

博士論文

膵癌で高発現する新規 **circular RNA** の同定とバイオマーカー応用

清宮 崇博

膵癌で高発現する新規 **circular RNA** の同定とバイオマーカー応用

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

指導教員 小池和彦教授

清宮 崇博

目次

1. 要旨.....	- 4 -
2. 序文.....	- 5 -
3. 方法.....	- 8 -
① ヒト臨床検体.....	- 8 -
② 細胞.....	- 9 -
③ RNase R 処理.....	- 11 -
④ High-throughput RNA sequencing.....	- 11 -
⑤ circRNA の同定.....	- 12 -
⑥ 発現変動 circRNA 解析.....	- 12 -
⑨ RNA <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション.....	- 15 -
⑩ circPDAC RNA 発現プラスミドおよび安定発現細胞の樹立.....	- 15 -
⑪ 細胞増殖アッセイ.....	- 16 -
⑫ カスタム抗体作成.....	- 17 -
⑬ Enzyme-linked immunosorbent assay.....	- 17 -
⑭ 免疫蛍光染色.....	- 18 -
⑮ 免疫沈降.....	- 19 -
⑯ Western blot 法.....	- 20 -
⑰ エクソソーム中の RNA の抽出.....	- 20 -

⑱	Droplet digital PCR による血清 circRNA 測定	- 21 -
⑲	統計分析	- 22 -
4.	結果	- 23 -
①	RNA シーケンスによる circRNA の網羅的な検出	- 23 -
②	膵癌で高発現する新規 circRNA の全長配列	- 27 -
③	circPDAC RNA の発現分布	- 31 -
④	circPDAC RNA の機能解析	- 40 -
⑤	circPDAC RNA のバイオマーカー応用	- 47 -
5.	考察	- 52 -
6.	結語	- 58 -
7.	引用文献	- 59 -
8.	謝辞	- 68 -

1. 要旨

膵癌と正常膵組織における circular RNA (circRNA) の発現を RNA シークエンスによって網羅的に解析し、膵癌で高発現する新規 circRNA を同定し、その全長配列を決定した。新規 circRNA は膵癌組織で高発現するのみならず、膵癌患者および膵管内乳頭粘液性腫瘍患者の血清からも検出された。新規 circRNA は新しい膵癌診断バイオマーカーとして応用できる可能性がある。

2. 序文

膵癌の罹患数は全世界で年間約 45 万人、死亡者数は年間約 43 万人であり、部位別癌死亡者数は全世界で第 7 位に位置している[1]。化学療法を含めた治療法の発展にも関わらず、膵癌患者の 5 年生存率は 9.3%に留まっており[2]、他の悪性腫瘍と比較しても膵癌は予後不良な難治癌の代表である。したがって、膵癌の予後改善のために、膵癌の病態解明およびそれを基盤にした新たな診断・治療法の開発が強く求められている。

近年、RNA シークエンスの発展によって、マイクロ RNA[3]やサテライトリピート RNA[4]などの種々のノンコーディング RNA が膵癌で異常発現することが報告され、膵癌の診断バイオマーカーとしての応用が期待されている[5,6]。Circular RNA (circRNA) は、環状構造を有する 1 本鎖の RNA であり、下流のエクソンが上流のエクソンと結合するバックスプライシングと呼ばれるプロセスを介して pre-mRNA から生成される。下流のエクソンから上流のエクソンに結合する部位はバックスプライスジャンクションと呼ばれ、この部分には通常のスプライシングによって形成される RNA には存在しない circRNA に特徴的な配列が生まれる(図 1)。

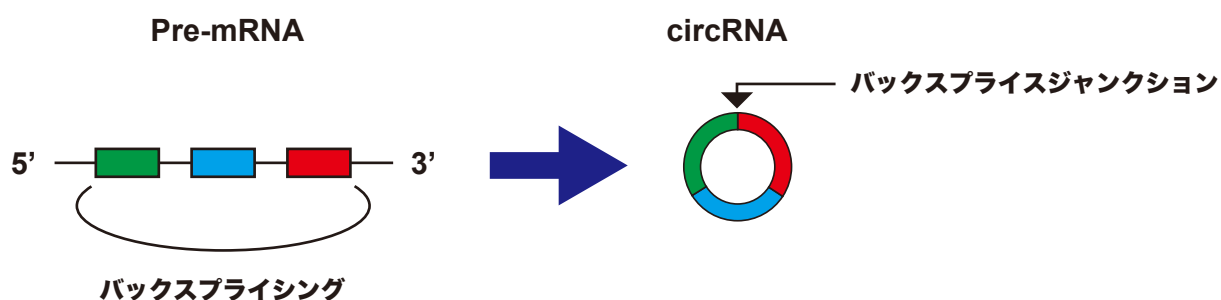


図 1 バックスプライシングによる circRNA の形成

circRNA の存在は 1990 年代から散発的に報告されていたが[7-10]、ヒトのトランスクリプトームにおける circRNA の全体像については長らく不明であった。近年の RNA シークエンス技術とバイオインフォマティクスツールの発展によって circRNA の網羅的な同定が可能になり、現在までに 180,000 種類以上の circRNA が同定され[11-13]、その発現様式は細胞の種類や発達の段階によって異なっていることが明らかにされている[14,15]。さらに、circRNA の発現量は、同じ遺伝子座から転写される直鎖 RNA の発現量とは必ずしも相関しておらず[15]、circRNA は独自の発現制御メカニズムと生物学的機能を有すると考えられている。

circRNA は 5'末端、3'末端のない環状構造を有するため、エクソヌクレアーゼに耐性であり[16]、直鎖 RNA と比較して半減期が長いことが知られている[17-19]。また、circRNA はエクソソームと呼ばれる細胞外小胞を介して血清中に遊離し、血清中の circRNA は室温で 24 時間インキュベートした後もほとんど分解されず安定して存在することが報告されており[18]、バイオマーカーとしての応用も期待されている。

circRNA は独自の生物学的機能を介して癌の病態に関与することが報告されている。circRNA の代表的な機能として、microRNA (miRNA) と結合することによって miRNA とターゲット RNA との結合を競合的に阻害する、'miRNA sponge' と呼ばれる機能が知られている[20]。circCCDC66[21]、circHIPK3[22]、circPVT1[23]をはじめとした多くの circRNA が miRNA sponge として癌の病態に関与していることが報告されている[24-26]。circRNA は miRNA sponge として働くだけでなく、タンパクと直接結合することも知られている。

circPOK[27]や circACC1[28]はタンパクとの直接結合を介して、そのタンパクの機能を調節することで、細胞増殖や血管新生の促進、代謝リプログラミングを誘導し、癌の進行を促進することが知られている。さらに、ヒトパピローマウイルス由来の circRNA は、E7 タンパクの翻訳テンプレートとなることで発癌を促進することが報告されている[29]。このように、circRNA は様々な機能を介して癌の病態に関与している(図 2)。

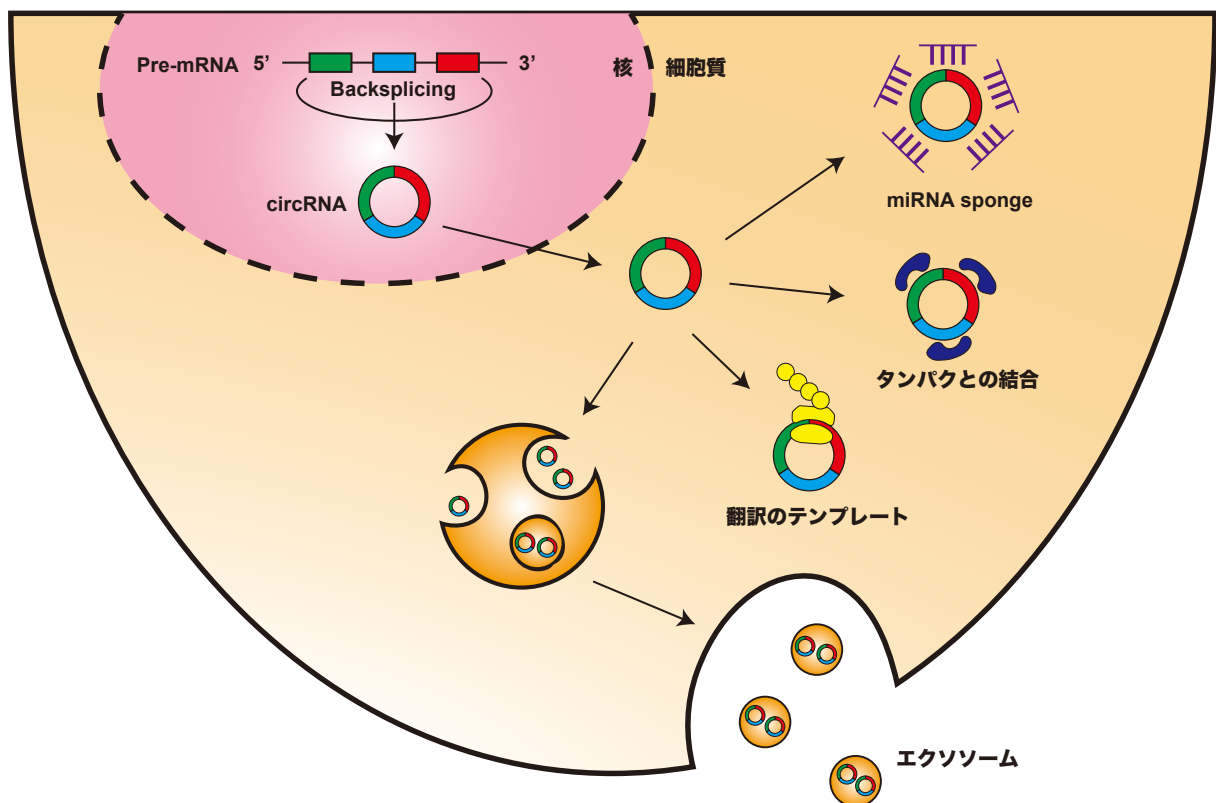


図 2 circRNA の生物学的機能

本研究では、膀胱癌と正常膀胱組織由来の RNA を用いて circRNA に特化した RNA シークエンスを行い、既知の circRNA にとどまらず新規の circRNA も含めて網羅的に探索した。さらに、膀胱癌で高発現する新規 circRNA の全長配列を決定し、バイオマーカーとしての有用性について検討した。

3. 方法

① ヒト臨床検体

膵癌組織および正常膵組織由来の total RNA は BioChain Institute Inc. (Newark, CA, USA) から購入した(膵癌組織由来: Lot B1031139、B704027、B704037、A803015、正常膵組織由来: Lot B712067、B701110)。正常膵組織由来 RNA は Takara Bio (Shiga, Japan) からも購入した(カタログ番号 636577)。B1031139、B704037、B712067、B701110 を RNA シークエンスに使用した。組織マイクロアレイは US Biomax (Derwood, MD, USA) から購入した。購入した型番は以下の通りである。PA483e (40 例の膵癌および 8 例の正常膵組織)、BIC14011b (14 例の Pancreatic intraepithelial neoplasia、4 例の膵癌組織および 3 例の正常膵組織)、CO483b (40 例の大腸癌および 8 例の正常大腸組織)、PR483d (40 例の前立腺癌および 8 例の正常前立腺組織)、BR248b (18 例の乳癌および 6 例の正常乳腺組織)。膵癌患者および膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) 患者の血清は 2018 年 1 月から 2019 年 8 月までに東京大学医学部附属病院を受診した患者から採取した。悪性腫瘍および膵疾患の既往を有さない健常者の血清は 2018 年 8 月から 2018 年 9 月までに大宮シティクリニックを受診した患者から採取した。膵癌の診断は EUS-FNA で得られた組織の病理診断もしくは CT、MRCP による典型的な画像所見によってなされた。IPMN の診断は CT、MRI による典型的な画像所見によってなされた。血清採取について患者から文書による同意を得た。本

研究は東京大学倫理委員会の承認〔承認番号 11712-(1)〕および東京大学医科学研究所倫理委員会の承認〔承認番号 28-19-0907〕を受け行われた。

② 細胞

ヒト膵癌細胞株 BxPC-3, Capan-1, Panc-1, MIAPACA-2 は The American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入した。BxPC-3 は 10% 胎児ウシ血清 (FBS) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 培地で培養した。Panc-1 は 10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)で培養した。Capan-1 は 20% FBS と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した Iscove's modified Dulbecco's medium で培養した。MIAPACA-2 は 10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した minimum essential medium (MEM) で培養した。HPV-16 の E6 および E7 遺伝子によって不死化されたヒト正常膵管上皮細胞株 HPDE[30]は Kerafest (Boston, MA, USA) から購入した。HPDE は Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell, Heidelberg, Germany) で培養した。hTERT によって不死化されたヒト正常膵管上皮細胞株 HPNE[31] は ATCC から購入した。HPNE は 10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。ヒト正常線維芽細胞は National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIO, Osaka, Japan) から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。不死化ヒト肝細胞と不死化ヒ

ト大腸上皮細胞は Applied Biological Materials (ABM, Vancouver, Canada) から購入し、ABM の専用培地で培養した。ヒト人工多能性幹細胞は Takara Bio から購入し、Cellartis DEF-CS 500 Culture System で培養した。ヒト胎児腎細胞株 HEK293TN は System Biosciences (SBI, Mountain View, CA, USA) から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。ヒト大腸癌細胞株 SW620 は ATCC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した L-15 で培養した。ヒト大腸癌細胞株 Caco-2 は ATCC から購入し、20% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した MEM で培養した。ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2, Huh-7 は RIKEN BRC (Ibaraki, Japan), the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Osaka, Japan) からそれぞれ購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。ヒト子宮頸癌細胞株 Hela, Ca Ski は RIKEN BRC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM あるいは RPMI 培地でそれぞれ培養した。ヒト乳癌細胞株 MCF-7, MDA-MB-231 は ATCC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM あるいは L-15 でそれぞれ培養した。ヒト胃癌細胞株 MKN-7, MKN-45 は RIKEN BRC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した RPMI 培地で培養した。ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP, PC-3 は RIKEN BRC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した RPMI 培地で培養した。ヒト肉腫細胞株 HT1080 は ATCC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。ヒト類上皮癌

A431 は RIKEN BRC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。ヒト肺癌細胞株 A549 は RIKEN BRC から購入し、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で培養した。全ての細胞は 37°C、20% O₂、5% CO₂ 下で培養した。

③ RNase R 処理

Total RNA を 10 U/μg の RNase R (AR Brown, Tokyo, Japan) を加えて 37°C で 15 分間インキュベートした後、RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて推奨プロトコールに従って RNA を精製した。

④ High-throughput RNA sequencing

High-throughput RNA sequencing は BGI Genomics (Shenzhen, China) によって行われた。4 μg の肺癌組織由来 RNA (n=2) と正常膵組織由来 RNA (n=2) から Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina, San Diego, CA USA) を用いて ribosomal RNA を除去した後、RNase R 処理を行い circRNA の濃縮を行った。TruSeq Library Prep Kit v2 (Illumina) を用いて推奨プロトコールに従って RNA-sequencing library を準備した。Library は Illumina HiSeq 4000 装置を用いて 100-bp paired-end、1 サンプルあたり平均 7880 万リードでシーケンスされた。SOAPnuke[32]を用いて下記のパラメーターでフィルタリングを行った。パラメーター: -n 0.1 -l 20 -q 0.4 -A 0.25 -Q 2 -G -seqType 1。RNA シークエンスデー

