 3 Ampd3 was increased while Ampd2 was decreased. 4 Ada, Adarb1, and Adarb2 were increased while Adar was decreased.

第 4 節 考察

ノンターゲット GC-MS メタボロミクス解析データの PCA スコアプロットでは、膵がん組織、正常膵組織および血清のいずれにおいても、Kras301 PDAC ラットと Kras301 対照ラットのクラスターは明らかに分離し、メタボロームプロファイルが異なることがわかった。

このクラスターの分離に寄与した代謝産物としての palmitoleic acid 量は、Kras301 PDAC ラットの血清で有意に低下し、膵がん組織で低下傾向を示した。Palmitoleic acid は palmitic acid から生合成されるモノ不飽和脂肪酸である。Palmitoleic acid はラットの飼料に含まれるため、palmitoleic acid 量の低下は消化管からの吸収低下に起因するかもしれない。そうであれば膵組織と血清における palmitoleic acid 量の低下は同程度と考えられるが、膵がん組織における低下は血清に比べて顕著であった。膵がん組織の palmitoleic acid の低下は有意差が認められなかったが、Kras301 PDAC ラットでの最高値は 13.77 p.p.m.、Kras301 対照ラットの最低値は 100.33 p.p.m. であり、7 倍の差があった。これらのことから、膵がん組織における palmitoleic acid 量の低下が、血清における低下も引き起こしたと考えられる。よって、血清中の palmitoleic acid はヒト PDAC 診断のバイオマーカーとなりうる。

その他に 2 個の代謝産物、arachidonic acid と 2(1H)-pyrimidinone 量が Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および血清において低下することが示された。これらの代謝産物は膵がん組織において有意に低下し、血清において低下傾向を示した。アラキドン酸代謝経路において arachidonic acid は linoleic

acid より生合成され、Alox5 によって leukotriene へ代謝される。Alox5ap は Alox5 の活性化に必要である。したがって、Kras301 PDAC ラットの膵がん組織における arachidonic acid 量の低下は膵がん組織における Alox5ap 遺伝子の mRNA 発現増加と関連しているかもしれない。なぜなら、Alox5ap の発現増加により Alox5 が活性化され膵がん組織中の linoleic acid と arachidonic acid 量が低下したと考えられるからである。しかし、linoleic acid と arachidonic acid は必須脂肪酸であることから、消化管からの吸収低下に起因するかもしれない。Linoleic acid と arachidonic acid の低下がアラキドン酸代謝異常に起因するのか、あるいは消化管からの吸収低下に起因するのか検討が必要である。

がん細胞増殖の特徴のひとつが、*de novo* 脂肪酸合成である [54]。種々のがん腫およびそれらの前がん病変において、脂肪酸生合成酵素 (Acetyl-CoA carboxylase、Acly および Fasn) による citrate からの *de novo* 脂肪酸合成が促進される [54]。しかし、本研究ではいくつかの脂肪酸量が膵がん組織において低下した。Acly の発現低下が脂肪酸合成の低下を誘発した可能性がある。

がん細胞増殖の他の特徴が、がん細胞が glucose をすばやく代謝して主に lactate へ変換する Warburg 効果の存在である [52, 53]。口腔がん、大腸がんおよび胃がん患者のがん組織および血清における glucose 量の低下 [55, 56]、および膵がん患者血清における lactate 量の低下 [57] などが報告されている。本研究のトランスクリプトミクス解析では Kras301 PDAC ラットの膵がん組織における嫌氣的解糖系の活性化および TCA 回路の抑制が示唆され

たが、glucose 量の低下および lactate 量の増加は Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および血清を材料とした解析では認められなかった。Glucose および lactate に Warburg 効果が見られなかった理由は、ラットでの PDAC 発生から短い期間 (<2 週間) ではがんの進行が glucose 量や lactate 量を攪乱するほど充分でなかった可能性がある。

Kras301 PDAC ラットにおいて glucose 量や lactate 量の変動は認められなかったが palmitoleic acid 量の変動が示唆されたということは、進行がんの患者で見られる glucose や lactate の量的な変動 [55-57] を、がんが進行していない患者 (およびモデル動物) において認めなくとも、palmitoleic acid 量の変動を認める可能性が考えられる。

膵がん組織におけるヌクレオチド代謝に関わるいくつかの酵素の mRNA 発現の増加、およびヌクレオチド分解産物の xanthine、uridine および beta-alanine 量の増加は、膵がん組織におけるヌクレオチド分解の促進を示唆している。ヌクレオチド分解促進は、がん細胞増殖に伴う核酸合成の亢進に起因すると考えられる。

胆汁酸の主な成分である chenodeoxycholic acid 量が Kras301 PDAC ラットの血清で増加することが示唆された。この所見は、Urayama らによる膵がん患者血清のメタボロミクス解析で胆汁酸の taurocholic acid 量と tauroursodeoxycholic acid 量の増加が示された結果と一致している [58]。

まとめると、Kras301 PDAC ラット血清のメタボロミクス解析で量的な低下が示唆された palmitoleic acid は、ヒト PDAC の診断バイオマーカー候補

になりうる。さらに、Kras301 PDAC ラット膵がん組織のトランスクリプトミクス解析において、嫌氣的解糖系およびヌクレオチド代謝、TCA 回路、アラキドン酸代謝に関連するいくつかの遺伝子群が明らかになった。これらの所見は、ヒトの膵がん進展における各種代謝システムの役割の理解を理解するうえで重要な基礎的知見である。

総括

本研究では、ヒト PDAC モデルラット (Hras250 および Kras301 PDAC ラット) から採取した膵組織および血清について、プロテオミクス解析 (第 1 章)、miRNA 解析 (第 2 章)、メタボロミクス解析およびトランスクリプトミクス解析 (第 3 章) を行った。

プロテオミクス解析では、Hras250 PDAC ラットの膵がん組織および正常膵組織のプロテオームプロファイルを比較し、膵がん組織において発現が増加したタンパク 30 個を同定した。30 個のタンパクのうち 21 個のヒトホモログタンパクは、ヒトの膵がん組織における発現増加が報告されており、Hras250 PDAC ラットおよびヒトの膵がん組織でのタンパク発現プロファイルが類似していることが示唆された。

miRNA 解析では、Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および血清の miRNA 発現プロファイルを Kras301 対照ラットと比較した。膵がん患者の血漿において発現が増加することが報告されている 4 個の miRNA のうち、3 個の miRNA が Kras301 PDAC ラットの血清においても発現が増加した。Kras301 PDAC ラットと膵がん患者の血中 miRNA の発現プロファイルは類似しており、本モデルラットはヒト PDAC 診断のための新規バイオマーカー候補探索に有用であることが示された。また、Kras301 PDAC ラットの血清において miR-375 の発現低下、miR-369-5p、miR-376a および miR-203 の発現増加が認められた。これらはヒト PDAC の新規血清バイオマーカー候

補である。

メタボロミクス解析では、Kras301 PDAC ラットの膵がん組織および血清を材料に各種経路における代謝産物の量的変化を Kras301 対照ラットと比較した。Kras301 PDAC ラットの血清において palmitoleic acid 量の低下が示唆されたことにより palmitoleic acid はヒト PDAC 診断のための新規血清バイオマーカー候補と考えられた。また、本モデルラットはヒトの膵がん進展における各種代謝システムの役割を理解するうえで有用である。

トランスクリプトミクス解析では、Kras301 PDAC ラットの膵がん組織の mRNA 発現プロファイルを Kras301 対照ラットの正常膵組織と比較した。膵がん組織における嫌氣的解糖系およびヌクレオチド代謝に関わる遺伝子の mRNA の発現増加、TCA 回路に関わる遺伝子の mRNA の発現低下が認められた。加えて、脂肪酸代謝に関連する遺伝子の mRNA 発現の変化 (Acl1 遺伝子では発現低下、Fasn 遺伝子では発現増加)、アラキドン酸代謝に関連する Alox5ap 遺伝子の mRNA 発現増加が認められた。メタボロミクス解析とトランスクリプトミクス解析の統合は、膵がん進展における各種経路に関連した代謝システムの理解に役立つ。