タは Sequence Read Archive database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) にプロジェクトコード PRJNA591376 として登録した。

⑤ circRNA の同定

シーケンス結果から circRNA を同定するアルゴリズムである CIRI[33,34]と find_circ[14]を用いた circRNA の同定は BGI によって行われた。リファレンスゲノムとして hg19 を使用した。CIRI による解析では、BWA-MEM ‘-T 19’ を用いてリードアラインメントを行い、CIRI ver. 2.0.5 ‘-U 10 -S 200000 -E 0.1’ を用いて circRNA を同定した。Find_circ による解析では、Bowtie2 を用いてリードアラインメントを行い、find_circ py ver. 1.2 ‘-a 20 -m 2’ を用いて circRNA を同定した。

⑥ 発現変動 circRNA 解析

CIRIと find_circ によって circRNA のバックスプライスジャンクション由来と判定されたリード数を、マッピングされた総リード数で補正し、10 億リードあたりの junction read 数 (reads per billion mapped; RPB) をその circRNA の発現量として計算した。発現変動 circRNA 解析は DEseq2[35]を用いて行い、false discovery rate < 0.05 を発現変動 circRNA と定義した。

⑦ 定量 RT-PCR

Total RNA は ISOGEN2 (NIPPON GENE, Tokyo, japan) を用いて推奨プロトコールに従って付着細胞から抽出した。リアルタイム PCR は既報に従って行なった。具体的には、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) を用いて推奨プロトコールに従って逆転写反応を行った。Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo Co., Tokyo, Japan) と StepOnePlus real-timePCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてリアルタイム PCR を行なった。相対発現量は β actin mRNA で補正して delta-delta- C_T 法で決定した。RNase R 処理による発現量の変化率は RNase R 処理を行わないコントロールサンプルと比較して計算した。使用したプライマーの配列は以下の表の通りである。

circPDAC fw	5'-GCACACGCTCTTGAAAAATGG-3'
circPDAC rv	5'-AGGACCATCATCTGACATAGGG-3'
β actin fw	5'-CTGTGCTACGTCGCCCTGG-3'
β actin rv	5'-GCCACAGGACTCCATGCCC-3'
LOC100507377 fw	5'-TGCTTGTCCTGGAAACCAAC-3'
LOC100507377 rv	5'-TTGCTGCTTTGGGCTGAAAC-3'
LOC107987178 fw	5'-AACAGCAGGTGCCAAAGATG-3'
LOC107987178 rv	5'-TTCCTGTCACATGGGACTGC-3'
hsa_circ_0006357 fw	5'-AGGATACAGCCTGTGCACATCC-3'

hsa_circ_0006357 rv	5'-GCTTCCGCCAACAACTGGTC-3'
hsa_circ_000211 fw	5'-GACCTGTCAGGAGTTCATTGC-3'
hsa_circ_0002111 rv	5'-GCTCCCCATTTTCAGAATGAGC-3'
chr7:8062112 8110761 fw	5'-TAGCTGCAGCAGTCATTAC-3'
chr7:8062112 8110761 rv	5'-TGTACTAGAGGTCCGAACTTGC-3'
hsa_circ_0001678 fw	5'-TGTGCCCTGCAATGTAGAAGG-3'
hsa_circ_0001678 rv	5'-TATCCAAAGAGGAGGTTTCGCC-3'
hsa_circ_0004365 fw	5'-AGCTGTGGATCGAGTGAACGC-3'
hsa_circ_0004365 rv	5'-CAGACACCGTGTTTCACGTTGG-3'
hsa_circ_0000230 fw	5'-CAGGGAGGAGCAGTGAAAGAG-3'
hsa_circ_0000230 rv	5'-CTTCAGATGGGAGTTTTTCGGC-3'

⑧ 新規 circRNA の全長配列の同定

バックスプライスジャンクションの配列はサンガーシーケンスによって確認した。外向きプライマーをバックスプライスジャンクションの近傍に設計し、プライマーウォーキングによって全長配列を探索し、最終的に以下のプライマーを用いて新規 circRNA の全長を含む増幅産物を得てサンガーシーケンスによって全長配列を決定した。Fw: 5'-GCCTAACCAGCACCCAAGAT-3'、Rv: 5'-GGCCTTCTATGTAAGTCTTC-3'。

⑨ RNA *in situ* ハイブリダイゼーション

circRNA のバックスプライスジャンクションと相補的な配列のカスタムプローブは Advanced Cell Diagnostics (ACD, Hayward, CA, USA) へ設計依頼した。カスタムプローブと BaseScope Reagent (ACD) を用いて推奨プロトコールに従って RNA *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。具体的には、まず組織マイクロアレイスライドの脱パラフィンを行い、過酸化水素を 10 分間反応させ、15 分間熱処理を行い、プロテアーゼを 20 分間 40°C で反応させた。その後、HybEZ Hybridization System (ACD) を用いてカスタムプローブを 40°C で 2 時間反応させた。Amplifier #1 から #6 を 15 分から 30 分間 40°C で反応させた後、Amplifier #7 と #8 を 15 分から 30 分間室温で反応させた。Wash buffer で洗浄した後、BaseScope Detection Reagent Kit v2-RED (ACD) を用いてシグナルを可視化し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。染色画像は Olympus AX80 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。circPDAC RNA のシグナルは赤いドット状に染色され、核は青く染色された。赤色の面積と青色の面積の比を ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2012) を用いて算出し、circPDAC RNA の発現レベルを定量化した。

⑩ circPDAC RNA 発現プラスミドおよび安定発現細胞の樹立

268 塩基の circPDAC RNA の全長配列は、Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) に人工オリゴヌクレオチド合成を依頼した。pcDNA3.1(+) Laccase2 MCS Exon ベクターに

GT-AG スプライシング配列に隣接するように circPDAC RNA 配列をクローニングし、circPDAC RNA 発現プラスミドを作成した。pcDNA3.1(+) Laccase2 MCS Exon ベクターは Jeremy Wilusz 氏から提供を受けた [36] (Addgene plasmid #69893; http://n2t.net/addgene:66893; RRID:Addgene_69893)。circPDAC RNA を安定発現するポリクローナル細胞を得るためにレンチウイルスコンストラクトを作成した。Laccase2-circPDAC RNA 配列を pCDH ベクターにクローニングし、Lentivirus Packaging System (System biosciences, Palo Alto, CA, USA) を用いて推奨プロトコールに従ってレンチウイルスを作成した。具体的には、1 μg の pCDH-Laccase2-circPDAC RNA ベクターと 5 μg の pPACKH1 Packaging Plasmid mix (System Biosciences) を Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて 293TN 細胞にトランスフェクションした。48 時間後に培養上清を回収し、PEG-it Reagent (System Biosciences) を加えて 4°C で 24 時間反応させた後、1500 \times g で 30 分間遠心し、ペレットを 1 mL の PBS に懸濁しウイルス濃縮液を得た。ウイルスは膀胱癌細胞株 BxPC-3 に Polybrene reagent (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を用いて感染させ、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の puromycin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いてセレクションを行なった。

⑪ 細胞増殖アッセイ

細胞増殖アッセイは Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて行なった。96 ウェルプレートに 5,000 細胞/ウェルの濃度で細胞を播種し、一定の時間培養し

た後、10 μ L の cell counting reagent を各ウェルに添加し 37°C で 1 時間インキュベートした。

450 nm の吸光度を Multiskan FC Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。

⑫ カスタム抗体作成

ORF1 および ORF2 ペプチドに対するウサギポリクローナル抗体は Scrum (Tokyo, Japan) に作成委託した。ペプチドは 80% 以上の純度で合成され、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) をコンジュゲートさせた。KLH コンジュゲートされたペプチドを day 0, day 14, day 28, day 42 にウサギに免疫した。Day 49 に全血清を回収し、12,000 \times g 10 分間遠心後に 0.45 μ m ナイロンメッシュでフィルターした。抗血清から Antibody Purification Kit Protein A (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて推奨プロトコールに従ってアフィニティー精製を行なった。合成ペプチドの配列は以下の通りである。

ORF1:DEIQATELCFSOKQQMESSFRITII ,

ORF2-1:CVSAQSSKWNPASGPSSDIGEEDLHRRPNQHPRSYTLFFYKWKV ,

ORF2-2:CGILDSSKFFSTIFQERVLTSP。

⑬ Enzyme-linked immunosorbent assay

293TN を 6 ウェルプレートに播種し、0.4 μ g の circPDAC 発現ベクターあるいはコントロールベクターを Effectene transfection reagent (QIAGEN) を用いて推奨プロトコールに

従ってトランスフェクションした。48 時間後、細胞を回収し溶解した。タンパク濃度を BCA Protein Assay Kit (Takara Bio) を用いて測定した。捕捉抗体を炭酸バッファーで 1:1000 に希釈し、Nunc Maxisorp 96-well plate に 100 μ L の抗体希釈液を加え、4°C で 16 時間インキュベートした。抗体希釈液を破棄し、PBS で 3 回洗浄した後、1% スキムミルクで室温で 1 時間ブロッキングを行なった。PBS で 3 回洗浄した後、50 μ g の細胞溶解液を加え、室温で 1 時間インキュベートした。標準曲線作成には、抗体作成時に抗原として使用した合成ペプチドを段階希釈したサンプルを使用した。プレートを 3 回洗浄した後、1:1000 に希釈した HRP 標識した検出抗体 50 μ L を加え、室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 5 回洗浄した後、50 μ L の TMB ELISA Substrate (Abcam) を加え、暗所で 20 分間インキュベートした後、50 μ L の 450 nm Stop Solution for TMB Substrate (Abcam) を加え反応を停止させた。450 nm 吸光度を Multiskan FC Photometer (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

⑭ 免疫蛍光染色

HeLa 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、0.4 μ g の circPDAC 発現ベクターあるいはコントロールベクターを Effectene transfection reagent (QIAGEN) を用いて推奨プロトコールに従ってトランスフェクションした。24 時間後、4 ウェルのガラスチャンバープレートに再び播種し、16 時間培養した。4% パラホルムアルデヒドを用いて室温で 15 分間インキュベートして細胞を固定した。0.1% Triton-X を加えた PBS を用いて室温で 20 分間インキュベ

ートして透過処理を行った。ポジティブコントロールとして、抗体作成時に抗原として使用した人工ペプチドを BioPORTER reagent (Genlatis, San Diego, CA, USA) を用いて推奨プロトコールに従ってトランスフェクションした細胞を使用した。1次抗体は 1:50 に希釈し室温で 1 時間インキュベートした。Alexa 488 で標識した 2 次抗体は 1:400 に希釈し室温で 1 時間インキュベートした。VECTASHIELD Mounting Medium containing DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いてマウンティングした。画像は Olympus DP72 microscope digital camera system と Olympus DP2-TWAIN software (Olympus) を用いて撮影した。

⑮ 免疫沈降

293TN を 10 cm ディッシュに播種し、1 μg の circPDAC 発現ベクターあるいはコントロールベクターを Effectene transfection reagent (QIAGEN) を用いて推奨プロトコールに従ってトランスフェクションした。48 時間後、細胞を回収・溶解し、Protein A/G 磁気ビーズと 1 次抗体を加えて 4°C で 16 時間インキュベートした。磁気ビーズ分離ラックを用いて磁気ビーズを 5 回洗浄した後、20 μL の 2 \times SDS sample buffer に懸濁し、95°C で 5 時間インキュベートした。磁気ビーズ分離ラックで磁気ビーズを吸着させ、上清を回収して western blot 法で解析した。

⑩ Western blot 法

細胞溶解液、免疫沈降サンプルは SDS-PAGE によって低分子量タンパク用にデザインされた cp-PAGEL polyacrylamide gel (ATTO, Tokyo, Japan) に展開した。電気泳動後、PVDF 膜へのトランスファーを行なった。PVDF 膜を 5% スキムミルクでブロッキングし、Immunoshot Reagent 1 (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) で 1:400 に希釈した 1 次抗体を 4°C で 16 時間反応させた。2 次抗体は Trueblot horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Rockland, Limerick, PA, USA) を 1:1000 に希釈して使用した。Immunostar LD reagent (Wako, Tokyo, Japan) を用いて発色した。

⑪ エクソソーム中の RNA の抽出

293TN を 10 cm ディッシュに播種し、1 μ g の circPDAC 発現ベクターもしくはコントロールベクターを Effectene transfection Reagent (QIAGEN) を用いて推奨プロトコールに従ってトランスフェクションした。48 時間後に培養上清を回収し、Vivaspin20 10,000 MCW (Sartorius, Gottingen, Germany) を用いて 2,000 \times g、4°C で 1 時間遠心し濃縮した。150 μ L の濃縮された培養上清を qEV size exclusion column (Izon Science, Christchurch, New Zealand) を用いて 600 μ L の PBS でエクソソーム分画を溶出した。続けてエクソソーム以外の細胞外小胞を含む分画を 600 μ L の PBS で溶出した。エクソソームの純度は qNano NP150 analyzer (Izon Science) を用いて測定した。エクソソームおよびその他の細胞外小胞に含まれる RNA の抽出は Exosomal RNA isolation kit (Norgen Biotek, Ontario, Canada)

を用いて推奨プロトコールに従って行なった。

⑱ Droplet digital PCR による血清 circPDAC RNA 測定

血清を $2,000 \times g$ で 10 分間遠心した後、 $450 \mu\text{m}$ 孔のナイロンメッシュフィルターで上清から細胞片を除去した。 $200 \mu\text{L}$ のフィルター済み血清から、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) を用いて推奨プロトコールに従って total RNA を抽出した。逆転写反応は SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR を用いて行った。前増幅反応は droplet digital PCR で既報の通りに行った[37]。具体的には、 $1 \mu\text{L}$ のテンプレート cDNA、 $10 \mu\text{L}$ のマスターミックス、 $0.45 \mu\text{M}$ のプライマー、 1.36mM の dNTP ミックスを混合し、QX100 Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて約 20,000 ドロップレットに分画した。PCR 反応は、 95°C 5 分、 95°C 30 秒と 60°C 1 分を 20 サイクル、 98°C 10 分の設定で行った。PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) を用いて推奨プロトコールに従って精製した。 $50 \mu\text{L}$ の elution buffer で溶出した精製 PCR 産物のうち、 $1 \mu\text{L}$ を 2 回目の PCR テンプレートとして使用した。2 回目の droplet digital PCR は既報の通りに行った[6,38]。具体的には、 $1 \mu\text{L}$ のテンプレート cDNA を QX100 Droplet Generator を用いて約 20,000 ドロップレットに分画し、 95°C 5 分、 95°C 30 秒と 60°C 1 分を 40 サイクル、 98°C 10 分の設定で PCR 反応を行った。その後、ドロップレットを QX10 droplet reader で測定した。データは QuantaSoft 1.3.2.0 (Bio-Rad Laboratories) で解析した。偽陽性率はテンプレートを含まないネガティブコントロールのウェルの結果に

基づいて決定した。陽性ドロップレットが偽陽性より2つ以上多い場合に、検査陽性と判定した。使用したプライマーは定量 RT-PCR で使用したものと同一である。プローブの配列は以下の通りである。circPDAC probe: 5'-ACAGAGTATATGATCTTGGGTGCT-3'

⑱ 統計分析

RNA シークエンス解析中の circRNA 発現サンプル数と発現量の比較および定量的 RT-PCR の2群間の比較には Welch の t 検定を用いた。*In situ hybridization* におけるシグナルの比較には Wilcoxon の順位和検定を用いた。血清 circRNA 測定結果と疾患の有無の独立性の検定にはカイ二乗検定を用いた。傾向分析には Cochran-Armitage 検定を用いた。 p 値 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

4. 結果

① RNA シークエンスによる circRNA の網羅的な検出

膵癌および正常膵組織で発現する circRNA を網羅的に同定するために、膵癌 (n=2) と正常膵組織 (n=2) 由来の RNA に対して RNase R 処理を行い直鎖 RNA のみを分解した後、RNA シークエンスを行い 1 サンプルあたり平均 7880 万リードを得た。CIRI および find_circ アルゴリズムを使用して、58,050 種類の circRNA を同定した。そのうち、43,102 種類は膵癌サンプルに、3,264 種類は正常膵組織サンプルに発現しており、残りの 11,684 種類は膵癌と正常膵組織の両方で発現していた (図 3A)。同定された circRNA のうち 67% は 1 つのサンプルのみで発現していた (図 3B)。また、多くのサンプルで発現している circRNA ほど、その発現量は大きい傾向が認められた (図 3C)。同定された circRNA を既存のデータベース (circBase; <http://circbase.org>) と照らし合わせると、40,619 種類の circRNA はデータベースに登録されていない新規 circRNA であった。これらの新規 circRNA のうち、33,153 種類は膵癌のみに発現を認めた (図 3D)。

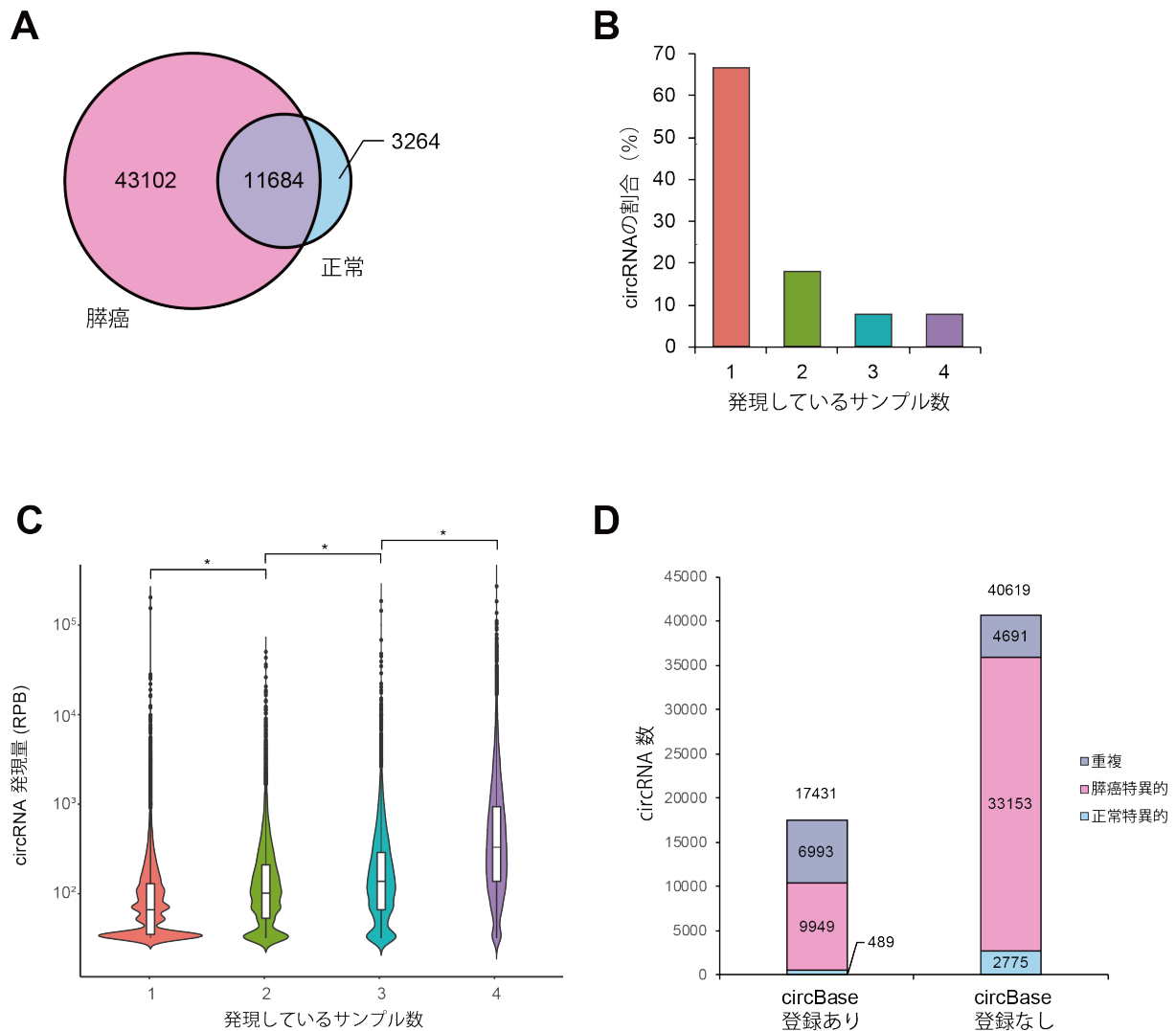


図3 膵癌と正常膵組織における circRNA の網羅的発現解析

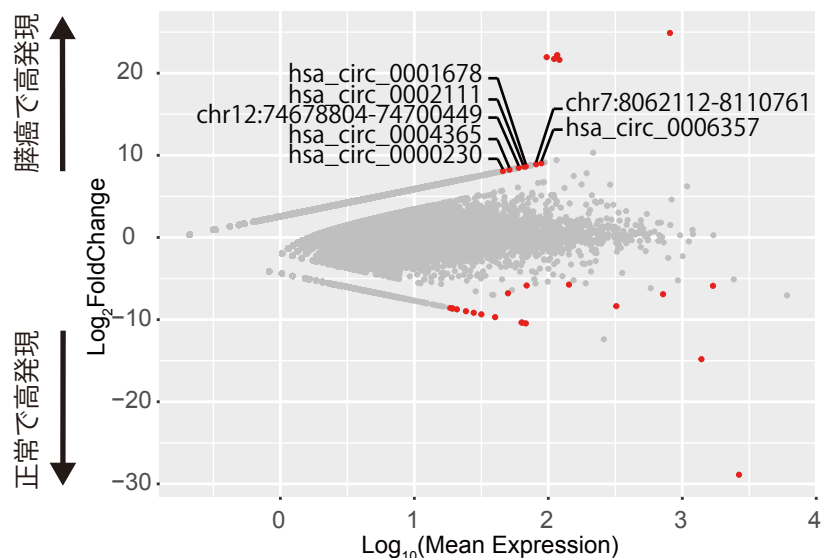
A, RNase R 処理をした膵癌 (n=2) と正常膵組織 (n=2) 由来 RNA を用いた RNA シークエンスで同定された circRNA の数。膵癌では 54,786 種類、正常膵組織では 14,944 種類、全体で 58,050 種類の circRNA を同定した。

B, 同定された circRNA とその circRNA が発現しているサンプル数の関係。同定された circRNA のうち、1つのサンプルで発現していた circRNA は全体の 66%であった。2つ、3つ4つのサンプルで発現していた circRNA はそれぞれ 18%、8%、8%であった。

C, 同定された circRNA の発現量とその circRNA が発現しているサンプル数の関係。多くのサンプルで発現している circRNA ほど発現量は大きい。*, $p < 1.6 \times 10^{-11}$ (Welch's t-test). RPB, reads per billion mapped.

D, 同定された circRNA と circBase への登録の関係。17,431 種類が circBase に登録されており、40,619 種類は circBase に登録されていなかった。

続いて、膵癌と正常膵組織における circRNA の発現量を比較し、有意に発現変動する circRNA として 31 種類を同定した。このうち、膵癌 2 例ともに高発現が認められた circRNA は 7 種類であった(図 4)。



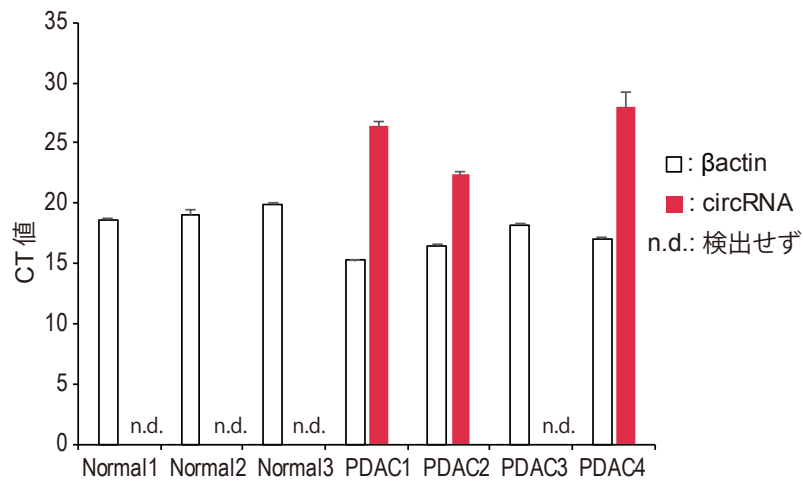
position	circRNA ID	p value
chr7:148543561 148544397	hsa_circ_0006357	0.0000866
chr8:18622958 18662408	hsa_circ_0002111	0.000105805
chr7:8062112 8110761		0.000137005
chr7:8043537 8099878	hsa_circ_0001678	0.000177765
chr7:80418621 80440017	hsa_circ_0004365	0.000188212
chr12:74678804 74700449		0.0001913
chr10:31661946 31750166	hsa_circ_0000230	0.000202623

図 4 膵癌と正常膵組織で発現変動する circRNA の解析

DEseq2 を用いて膵癌と正常膵組織で発現変動する circRNA を解析した。各ドットは circRNA を表し、赤いドットは False discovery rate < 0.05 の有意に発現変動する circRNA を表す。膵癌 2 例ともに有意に高発現している circRNA 7 種類について、ゲノム上の位置と circBase に登録されている ID と p 値を表に示す。

膵癌 2 例ともに高発現していた circRNA 7 種類について、RNA シークエンスに使用したサンプルに加えて、膵癌 2 例と正常膵組織 1 例の RNA を追加して定量的 RT-PCR を行い RNA シークエンスの結果を検証した。12 番染色体から転写される新規 circRNA は正常では発現を認めず、膵癌 4 例中 3 例で発現を認めた(図 5A)。これ以外の 6 種類の circRNA については、正常でも発現を認めた(図 5B)。

A



B

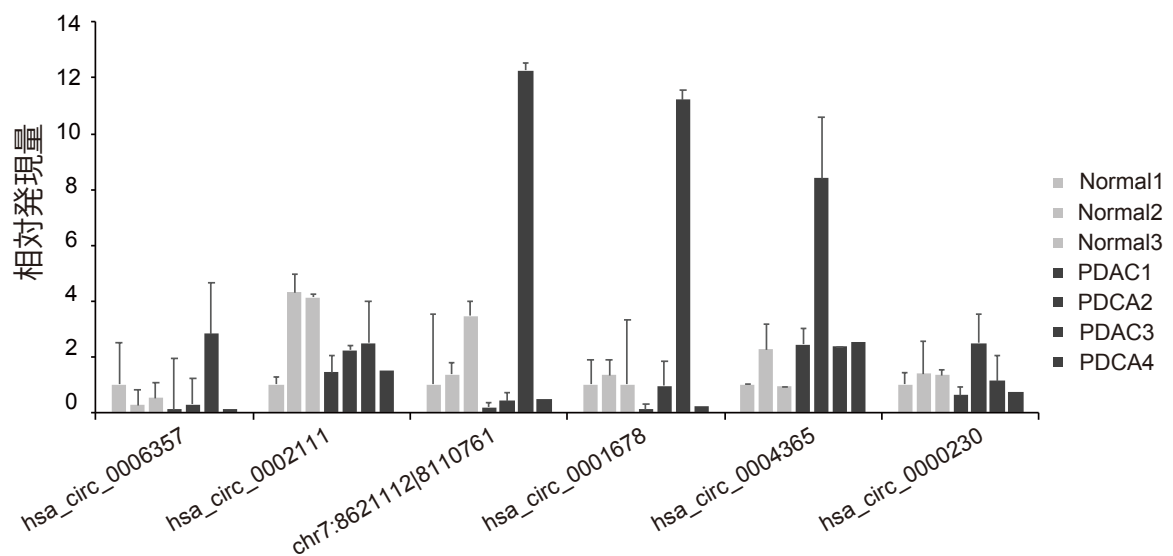


図 5 定量的 RT-PCR による circRNA の発現確認

A, 膵癌で高発現する 12 番染色体由来の新規 circRNA の発現量と β actin mRNA の発現量を定量的 RT-PCR で検証した。Normal1,2 および PDAC1,2 は RNA シークエンスに使用したサンプルと同一である。新規 circRNA は膵癌に高発現していたが、PDAC3 では発現を認めなかった。

B, 膵癌で高発現する circRNA のうち 12 番染色体由来の新規 circRNA 以外の 6 種類について定量的 RT-PCR を行った。相対的発現量は $\Delta\Delta C_T$ 法で決定した。発現量の補正には Normal1 の β actin mRNA を使用した。

以上より、circRNA 特異的な RNA シークエンスによって膵癌で高発現する circRNA を網羅的に検索し、特に 12 番染色体の 74678804-74700449 の領域から転写される新規 circRNA は正常と比較して膵癌で高発現することを見出した。以降はこの新規 circRNA に注目して解析を進めることとした。

② 膵癌で高発現する新規 circRNA の全長配列

膵癌で高発現する circRNA のうち、12 番染色体の 74678804-74700449 の領域から発現する新規 circRNA に注目した。circBase 以外の circRNA データベースである CircInterectome[39], CircR2Disease[40], CircFunBase[41], MiOncoCirc[12], CIRCpedia v2[13]も検索したが、この新規 circRNA は登録されていなかった。12 番染色体の 74678804-74700449 の領域にはノンコーディング RNA の LOC107987178 と LOC100507377 が存在しており、この新規 circRNA のバックスプライスジャンクションは、ノンコーディング RNA の LOC107987178 の exon 3 の 5'末端とノンコーディング RNA の LOC100507377 の exon3 の 3'末端が結合して形成されていた(図 6)。