これらの一連の解析により、ヒト PDAC モデルラットがヒト PDAC の新規バイオマーカー候補の探索に有用であることが証明された。実際に、本研究において miR-375、miR-369-5p、miR-376a、miR-203 および palmitoleic acid がヒト PDAC の血中における新規バイオマーカー候補として見出された。今後、これら新規バイオマーカー候補の実用性を、ヒトの血液サンプルを

用いて検証する必要がある。

本研究で用いた PDAC モデルラットの前がん病変は病理組織学的にヒトの PanIn と類似していることから、PDAC モデルラットの前がん病変を詳細に観察することにより、ヒト PanIn や早期がんのバイオマーカー候補を探索することが可能であると考えられる。さらに、PDAC モデルラットのオミクス解析は、ヒト PDAC の診断や治療効果判定のバイオマーカーの探索だけでなく、ヒト PDAC の発がん機序の解明や創薬開発にも役立つことが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、始終御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院医学研究科・医学部分子毒性学分野の酒々井眞澄教授、名古屋市立大学津田特任研究室の津田洋幸教授、大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学の鰐淵英樹教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成に際し、有益な御助言と御指導を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室の稲垣直樹教授に感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、実験の立案および実施、実験動物関連の諸作業、データ解析等において甚大なる御協力を賜りました名古屋市立大学大学院医学研究科・医学部分子毒性学分野講師の深町勝巳博士、名古屋市立大学大学院医学研究科・医学部消化器・代謝内科学の田中創始博士、名古屋市立大学津田特任研究室の David B. Alexander 博士、大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学講師の梯アンナ博士、住友化学株式会社生物環境科学研究所の宇和川賢博士、川村聡博士、西岡和彦博士、出口慶人氏、住田佳代博士、須方督夫博士、味方和樹博士、宮田かおり博士、尾崎正和博士、福田貴子博士、菊池文健氏に感謝の意を表します。

参考文献

1. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2003*. CA Cancer J Clin, 2003. **53**(1): p. 5-26.
2. Smit, V.T., et al., *KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(16): p. 7773-7782.
3. Akdogan, M., et al., *Extraordinarily elevated CA19-9 in benign conditions: a case report and review of the literature*. Tumori, 2001. **87**(5): p. 337-339.
4. Ni, X.G., et al., *The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer*. European Journal of Surgical Oncology, 2005. **31**(2): p. 164-169.
5. Duffy, M.J., *CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: A review*. Annals of Clinical Biochemistry, 1998. **35**(3): p. 364-370.
6. Sandblom, G., S. Granroth, and I.C. Rasmussen, *TPS, CA 19-9, VEGF-A, and CEA as diagnostic and prognostic factors in patients with mass lesions in the pancreatic head*. Upsala Journal of Medical Sciences, 2008. **113**(1): p. 57-64.
7. Moore, M.A., et al., *Immunohistochemically demonstrated increase in glutathione S-transferase species in propyl nitrosamine-induced focal proliferative and neoplastic Syrian hamster pancreatic lesions*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1987. **52**(6): p. 479-488.
8. Majima, T., et al., *Mutations of K-ras but not p53 genes in biliary duct and pancreatic duct carcinomas induced in hamsters by cholecystoduodenostomy with dissection of the common duct followed by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine*. Cancer Lett, 1997. **118**(1): p. 47-53.
9. Grippo, P.J., et al., *Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2016-2019.
10. Quaife, C.J., et al., *Pancreatic neoplasia induced by ras expression in acinar cells of transgenic mice*. Cell, 1987. **48**(6): p. 1023-1034.
11. Brembeck, F.H., et al., *The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2005-2009.

12. Hingorani, S.R., et al., *Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse*. *Cancer Cell*, 2003. **4**(6): p. 437-450.
13. Aguirre, A.J., et al., *Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3112-3126.
14. Ueda, S., et al., *Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(12): p. 2497-2510.
15. Tanaka, H., et al., *Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(2): p. 341-346.
16. Fukamachi, K., et al., *An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **390**(3): p. 636-641.
17. Chen, J.H., et al., *Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in human pancreatic cancer tissue*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009. **8**(2): p. 193-200.
18. Chen, R., et al., *Pancreatic cancer proteome: the proteins that underlie invasion, metastasis, and immunologic escape*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(4): p. 1187-1197.
19. Chung, J.C., et al., *Proteomic analysis to identify biomarker proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *ANZ J Surg*, 2008. **78**(4): p. 245-251.
20. Crnogorac-Jurcevic, T., et al., *Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(5): p. 1454-1463.
21. Cui, Y., et al., *Proteomic and tissue array profiling identifies elevated hypoxia-regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(7): p. 747-755.
22. Lu, Z., et al., *Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue*. *Proteomics*, 2004. **4**(12): p. 3975-3988.
23. Mikuriya, K., et al., *Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*. *Int J Oncol*, 2007. **30**(4): p. 849-855.