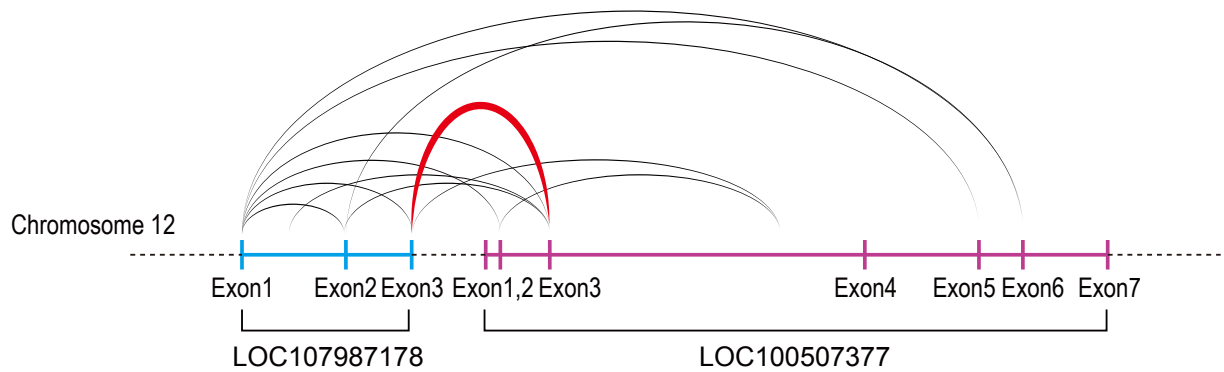
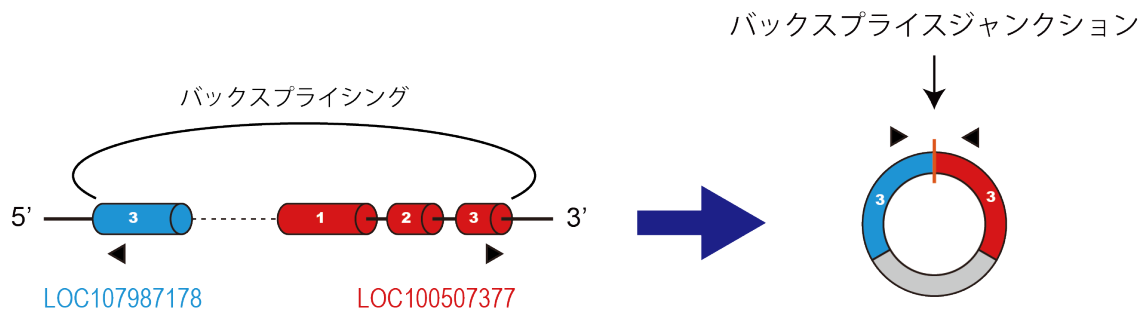


図 6 膵癌で高発現する新規 circRNA のゲノム上の位置

膵癌で高発現する新規 circRNA は 12 番染色体のノンコーディング RNA 領域である LOC107987178 と LOC100507377 から形成される。アーチは RNA シークエンスで同定された circRNA を表す。赤いアーチは膵癌で高発現する新規 circRNA を表す。

RNA シークエンスの結果を検証するために、circRNA を特異的に増幅する外向きプライマーを用いた RT-PCR とサンガーシークエンスを行い、LOC107987178 の exon 3 の 5' 末端と LOC100507377 の exon3 の 3' 末端が結合したバックスプライスジャンクション配列の存在を確認した(図 7AB)。また、 β actin mRNA と比較してこの circRNA は RNase R に耐性であった(図 7C)。

A

◀▶ 外向きプライマー

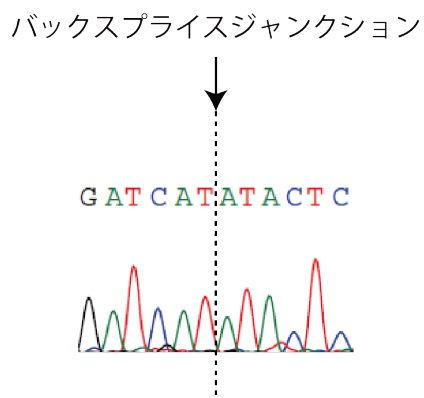
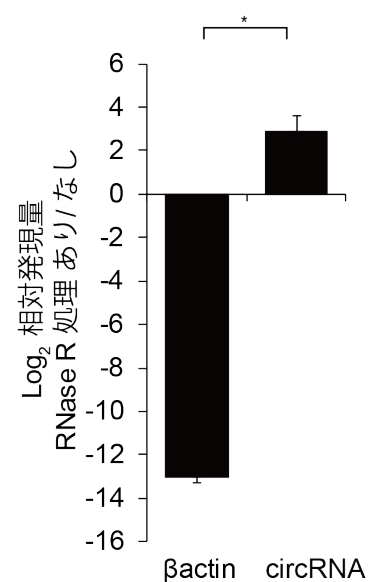
B**C**

図 7 RNA シーケンス結果の検証

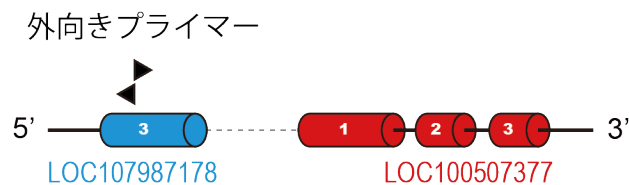
A, 外向きプライマー設計のシエーマ。LOC107987178 の exon3 と LOC100507377 の exon3 に外向きにプライマーを設計することにより、circRNA を特異的に増幅することができる。

B, バックスプライスジャンクションの配列をサンガーシーケンスによって確認した。矢印は LOC100507377 のエクソン 3 の 3'末端と、LOC107987178 のエクソン 3 の 5'末端が結合する部位に相当する。

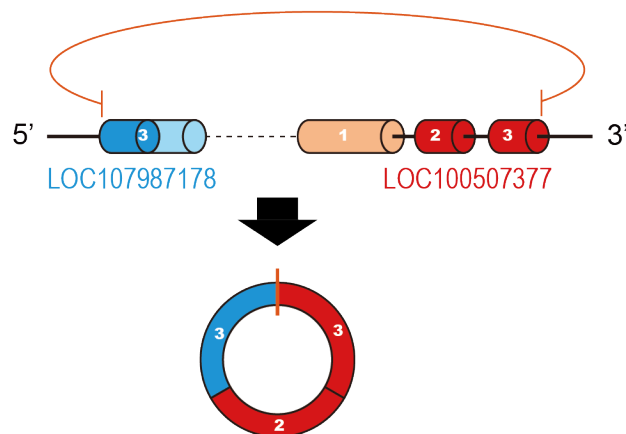
C, 新規 circRNA は βactin mRNA と比較して RNase R による分解に耐性を持つ。RNase R 処理による発現量の変化を定量的 RT-PCR で測定した。*, $p < 0.05$ (Welch's t-test).

RNA シークエンス解析ではバックプライスジャンクションを同定したが、circRNA の全長配列については決定できていない。そこで、外向きプライマーセットをギャップのないように設計し(図 8A)、両側からサンガーシーケンスを行いこの新規 circRNA の全長配列を決定した。この新規 circRNA は 268 塩基長であり、ノンコーディング RNA の LOC107987178 の exon 3 とノンコーディング RNA の LOC100507377 の exon 2 と exon 3 から形成されていた(図 8B)。

A



B



```

ATACTCTGTTTTTCTACAAATGGAAAGTTTGTGGCATCCCTTGACTCAAGCAAATTTTTTCAGCA
CCATTTTTCAAGAGCGTGTGCTCACTTCACCTCTCTGTATCGTGTTTTG ATGCTTGTCTCTG
GAAACCAACCATGAGCTGTGATGAAATCCAGGCAACTGAGTTGTGTTTCAGCCCAAAGCAGCA
AATGGAATCCAG CTTCAGGACCATCATCTGACATAGGGGAAGAAGACTTACATAGAAGGCC
CTAACCAGCACCCAAGATCAT

```

図 8 新規 circRNA の全長配列

A, プライマー設計のシェーマ。ギャップなく外向きプライマーを設計し、両端からサンガーシーケンスを行い全長配列を決定した。

B, 新規 circRNA の全長配列。新規 circRNA は 268 塩基長であり、LOC107987178 の exon 3 と LOC100507377 の exon 2, 3 から形成されていた。青のハイライトは LOC107987178、赤のハイライトは LOC100507377 由来の配列を表す。

この 2 つのノンコーディング RNA は 14,000 塩基離れており、平均的な隣接する遺伝子間の距離 (48,800 塩基) [12] よりも短かった。多くの circRNA と同様に[38]、この新規 circRNA も古典的スプライシングモチーフである GT-AG に隣接していた。

以上より、膵癌で高発現する circRNA のうち、12 番染色体の 74678804-74700449 の領域から発現する新規 circRNA の全長配列を決定した。以後、この新規 circRNA を circPDAC RNA と呼ぶ。

③ circPDAC RNA の発現分布

膵組織における circPDAC RNA の発現分布を明らかにするために、11 例の正常膵組織と 44 例の膵癌組織に対して、circPDAC RNA のバックスプライスジャンクションをターゲットにしたプローブを用いて RNA *in situ* hybridization を行なった。正常膵組織 1 例と膵癌組織 1 例は染色過程でスライドから検体が剥離したため解析から除外した。RNA シークエンスの結果と同様に、circPDAC RNA は正常膵組織と比べて膵癌組織で高発現していた(図 9A,B)。

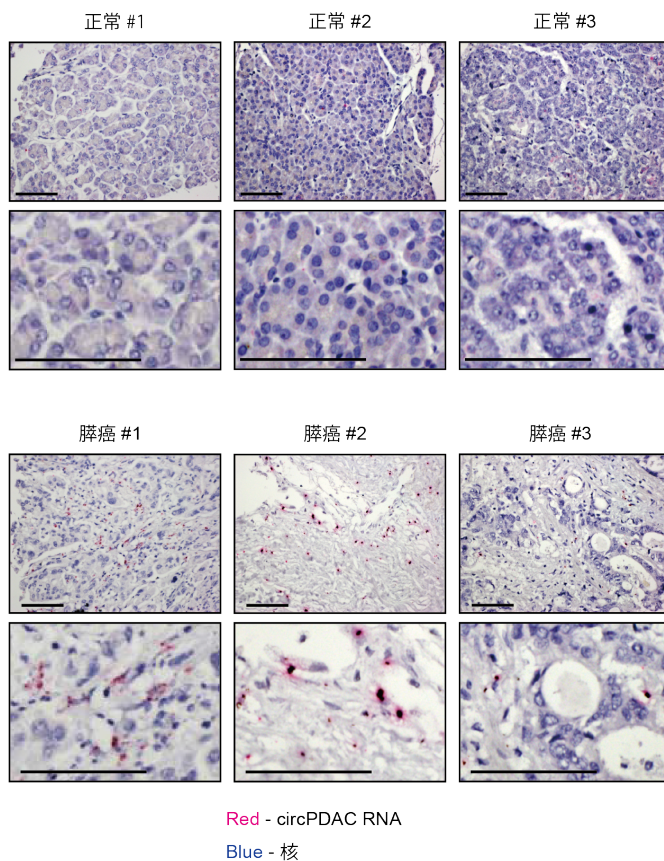
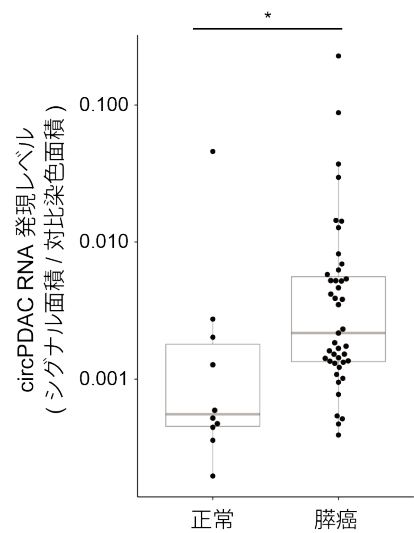
A**B**

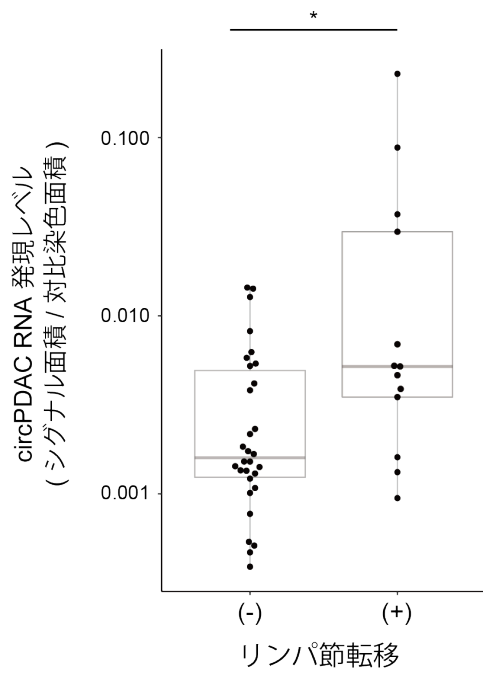
図 9 膵癌と正常膵組織における circPDAC RNA の発現比較

A, circPDAC RNA のバックスプライスジャンクションを認識するプローブを用いた *in situ* hybridization による正常膵組織と膵癌組織の代表的な染色画像を提示する。核はヘマトキシリンで対比染色した。circPDAC RNA は赤いドットで染色されている。スケールバー、100 μ m.

B, circPDAC RNA のシグナルを定量化した。赤いドットで染色される面積をヘマトキシリンによって青く染色される核の面積によって補正した。膵癌 (n=43) は正常膵組織 (n=10) と比較して circPDAC RNA が有意に高発現していた。*, $p < 0.05$ (Wilcoxon's rank sum test).

さらに、circPDAC RNA はリンパ節転移を有する癌で高発現していた(図 10A)。また、癌のステージが進行するほど、circPDAC RNA が高発現する症例の割合が増加する傾向を認めた(図 10B)。

A



B

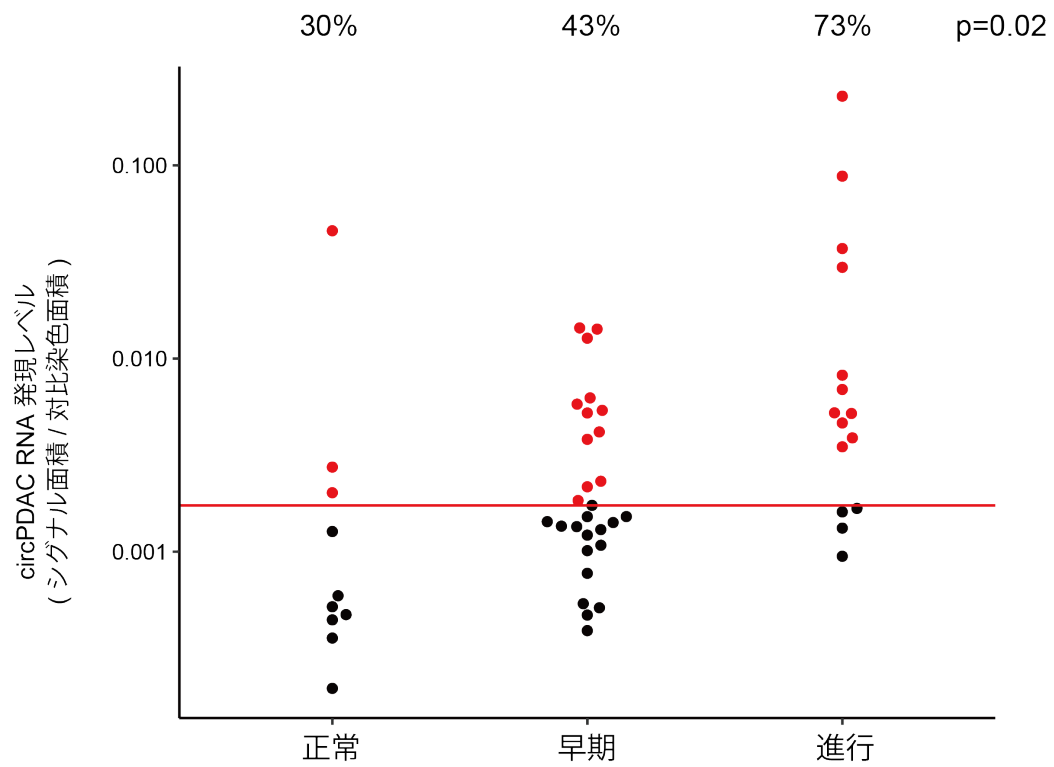


図 10 circPDAC RNA と病期との関連

A, 膵癌組織の circPDAC RNA の発現量を *in situ* hybridization で定量化した。リンパ節転移を有する症例 (n=13) ではリンパ節転移を有さない症例 (n=30) と比較して circPDAC RNA は有意に高発現していた。*, $p < 0.05$ (Wilcoxon's rank sum test).

B, 膵癌の病期が進行するほど、circPDAC RNA の発現量は大きくなる傾向がある。赤い水平線は全サンプルの circPDAC RNA 発現量の中央値を表す。中央値より大きい発現量を持つものを circPDAC RNA 高発現とした。赤い点は circPDAC RNA 高発現サンプルを表す。circPDAC RNA を高発現するサンプルの割合をグラフの上を示す。正常 (n=10)、“早期”は stage IA, IB, IIA (n=28)、“進行”は stage IIb, III, IV (n=15)を表す。p 値は Cochran-Armitage 傾向検定によって算出した。

続いて、膵癌の前癌病態である pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) における circPDAC RNA の発現を検証した。PanIN では circPDAC RNA の発現は認めなかったが、PanIN 近傍に存在する腺房細胞の一部に発現を認めた(図 11)。

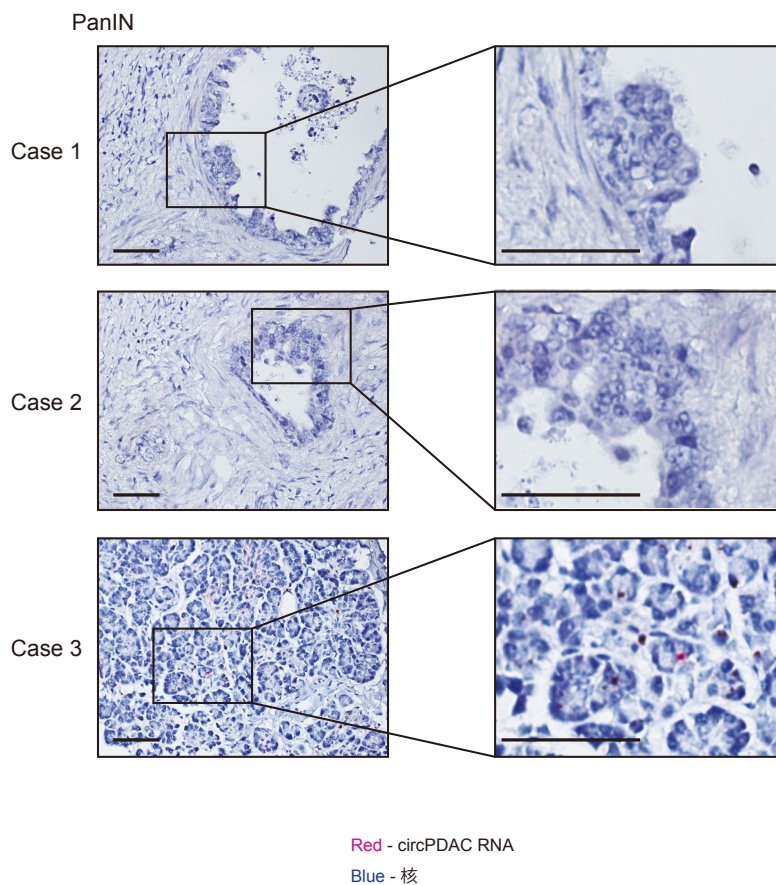


図 11 Pancreatic intraepithelial neoplasia 組織における circPDAC RNA の発現

In situ hybridization による代表的な染色画像を示す。核はヘマトキシリンで対比染色した。circPDAC RNA は赤い点として染色されている。Case1, 2 は PanIN の代表的な染色像を示す。Case3 は PanIN 近傍の腺房細胞の染色像を示す。スケールバー、100 μ m。

様々な細胞株における circPDAC RNA の発現を定量的 RT-PCR で検証した。

circPDAC RNA は正常膵癌上皮細胞株 HPNE や HPDE と比較して、膵癌細胞株 BxPC-3 や Capan-1 で高発現していた。circPDAC RNA は膵癌細胞株以外にもいくつかの細胞株で高発現していた。具体的には、癌細胞株では大腸癌細胞株 Caco-2、肝癌細胞株 Huh-7、乳癌細胞株 MCF-7、肺癌細胞株 A549 で高発現していた。非癌細胞株では 293T では高発現していたが、それ以外の細胞では低発現していた(図 12)。

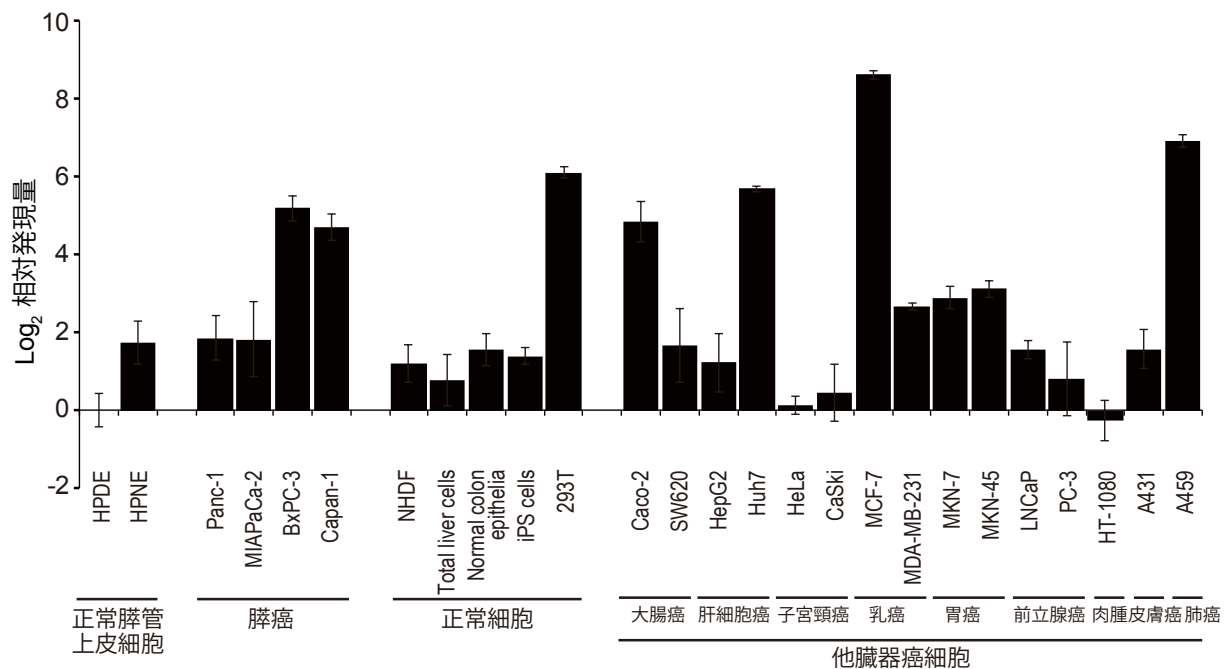


図 12 各種細胞株における circPDAC RNA の発現

各種細胞株における circPDAC RNA の発現を定量的 RT-PCR で測定した。相対的発現量は delta-delta- C_T 法で決定した。発現量の補正には HPDE の β actin mRNA を使用した。

膵癌以外での circPDAC RNA の組織における発現を確認するために、大腸、乳腺、前立腺の正常組織と癌組織に対して RNA *in situ* hybridization を行った。大腸癌および乳癌組織では正常組織と比較して circPDAC RNA の発現レベルに有意差は認めなかった。前立腺癌では正常組織と比較して circPDAC RNA は高発現していた(図 13A, B)。これらの結果から、circPDAC RNA は膵癌のみならず他臓器癌でも発現している可能性が示唆された。

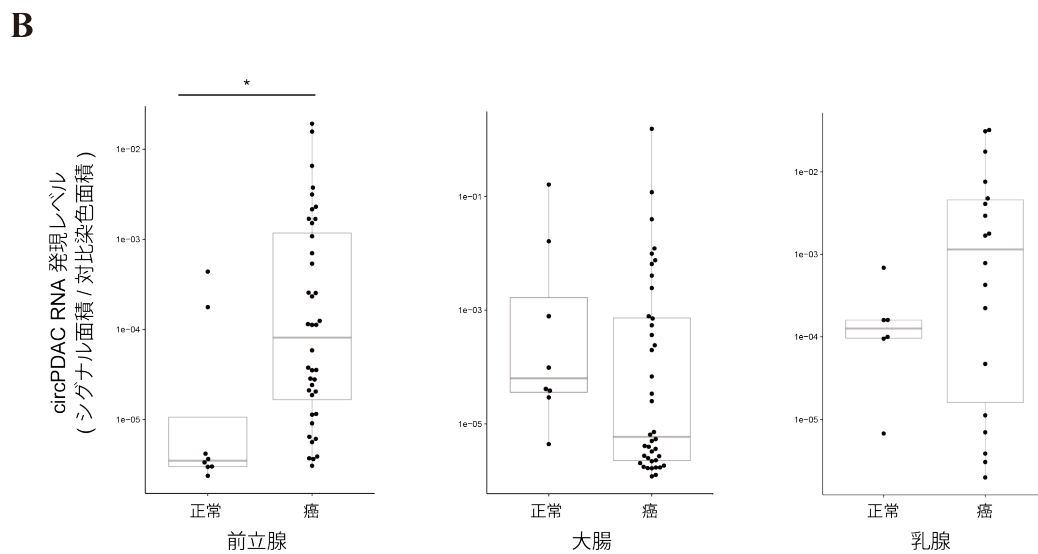
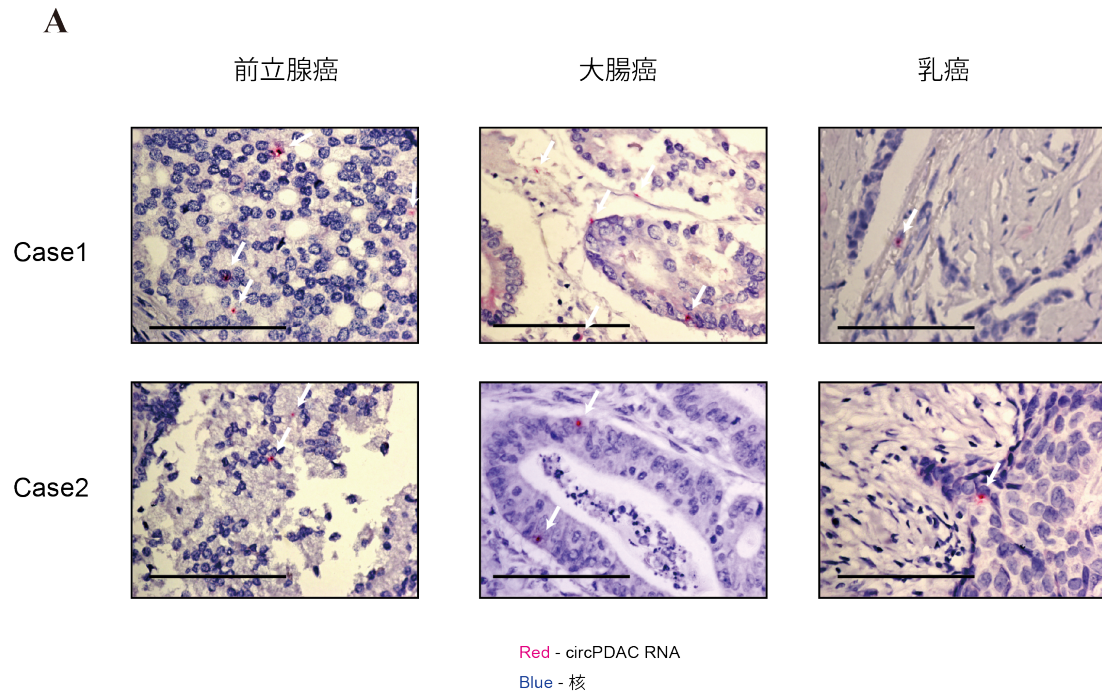


図 13 前立腺癌、大腸癌、乳癌組織における circPDAC RNA の発現

A, 前立腺癌、大腸癌、乳癌に発現する circPDAC RNA を *in situ* hybridization で染色した代表的な画像を示す。核はヘマトキシリンで対比染色した。circPDAC RNA は赤いドットとして染色されている(白矢印)。スケールバー、100 μ m。

B, 前立腺癌 (n=40)、正常前立腺組織 (n=8)、大腸癌 (n=40)、正常大腸組織 (n=8)、乳癌 (n=18)、正常乳腺組織 (n=6) に発現する circPDAC RNA のシグナルを定量化した。赤いドットで染色される面積をヘマトキシリンによって青く染色される核の面積によって補正した。前立腺癌では正常前立腺組織と比較して circPDAC RNA が高発現していた。*, $p < 0.05$ (Wilcoxon's rank sum test)。

続いて、circPDAC RNA の発現制御機構を検討するために、circPDAC RNA と同じ遺伝子座から転写される LOC100507377 と LOC107987178 の発現を正常膵組織および膵癌組織由来 RNA を用いて定量的 RT-PCR で測定した。図 5A に示したように circPDAC RNA は正常では発現を認めなかったが、LOC100507377 と LOC107987178 は、膵癌だけでなく正常膵組織でも発現していた (図 14)。このことから、circPDAC RNA はこの遺伝子座の直鎖状の RNA とは異なるメカニズムで発現制御されている可能性が示唆された。