24. Pan, S., et al., *Quantitative proteomics investigation of pancreatic intraepithelial neoplasia*. Electrophoresis, 2009. **30**(7): p. 1132-1144.
25. Sitek, B., et al., *Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation*. J Proteome Res, 2009. **8**(4): p. 1647-1656.
26. Nakamura, H., et al., *Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer*. Cancer Detect Prev, 2000. **24**(1): p. 53-60.
27. Sitek, B., et al., *Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Proteomics, 2005. **5**(10): p. 2665-2679.
28. Sun, Z.L., et al., *Serum proteomic-based analysis of pancreatic carcinoma for the identification of potential cancer biomarkers*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1774**(6): p. 764-771.
29. Yamamoto, S., et al., *Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(2): p. 165-172.
30. Aebersold, R., et al., *Perspective: a program to improve protein biomarker discovery for cancer*. J Proteome Res, 2005. **4**(4): p. 1104-1109.
31. Guweidhi, A., et al., *Enhanced expression of 14-3-3sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1575-1585.
32. Chang, T.C. and J.T. Mendell, *microRNAs in vertebrate physiology and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2007. **8**: p. 215-239.
33. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 350-355.
34. Lee, E.J., et al., *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(5): p. 1046-1054.
35. Bloomston, M., et al., *MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis*. Journal of the American Medical Association, 2007. **297**(17): p. 1901-1908.

36. Wang, J., et al., *MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease*. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.), 2009. **2**(9): p. 807-813.
37. Szafranska, A.E., et al., *MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4442-4452.
38. Szafranska, A.E., et al., *Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues*. Clin Chem, 2008. **54**(10): p. 1716-1724.
39. Greither, T., et al., *Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival*. International Journal of Cancer, 2010. **126**(1): p. 73-80.
40. Zhang, Y., et al., *Profiling of 95 MicroRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis*. World Journal of Surgery, 2009. **33**(4): p. 698-709.
41. Greither, T., et al., *Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival*. International Journal of Cancer, 2010. **126**(1): p. 73-80.
42. Ikenaga, N., et al., *MicroRNA-203 Expression as a New Prognostic Marker of Pancreatic Adenocarcinoma*. Annals of Surgical Oncology, 2010. **17**(12): p. 3120-3128.
43. Wang, G.K., et al., *Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans*. European Heart Journal, 2010. **31**(6): p. 659-666.
44. Fukushima, T., et al., *Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride--regulating role of micro-RNA for RNA expression*. Journal of Toxicological Sciences, 2007. **32**(4): p. 401-409.
45. Davis-Dusenbery, B.N. and A. Hata, *MicroRNA in cancer: The involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways*. Genes and Cancer, 2010. **1**(11): p. 1100-1114.
46. Gironella, M., et al., *Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(41): p. 16170-16175.
47. Schetter, A.J., et al., *MicroRNA expression profiles associated with*

- prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma.* JAMA, 2008. **299**(4): p. 425-436.
48. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer.* Gynecologic Oncology, 2008. **110**(1): p. 13-21.
49. Poy, M.N., et al., *A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.* Nature, 2004. **432**(7014): p. 226-230.
50. Weckwerth, W. and K. Morgenthal, *Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation.* Drug Discov Today, 2005. **10**(22): p. 1551-1558.
51. Sreekumar, A., et al., *Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression.* Nature, 2009. **457**(7231): p. 910-914.
52. Garber, K., *Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer.* J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(24): p. 1805-1806.
53. Warburg, O., *On the origin of cancer cells.* Science, 1956. **123**(3191): p. 309-314.
54. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 763-777.
55. Tiziani, S., V. Lopes, and U.L. Gunther, *Early stage diagnosis of oral cancer using 1H NMR-based metabolomics.* Neoplasia, 2009. **11**(3): p. 269-276, 4p following 269.
56. Hirayama, A., et al., *Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.* Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4918-4925.
57. Nishiumi, S., et al., *Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer.* Metabolomics, 2010. **6**(4): p. 518-528.
58. Urayama, S., et al., *Comprehensive mass spectrometry based metabolic profiling of blood plasma reveals potent discriminatory classifiers of pancreatic cancer.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(5): p. 613-620.