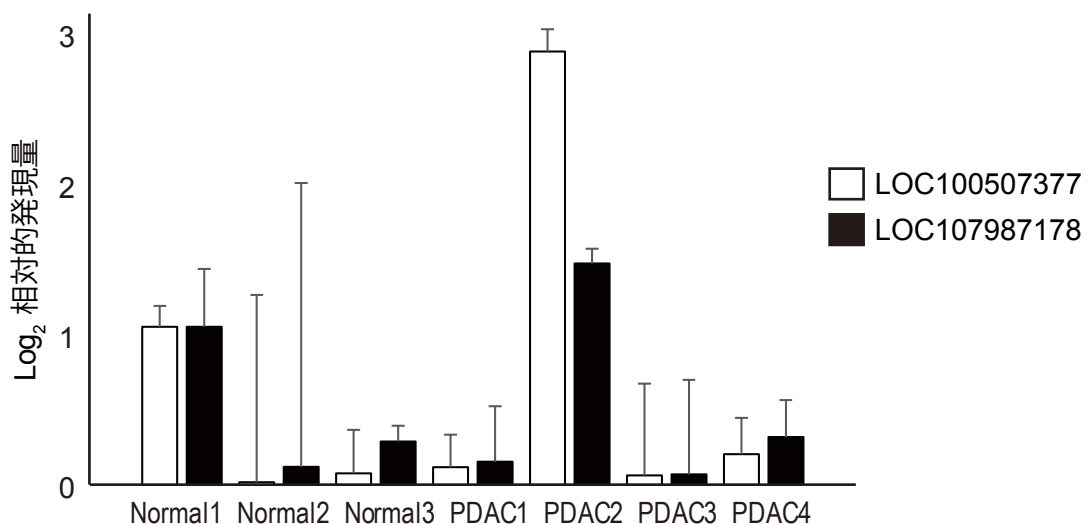


図 14 LOC100507377 と LOC107987178 は正常膵組織でも発現する

circPDAC RNA と同じ遺伝子座から転写される LOC100507377 と LOC107987178 の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。相対的発現量は delta-delta-C_T 法で決定した。発現量の補正には Normal1 の β actin mRNA を使用した。使用したサンプルは図 5 と同一である。

続いて、細胞増殖率の変化が circPDAC RNA の発現に与える影響を検証するために、BxPC-3 を血清飢餓下で培養した。血清飢餓下では BxPC-3 の増殖は抑制されたが、circPDAC RNA の発現レベルは血清の有無によって有意差は認めなかった(図 15A, B)。このことから、circPDAC RNA の発現は、細胞増殖率の変化ではなくその他のメカニズムによって調節されていることが示唆された。

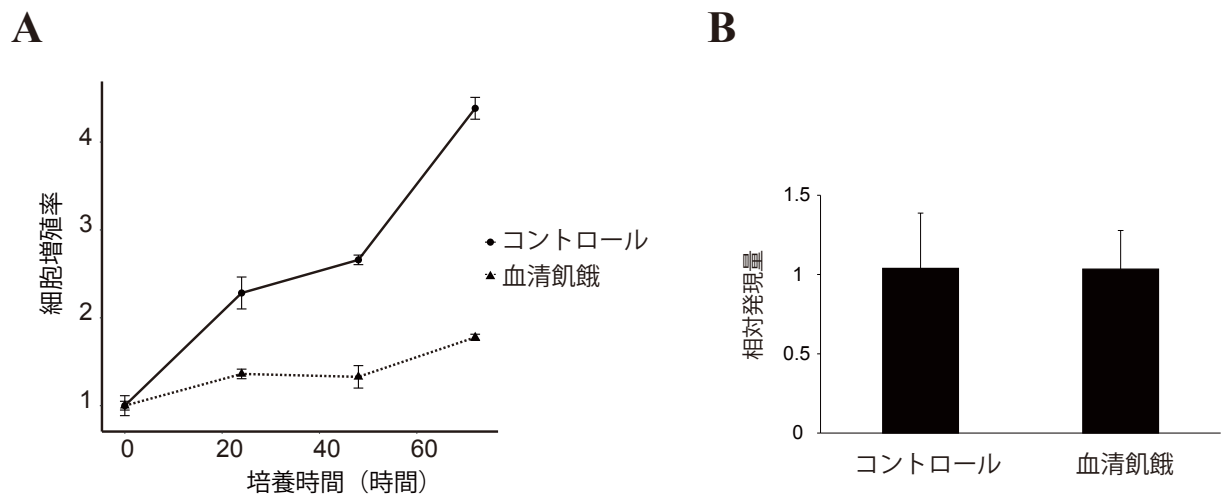


図 15 circPDAC RNA の発現量は血清飢餓によって変化しない

A, BxPC-3 は血清飢餓下で培養すると増殖が抑制される。

B, 10% FBS 下と血清飢餓下で培養した BxPC-3 における circPDAC RNA の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。相対的発現量は delta-delta- C_T 法で決定した。発現量の補正にはコントロールの β actin mRNA を使用した。

以上より、circPDAC RNA は正常膵組織と比較して膵癌組織において有意に高発現しており、病期が進行するほど高発現する症例が多い傾向を認めた。また、circPDAC RNA は他臓器癌においても発現する可能性が示唆された。circPDAC は同じ遺伝子座から転写される直鎖状 RNA とは異なるメカニズムで発現制御されている可能性が示唆され、血

清飢餓による細胞増殖率の変化は circPDAC の発現量を変化させなかった。

④ circPDAC RNA の機能解析

circPDAC RNA の機能解析を行うために、circPDAC RNA 発現プラスミドを作成した。ショウジョウバエの *laccase2* 遺伝子は上流と下流のイントロンに相補性の高いトランスポゾン配列を有しており、これが細胞内で自律的にバックプライミングと環状化を誘導することが知られている[36]。これを利用して、circPDAC RNA の上流と下流に相補的なトランスポゾン配列を組み込み circPDAC RNA 発現プラスミドを作成した。このプラスミドを 293T にトランスフェクションし、circPDAC RNA の発現を定量的 RT-PCR で確認した(図 16A)。また、サングーシーケンスでバックプライスジャンクション配列を確認した(図 16B)。さらに、RNase R 処理に耐性であることも確認した(図 16C)。

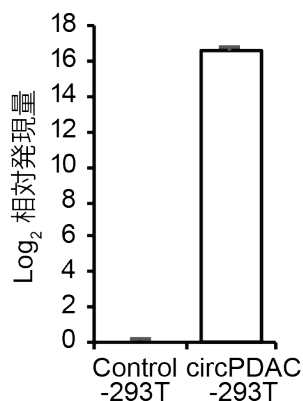
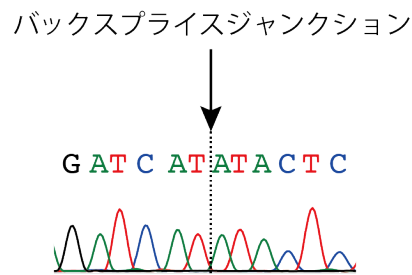
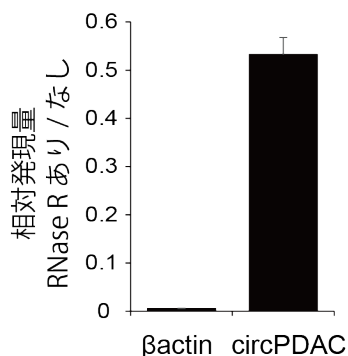
A**B****C**

図 16 circPDAC RNA 発現プラスミドの確認

A, circPDAC RNA 発現プラスミドもしくはコントロールベクターを 293T にトランスフェクションし、circPDAC RNA の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。相対的発現量は delta-delta-CT 法で決定した。発現量の補正には Control の β actin mRNA を使用した。

B, バックスプライスジャンクションの配列をサンガーシーケンスによって確認した。矢印は LOC100507377 の exon 3 の 3'末端と、LOC107987178 の exon 3 の 5'末端が結合する部位に相当する。

C, circPDAC RNA 発現プラスミドをトランスフェクションした 293T において、circPDAC RNA は β actin mRNA と比較して RNase R による分解に耐性を持つ。RNase R 処理による発現量の変化を定量的 RT-PCR で測定した。

circPDAC の発現による生物学的機能を解析するために、レンチウイルスを用いて

circPDAC RNA を恒常的に発現する BxPC-3 細胞株を樹立した。変化は限定的だが、

circPDAC RNA の発現は BxPC-3 の細胞増殖を有意に抑制した(図 17)。

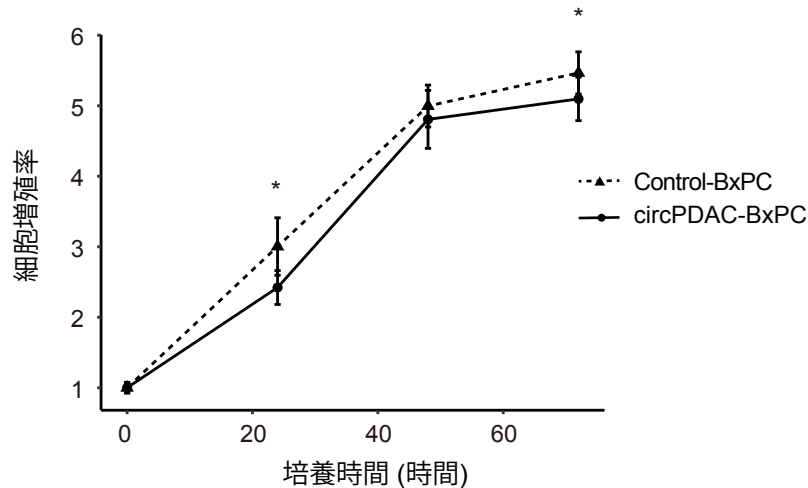


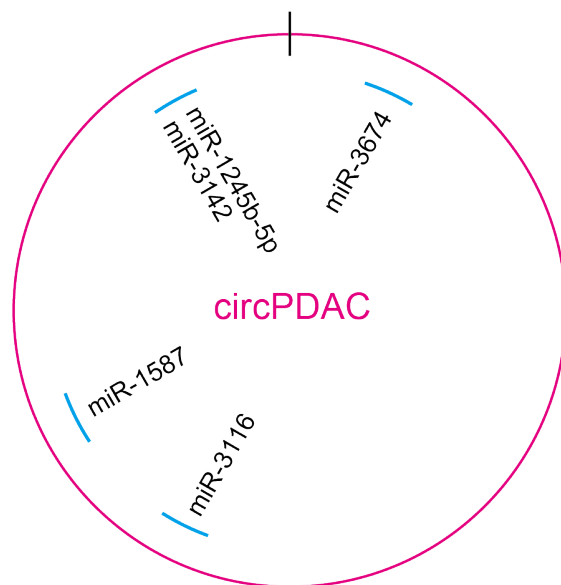
図 17 circPDAC RNA は細胞増殖を抑制する

BxPC-3 にレンチウイルスを用いて circPDAC RNA 発現コンストラクトを導入した。circPDAC RNA を安定発現する細胞を樹立し、細胞増殖率を測定した。エラーバーは標準偏差を表す。*, $p < 0.05$ (Welch's t-test).

circRNA は microRNA (miRNA) と結合することで miRNA のターゲットとの結合を競合的に阻害する "miRNA sponge" として機能することが知られている[20]。circPDAC RNA が miRNA sponge として作用するかどうかを検討するため、circPDAC RNA に含まれる miRNA のターゲット配列を mirTarget[42]を用いて検索した。mirTarget による検索の結果、circPDAC と結合する miRNA は複数予測されたが、各 miRNA との結合部位は1カ所のみであった(図 18A, B)。miR-7 に対する miRNA sponge として機能することが知られている Cerebellar degeneration-related protein 1 (CDR1-AS) は 70 カ所以上の miR-7 結合部位を有することが知られている[20]。そのため、mirTarget による結果は、circPDAC RNA が

miRNA sponge として機能していることを積極的に支持するものではないと考えられた。

A



B

miRNA	Alignment
miR-3674	<p>5' - AUUGUAGAACCUAAGAUUGGCC - 3'</p> <p> GGTAAACATCTTTTGTCTCATATACTA circPDAC</p>
miR-1245b-5p	<p>5' - UAGGCCUUUAGAUCACUUAAA - 3'</p> <p> CCAATCCGGAAGATACATTCAGAAGAA circPDAC</p>
miR-3142	<p>5' - AAGGCCUUUCUGAACCUUCAGA - 3'</p> <p> CCAATCCGGAAGATACATTCAGAAGAA circPDAC</p>
miR-3116	<p>5' - UGCCUGGAACAUAGUAGGGACU - 3'</p> <p> TCAACGGACCTAAAGTAGTGTGCGAGTAC circPDAC</p>
miR-1587	<p>5' - UUGGGCUGGGCUGGGUUGGG - 3'</p> <p> CGAAACCCGACTTTGTGTTGAGTCAA circPDAC</p>

図 18 circPDAC RNA 配列中の miRNA ターゲットの予測

A, B, circPDAC RNA に含まれる miRNA ターゲット配列を MirTarget を用いて予測した。circPDAC RNA と miRNA ターゲット配列のシェーマ (A) と circPDAC RNA と miRNA の配列の対応 (B) を示す。

circRNA はタンパク翻訳のテンプレートとして機能することが報告されているが、circPDAC RNA からタンパクが翻訳されるかについて検討した。タンパク翻訳のテンプレートとして機能する circRNA には IRES を有するものが存在するが、circPDAC RNA 中に IRES を形成する可能性のある配列が含まれているかを IRESite (<http://www.iresite.org>) で検索した。予測された IRES 配列の下流に 2 つの open reading frame (ORF1, ORF2) が存在し、それぞれ 27 アミノ酸、78 アミノ酸をコードしていた (図 19)。circPDAC RNA からこれらのタンパクが翻訳されるかを検証するために、ORF1 から 1 種類、ORF2 の前半と後半からそれぞれ 1 種類ずつ (ORF2-1, ORF2-2)、合計 3 種類の人工ペプチドを合成した。続いてこれら 3 種類の人工ペプチドをそれぞれ認識する抗体を 3 種類作成した。

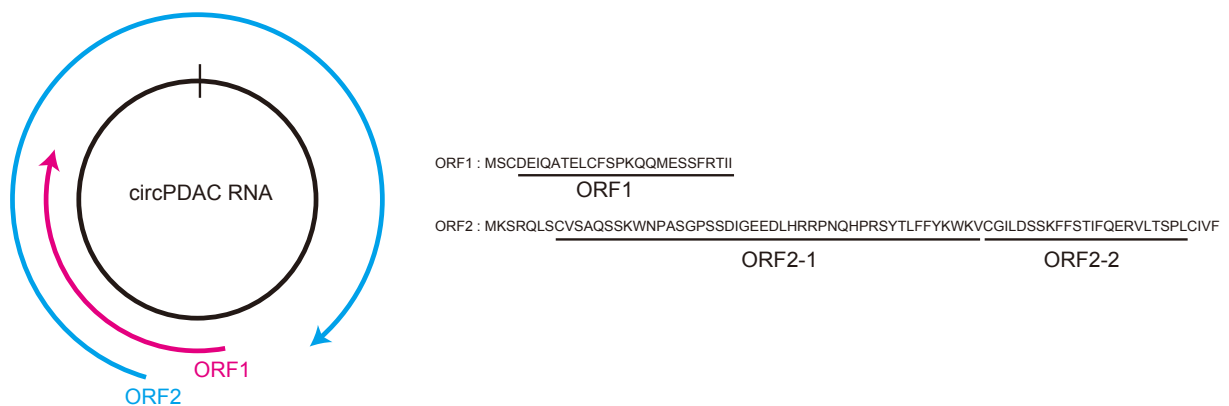


図 19 circPDAC RNA に含まれる ORF の予測

CircPDAC RNA の配列中に 2 つの ORF が予測された。予測された ORF と人工ペプチド (ORF1, ORF2-1, ORF2-2) の配列を示す。

ORF1 ペプチドを測定するために、ELISA による測定系を確立し、circPDAC RNA 発現プラスミドをトランスフェクションした 293T の細胞溶解液を用いて ELISA を行なったが、circPDAC RNA 発現による ORF1 ペプチドの産生は認めなかった (図 20)。

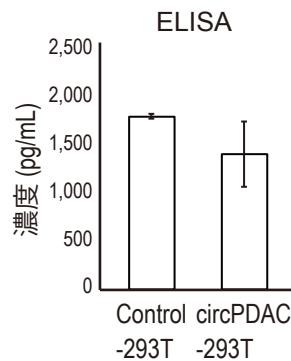


図 20 circPDAC RNA から ORF1 ペプチドの産生は認めない

コントロールベクターもしくは circPDAC RNA 発現プラスミドをトランスフェクションした 293T を用いて、ORF1 ペプチドを ELISA 法で測定した。ORF1 ペプチドの濃度はコントロールと circPDAC RNA 発現細胞との間で有意差は認めなかった。

次に、ORF2-2 抗体を用いて免疫蛍光染色を行なったが、circPDAC RNA 発現細胞で ORF2 ペプチドの産生は認めなかった (図 21)。

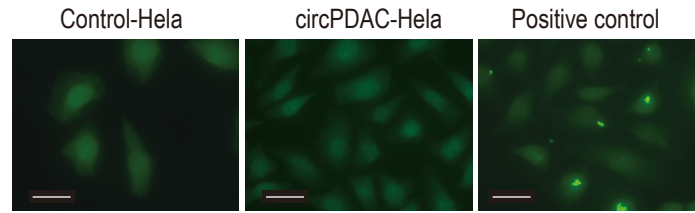


図 21 circPDAC RNA から ORF2 ペプチドの産生は認めない

コントロールベクターもしくは circPDAC RNA 発現プラスミドをトランスフェクションした HeLa を用いて、ORF2-2 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。ポジティブコントロールとして、人工合成した ORF2-2 ペプチドを HeLa にトランスフェクションした。コントロールと circPDAC RNA 発現細胞ともに ORF2-2 ペプチドの産生は認めなかった。

最後に、ORF2 に対する抗体を用いて免疫沈降とウェスタンブロッティングを行なっ

たが、circPDAC RNA 発現細胞で ORF2 ペプチドの産生は認めなかった(図 22)。

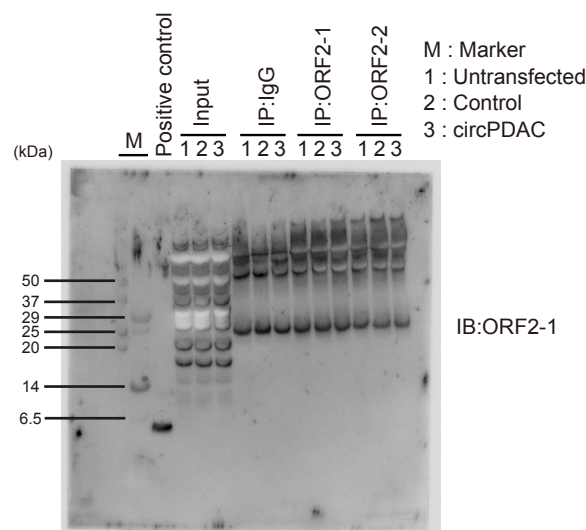


図 22 circPDAC RNA から ORF2 ペプチドの産生は認めない

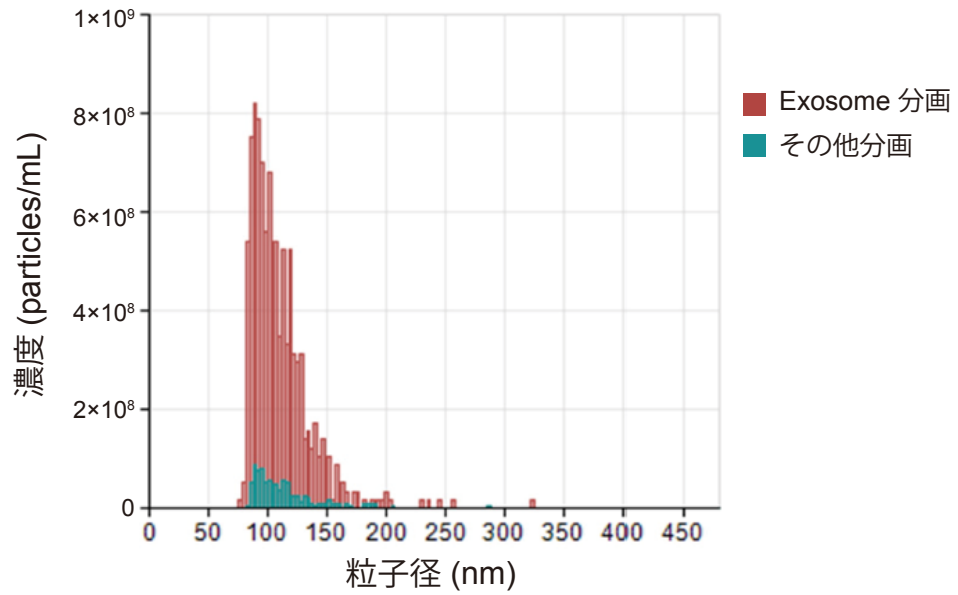
コントロールベクターもしくは circPDAC RNA 発現プラスミドを 293T にトランスフェクションした。免疫沈降後 western blotting を行った。ポジティブコントロールとして ORF2-1 ペプチドを使用した(予測分子量 5kDa)。ORF2 ペプチドの産生は認めなかった。

以上より、circPDAC RNA は、細胞増殖を有意に抑制したが、miRNA sponge やタ
ンパク翻訳のテンプレートとしての機能は認めなかった。

⑤ circPDAC RNA のバイオマーカー応用

circRNA はエクソソーム中に豊富に存在し[18]、血清中からも検出されることが報告
されている[43-46]。そこで circPDAC RNA がエクソソーム中に存在するかを検証した。293T
に circPDAC RNA 発現プラスミドをトランスフェクションし、培養上清から qEV を用いたサイ
ズ排除クロマトグラフィーによってエクソソームを抽出した。qEV で抽出された分画に含まれ
る細胞外小胞数を qNano analyzer で測定した結果、エクソソームに相当するサイズの細胞
外小胞が濃縮されていることを確認した(図 23A)。このようにして抽出したエクソソーム中に
は circPDAC RNA が豊富に存在していた(図 23B)。

A



B

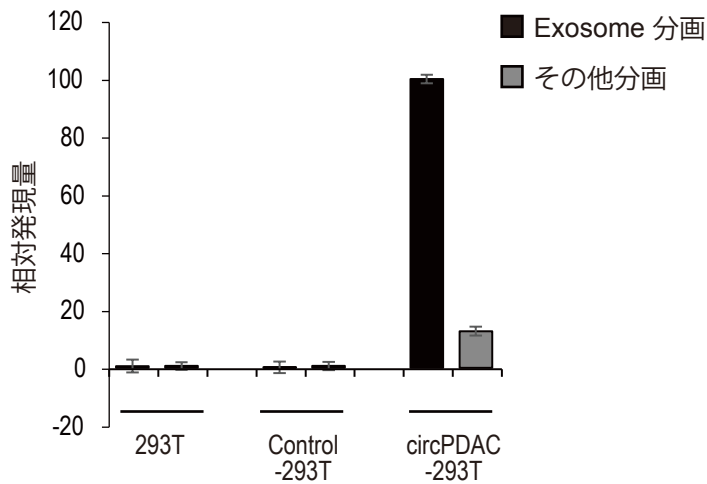


図 23 circPDAC RNA はエクソソーム中に豊富に存在する

A, 培養上清から qEV を用いてエクソソーム分画とその他の分画を抽出し、各分画に含まれる小胞のサイズ分布を qNano analyzer で測定した。エクソソーム分画には主に 50-200 nm の

小胞が含まれていた。

B, 各分画に含まれる circPDAC RNA の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。相対的発現量は、circPDAC RNA 発現細胞から抽出したエクソソーム分画に含まれる circPDAC RNA を 100 として補正した。

これらの結果から、circPDAC RNA が膵癌患者の血清中から検出できれば新しい膵癌バイオマーカーとして応用できるのではないかと考えた。20 例の膵癌患者の血清と悪性腫瘍および膵疾患既往のない 20 例の健常コントロール血清を用いて血清中の circPDAC RNA を測定した。circPDAC RNA はエクソソーム分画に主に存在していたが、残余分画にも circPDAC RNA は存在していたため、血清からエクソソームを抽出するのではなく、全血清から RNA を抽出することとした。微量の RNA の検出感度を上昇させるために、前増幅を行なった後に droplet digital PCR 法で circPDAC RNA を測定した。プローブはバックスプライスジャンクションをまたぐように設計した(図 24)。膵癌患者 20 例中 9 例、健常コントロール 20 例中 2 例から circPDAC RNA は検出された。血清 circPDAC RNA によって感度 0.45、特異度 0.90 で膵癌患者を健常コントロールと区別できた(表 1)。興味深いことに、膵癌の前癌病態として知られる IPMN 患者 10 例中 6 例からも circPDAC RNA は検出された。血清 circPDAC RNA によって感度 0.60、特異度 0.90 で IPMN 患者を健常コントロールと区別できた(表 2)。

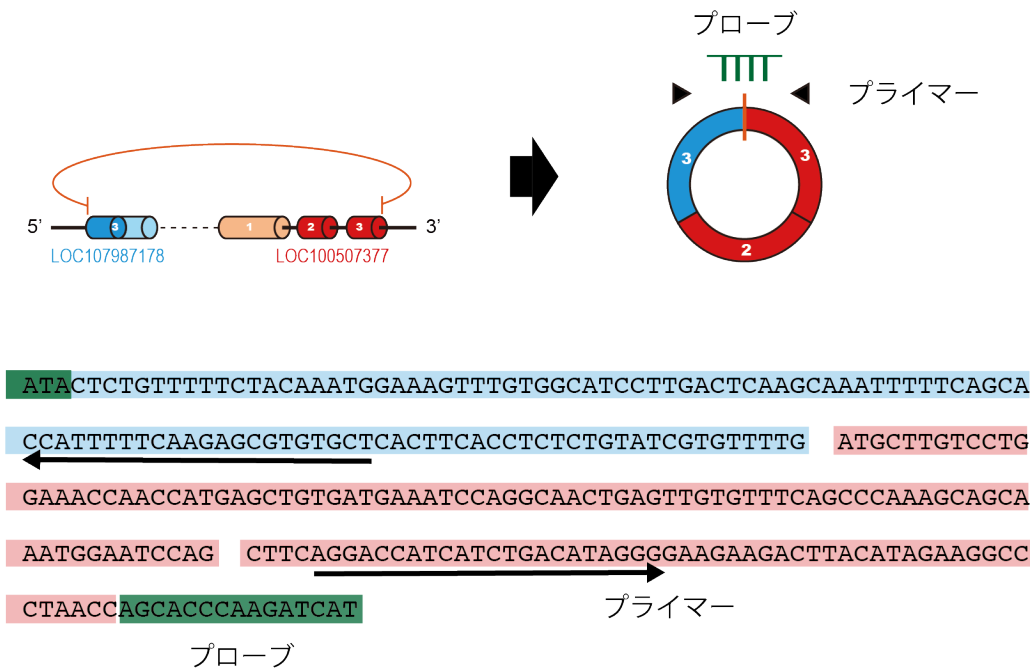


図 24 プローブとプライマーの設計

バックスプライスジャンクションをまたぐようにプローブを設計した。circPDAC RNA の全長配列のうち、青のハイライトは LOC107987178、赤のハイライトは LOC100507377 由来の配列、緑のハイライトはプローブがハイブリダイズする部分の配列を表す。矢印はプライマーの配列を表す。

表 1 膵癌患者と健常コントロール患者血清を用いた circPDAC RNA の測定結果

	健常コントロール	膵癌	計
circPDAC RNA 陰性	18	11	29
circPDAC RNA 陽性	2	9	11
計	20	20	40

$p = 0.0132$ (カイ二乗検定)

表 2 IPMN 患者と健常コントロール患者血清を用いた circPDAC RNA の測定結果

	健常コントロール	IPMN	Total
circPDAC RNA 陰性	18	4	22
circPDAC RNA 陽性	2	6	8
Total	20	10	30

$p = 0.0035$ (カイ二乗検定)

以上より、circPDAC RNA はエクソソーム中に分泌され、血清中の circPDAC RNA の測定は膵癌および IPMN に対する新しいバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

5. 考察

本研究では、膵癌と正常膵組織に発現する circRNA を網羅的に探索し、12 番染色体に存在する 2 つの隣接するノンコーディング RNA 領域から形成される新規 circRNA である circPDAC RNA が膵癌で高発現することを見出し、その全長配列を決定した。

本研究で同定した circPDAC RNA は 3 つのエクソンからなる 268 塩基長の circRNA であった。一般に circRNA の平均塩基長は、単一エクソンからなるものは 353 塩基長、2 つのエクソンからなるものでは 130 塩基長、3 つのエクソンでは 113 塩基長といわれており、2 つあるいは 3 つのエクソンからなる circRNA がもっとも頻度が高いことが報告されている[47] [26]。このことから、今回同定した circPDAC RNA も平均的な塩基長をもつ circRNA であると考えられた。

近年の RNA シークエンス技術の発展により、膵癌を含めた様々な癌種において circular RNA が異常発現していることが明らかになってきた[48] [12]。Voらは exome-capture RNA シークエンスによって様々な癌種における circRNA の網羅的発現解析を行い、約 150,000 種類の circRNA を同定し MiOncoCirc database を構築した[12]。このデータベースには今回我々が同定した circPDAC RNA は登録されていなかった。その理由はおそらく circPDAC RNA はノンコーディング RNA 領域から形成されるため、exome-capture RNA シークエンスでは検出することができなかつたためだと考えられる。本研究で同定した circPDAC RNA のように、ノンコーディング RNA 領域から形成される circRNA の中には、疾