略語

- Acly** : adenosine triphosphate citrate lyase、脂肪酸生合成酵素の 1 つ。
- Alox5ap** : arachidonate 5-lipoxygenase activating protein、アラキドン酸カスケードでのロイコトリエン産生に関与する酵素。
- Alox5ap** : arachidonate 5-lipoxygenase activating protein、Alox5 活性化に必要なタンパク。
- CK** : cytokeratin、主に単一上皮細胞の細胞骨格を構成するケラチン繊維タンパクで、19 種の亜分画が存在する。
- EGF** : epidermal growth factor、上皮成長因子。細胞表面に存在する EGFR にリガンドとして結合し、細胞の成長と増殖を制御するタンパク。
- EGFR** : epidermal growth factor receptor、上皮成長因子受容体。EGF を認識し、シグナル伝達を行う受容体である。
- Fasn** : fatty acid synthase、脂肪酸生合成酵素の 1 つ。
- FFPE** : formalin (or (para)formaldehyde) fixed and paraffin embedded、ホルマリンあるいは (パラ) フォルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋。組織標本の作製に汎用されている手法。
- GC-MS** : gas chromatography-mass spectrometry、サンプルを気体にし、ガスクロマトグラフ (GC) 部で成分分離した後、MS 部でイオン化させ、それらのイオンを質量分析計で検出する分析手法。

- iTRAQ** : isobaric tags for relative and absolute quantification、タンパクの定量比較に用いられる安定同位体標識タグ。
- miRNA** : micro RNA、18~24 塩基ほどの 1 本鎖 RNA で、タンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA の 1 種。
- LC-MS/MS**: liquid chromatography-tandem mass spectrometry、サンプルを液体クロマトグラフィー (LC) 部で親和性の差によって成分ごとに分離した後、MS 部でさらに質量ごとに分離して特定の質量イオンを解離・フラグメント化させ、それらのイオンを質量分析計で検出する分析手法。
- MMP** : matrix metalloproteinase、メタロプロテアーゼ (活性中心に金属イオンが配座しているタンパク質分解酵素の総称) の一群。細胞外マトリックスの分解し、細胞表面に発現するタンパク質の分解、生理活性物質のプロセッシングなどその作用は多岐にわたる。
- MMTS** : methylmethanethiosulfonate、メチルメタンチオスルホン酸。システイン側鎖の SH 基を $-S-S-CH_3$ に変換してブロックする。
- PanIn** : pancreatic intraepithelial neoplasia、膵管腺がんの前駆病変である上皮内腫瘍。
- PDAC** : pancreatic ductal adenocarcinoma、膵管腺がん。
- PCA** : principal component analysis、主成分解析。多くの特性を持つ多変量のデータを互いに相関の無い少ない個数の特性値にまとめる手法。

- qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction、RNA を鋳型に逆転写を行い、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅を経時的に測定することで、増幅率に基づいて RNA の定量する方法。
- SDS : sodium dodecyl sulfate、ドデシル硫酸ナトリウム。陰イオン性界面活性剤の 1 つ。
- TCA : trichloroacetic acid、トリクロロ酢酸。
- TCEP : tris(2-carboxyethyl) phosphine、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン。還元剤の 1 つ。
- TEAB : triethylammounium biocarbonate、重炭酸トリエチルアンモニウム。
- TIC : total ion current、イオン源の中に存在する全てのイオンの電流の合計。装置が 1 つのイオンのみを検出する場合 (選択イオンモニタリング) は、選択されたイオン電流のみの合計。
- TOFMS : time-of-flight mass spectrometry、加速させたイオンの飛行時間を計測することにより対象の質量を測定する質量分析計。