患に特異的だがこれまで見逃されていたものが存在している可能性がある。

circPDAC RNA が存在する遺伝子座には、RefSeq データベースのアノテーション情報を用いると2つのノンコーディング RNA の LOC107987178 と LOC100507377 がアノテーションされていたが、Ensembl データベースのアノテーション情報を用いると単一のノンコーディング RNA の AC090015.1-203 がアノテーションされていた。上流の遺伝子の転写が終結せずに下流の遺伝子がつづけて転写されることによって、隣接する2つの遺伝子から circRNA が形成されることが報告されている[12]。PDAC RNA もこのような特殊な circRNA の一つである可能性がある。

circPDAC RNA は正常膵組織や非癌細胞株の多くにおいてはほとんど発現を認めなかったのに対して、膵癌・大腸癌・肝細胞癌・乳癌細胞株のなかの一部の細胞および293T では高発現していた。また、膵癌組織と前立腺癌組織においては、対応する正常組織と比較して circPDAC RNA は高発現していた。これらの結果から circPDAC RNA は膵癌以外の癌種でも発現している可能性が示唆された。本研究では、circPDAC RNA の発現量と同じ遺伝子座から転写される直鎖 RNA の発現量が連動していなかったことから、circPDAC RNA 発現増加の原因はその遺伝子座の転写が全体的に亢進したせいではないと考えられた。circPDAC RNA の発現増加の原因が転写促進によるものではないとすれば、pre-mRNA スプライシングをバックスプライシングに偏らせてしまうようなスプライソソームの異常が存在する可能性や、circRNA の分解に関わる分子に異常が存在する可能性があるが、circPDAC RNA の発現制御機構の解明は今後の課題である。

膵癌は正常組織が前癌病変を経て徐々に悪性形質を獲得し発癌に至るという多段階発癌モデルが提唱されている。本研究では、前癌病変である PanIN では circPDAC RNA の発現を認めなかった。一方で、circPDAC RNA 高発現はリンパ節転移と関連しており、病期が進行するほど高発現する傾向を認めた。このことから、circPDAC RNA は腫瘍形成よりも、浸潤・転移に強く影響している可能性が考えられた。本研究では circPDAC RNA の強制発現によって細胞増殖能の抑制を認めたが、その効果は限定的であった。circPDAC RNA の発現が浸潤能へ影響する可能性については検討できておらず、今後さらなる研究が必要である。また、正常組織においても少数の細胞で circPDAC RNA の発現を認めた。PanIN では circPDAC RNA の発現を認めなかったことを考えると、circPDAC RNA を発現する非癌細胞自体が癌化していくのではなく、他の細胞との相互作用を介して癌進行に寄与している可能性がある。Cell autonomous な機序、non-cell autonomous な機序を含めて circPDAC RNA が膵癌の進行にどのように寄与するかについては今後のさらなる検討が必要である。

circPDAC RNA の生物学的機能について、miRNA スポンジあるいはタンパク翻訳のテンプレートとして機能することを示唆する結果は得られていない。いくつかの circRNA はタンパク質と結合することによってそのタンパク質の機能を調節することが知られており、circPDAC RNA がそのような機能を有するかについては本研究では明らかにできていないため今後の検討が必要である。

circRNA は 5'末端、3'末端のない環状構造を有しているため、エクソヌクレアーゼ

に耐性で安定性が高い。そのため様々な疾患のバイオマーカーとしての応用が期待されている。膵癌患者の血液中から検出される circRNA について検討した報告はこれまでに 4 報ある。Li Qらの報告では、健常者と膵癌患者の血清中の circRNA を網羅的に解析し発現変化のある circRNA を同定していたが、バイオマーカーとしての診断能については検討されていない[44]。Li Jらによると、血中 circIARS は転移がない膵癌と比較して転移を有する膵癌患者で有意に高発現することが報告されている[45]。また、Li Zらによると、血中 circPDE8A の高発現は膵癌の予後不良因子であることが報告されている[46]。これらの circRNA が膵癌の診断マーカーとして有用であるかについては検討されていない。Yang F らは、膵癌患者 31 例と健常者 31 例を比較したところ、circ-LDLRAD3 が膵癌患者血清で高発現し、膵癌診断能は感度 0.5738、特異度 0.7049 であることを報告している[43]。circPDAC RNA は感度 0.45、特異度 0.90 であり、特異度については circ-LDLRAD3 を上回っていた。さらに、circPDAC RNA は膵癌患者のみならず IPMN 患者血清からも検出された点も特徴的である。

膵癌に対する既存の血清マーカーとして CA19-9 が日常臨床において使用されることが多いが、ルイス式血液型陰性者は CA19-9 が偽陰性となることが知られており[49]、その頻度は 5-10%程度である[50]。本研究においては、膵癌患者 20 例中 3 例で CA19-9 陰性であったが、そのうち 1 例では血清 circPDAC RNA 陽性であった。このことから、血清 circPDAC RNA と CA19-9 を組み合わせることによって膵癌診断能を向上できる可能性がある。本研究では健常者の CA19-9 は測定できていないため circPDAC RNA と CA19-9 と間

の診断能の比較や組み合わせによる有用性については検討できておらず、今後の課題である。IPMN 患者では CA19-9 は 10 例中 2 例で陽性であったが、これら 2 例とも circPDAC RNA 陽性であった。そのため、circPDAC RNA は CA19-9 よりも優れた IPMN 診断能を持つ可能性があるが、これについても、健常者の CA19-9 も測定した上でさらなる比較検討が必要である。

本研究では、膵癌血清はすべて切除不能膵癌患者由来であったため、血清 circPDAC RNA と病期との関連については明らかにできていない。前増幅によって血清中の circPDAC RNA の検出感度は上昇したものの、それと引き換えに定量的な測定はできなくなってしまう。膵癌組織においては病期が進行するほど circPDAC RNA を高発現する症例の割合が増加する傾向を認めたが、血清 circPDAC RNA と病期の関係を明らかにするためには、高感度かつ定量的な測定方法の開発が必要である。

本研究では健常者 20 例、膵癌 20 例、IPMN10 例に対して血清 circPDAC RNA 測定を行い、膵癌のみならず IPMN 患者血清からも circPDAC RNA が検出された。本邦における膵癌の罹患率は約 0.03% [51]であるのに対して、IPMN からの発癌は年率約 1%と高率であるが[52]、IPMN の診断に利用可能な血清診断バイオマーカーはまだ存在しない。そのため、血清 circPDAC RNA は膵癌のみならず膵癌の前癌病変である IPMN の新規診断バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。診断バイオマーカーとしての有用性を厳密に評価するためには幅広い病期の症例を含んだ大きなコホートに対しての前向き研究が必要であるが、血清 circPDAC RNA 測定によって、IPMN 患者を同定し膵癌のハイリスク

群として定期的なフォローアップへ誘導することで、膵癌の早期発見に貢献できる可能性があると思われる。

6. 結語

膵癌と正常膵組織における circRNA の発現を網羅的に解析し、膵癌で高発現する新規 circRNA を同定し、その全長配列を決定した。今回同定した新規 circRNA は膵癌患者および IPMN 患者の血清からも検出され、新たな膵癌診断バイオマーカーとして応用できる可能性がある。

7. 引用文献

- 1 Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology* **10**, 10-27, 2019.
- 2 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **70**, 7-30, 2020.
- 3 Anastasiadou, E., Jacob, L. S. & Slack, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**, 5-18, 2018.
- 4 Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A. J., Letovsky, S., Rivera, M. N., Bardeesy, N., Maheswaran, S. & Haber, D. A. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science* **331**, 593-596, 2011.
- 5 Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K. & Calin, G. A. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nature Reviews Clinical Oncology* **15**, 541-563, 2018.
- 6 Kishikawa, T., Otsuka, M., Yoshikawa, T., Ohno, M., Yamamoto, K., Yamamoto, N., Kotani, A. & Koike, K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. *JCI Insight* **1**, e86646-e86646, 2016.
- 7 Nigro, J. M., Cho, K. R., Fearon, E. R., Kern, S. E., Ruppert, J. M., Oliner, J. D., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Scrambled exons. *Cell* **64**, 607-613, 1991.

- 8 Cocquerelle, C., Daubersies, P., Majérus, M. A., Kerckaert, J. P. & Bailleul, B.
Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *The EMBO Journal* **11**, 1095-1098, 1992.
- 9 Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* **73**, 1019-1030, 1993.
- 10 Cocquerelle, C., Mascrez, B., Héтуin, D. & Bailleul, B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**, 155-160, 1993.
- 11 Glažar, P., Papavasileiou, P. & Rajewsky, N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA* **20**, 1666-1670, 2014.
- 12 Vo, J. N., Cieslik, M., Zhang, Y., Shukla, S., Xiao, L., Zhang, Y., Wu, Y. M., Dhanasekaran, S. M., Engelke, C. G., Cao, X., Robinson, D. R., Nesvizhskii, A. I. & Chinnaiyan, A. M. The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell* **176**, 869-881.e813, 2019.
- 13 Dong, R., Ma, X. K., Li, G. W. & Yang, L. CIRCpedia v2: An Updated Database for Comprehensive Circular RNA Annotation and Expression Comparison. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **16**, 226-233, 2018.
- 14 Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L.,

- Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F. & Rajewsky, N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **495**, 333-338, 2013.
- 15 Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L. & Brown, P. O. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genetics* **9**, e1003777, 2013.
- 16 Suzuki, H., Zuo, Y., Wang, J., Zhang, M. Q., Malhotra, A. & Mayeda, A. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Research* **34**, e63, 2006.
- 17 Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., Marzluff, W. F. & Sharpless, N. E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* **19**, 141-157, 2013.
- 18 Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., Chen, D., Gu, J., He, X. & Huang, S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Research* **25**, 981-984, 2015.
- 19 Enuka, Y., Lauriola, M., Feldman, M. E., Sas-Chen, A., Ulitsky, I. & Yarden, Y. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Research* **44**, 1370-1383, 2016.
- 20 Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K. & Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*

- 495, 384-388, 2013.
- 21 Hsiao, K. Y., Lin, Y. C., Gupta, S. K., Chang, N., Yen, L., Sun, H. S. & Tsai, S. J. Noncoding Effects of Circular RNA CCDC66 Promote Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Research* **77**, 2339-2350, 2017.
- 22 Zheng, Q., Bao, C., Guo, W., Li, S., Chen, J., Chen, B., Luo, Y., Lyu, D., Li, Y., Shi, G., Liang, L., Gu, J., He, X. & Huang, S. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nature Communications* **7**, 11215, 2016.
- 23 Verduci, L., Ferraiuolo, M., Sacconi, A., Ganci, F., Vitale, J., Colombo, T., Paci, P., Strano, S., Macino, G., Rajewsky, N. & Blandino, G. The oncogenic role of circPVT1 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated through the mutant p53/YAP/TEAD transcription-competent complex. *Genome Biology* **18**, 237, 2017.
- 24 Kristensen, L. S., Hansen, T. B., Venø, M. T. & Kjems, J. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. *Oncogene* **37**, 555-565, 2018.
- 25 Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V. W., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B. & Kjems, J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nature Reviews Genetics* **20**, 675-691, 2019.
- 26 Chen, L. L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **21**, 475-490, 2020.

- 27 Guarnerio, J., Zhang, Y., Cheloni, G., Panella, R., Mae Katon, J., Simpson, M.,
Matsumoto, A., Papa, A., Loretelli, C., Petri, A., Kauppinen, S., Garbutt, C., Nielsen,
G. P., Deshpande, V., Castillo-Martin, M., Cordon-Cardo, C., Dimitrios, S., Clohessy,
J. G., Batish, M. & Pandolfi, P. P. Intragenic antagonistic roles of protein and circRNA
in tumorigenesis. *Cell Research* **29**, 628-640, 2019.
- 28 Li, Q., Wang, Y., Wu, S., Zhou, Z., Ding, X., Shi, R., Thorne, R. F., Zhang, X. D., Hu,
W. & Wu, M. CircACC1 Regulates Assembly and Activation of AMPK Complex
under Metabolic Stress. *Cell Metabolism* **30**, 157-173.e157, 2019.
- 29 Zhao, J., Lee, E. E., Kim, J., Yang, R., Chamseddin, B., Ni, C., Gusho, E., Xie, Y.,
Chiang, C. M., Buszczak, M., Zhan, X., Laimins, L. & Wang, R. C. Transforming
activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus. *Nature
Communications* **10**, 2300, 2019.
- 30 Ouyang, H., Mou, L., Luk, C., Liu, N., Karaskova, J., Squire, J. & Tsao, M. S.
Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and
phenotype. *The American Journal of Pathology* **157**, 1623-1631, 2000.
- 31 Lee, K. M., Yasuda, H., Hollingsworth, M. A. & Ouellette, M. M. Notch 2-positive
progenitors with the intrinsic ability to give rise to pancreatic ductal cells. *Laboratory
Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology* **85**, 1003-1012, 2005.
- 32 Chen, Y., Chen, Y., Shi, C., Huang, Z., Zhang, Y., Li, S., Li, Y., Ye, J., Yu, C., Li, Z.,

- Zhang, X., Wang, J., Yang, H., Fang, L. & Chen, Q. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience* **7**, 1-6, 2018.
- 33 Gao, Y., Wang, J. & Zhao, F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. *Genome Biology* **16**, 4, 2015.
- 34 Gao, Y., Zhang, J. & Zhao, F. Circular RNA identification based on multiple seed matching. *Briefings in Bioinformatics* **19**, 803-810, 2018.
- 35 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 550-550, 2014.
- 36 Kramer, M. C., Liang, D., Tatomer, D. C., Gold, B., March, Z. M., Cherry, S. & Wilusz, J. E. Combinatorial control of Drosophila circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Genes & Development* **29**, 2168-2182, 2015.
- 37 Ono, Y., Sugitani, A., Karasaki, H., Ogata, M., Nozaki, R., Sasajima, J., Yokochi, T., Asahara, S., Koizumi, K., Ando, K., Hironaka, K., Daito, T. & Mizukami, Y. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving 'subsampling' issues. *Molecular Oncology* **11**, 1448-1458, 2017.
- 38 Bernard, V., Kim, D. U., San Lucas, F. A., Castillo, J., Allenson, K., Mulu, F. C., Stephens, B. M., Huang, J., Semaan, A., Guerrero, P. A., Kamyabi, N., Zhao, J., Hurd,

- M. W., Koay, E. J., Taniguchi, C. M., Herman, J. M., Javle, M., Wolff, R., Katz, M.,
Varadhachary, G., Maitra, A. & Alvarez, H. A. Circulating Nucleic Acids Are
Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **156**,
108-118.e104, 2019.
- 39 Dudekula, D. B., Panda, A. C., Grammatikakis, I., De, S., Abdelmohsen, K. &
Gorospe, M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their
interacting proteins and microRNAs. *RNA Biology* **13**, 34-42, 2016.
- 40 Fan, C., Lei, X., Fang, Z., Jiang, Q. & Wu, F. X. CircR2Disease: a manually curated
database for experimentally supported circular RNAs associated with various diseases.
Database : The Journal of Biological Databases and Curation **2018**, 2018.
- 41 Meng, X., Hu, D., Zhang, P., Chen, Q. & Chen, M. CircFunBase: a database for
functional circular RNAs. *Database : The Journal of Biological Databases and
Curation* **2019**, 2019.
- 42 Liu, W. & Wang, X. Prediction of functional microRNA targets by integrative
modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology* **20**, 18,
2019.
- 43 Yang, F., Liu, D. Y., Guo, J. T., Ge, N., Zhu, P., Liu, X., Wang, S., Wang, G. X. & Sun,
S. Y. Circular RNA circ-LDLRAD3 as a biomarker in diagnosis of pancreatic cancer.
World Journal of Gastroenterology **23**, 8345-8354, 2017.

- 44 Li, Q., Geng, S., Yuan, H., Li, Y., Zhang, S., Pu, L., Ge, J., Niu, X., Li, Y. & Jiang, H. Circular RNA expression profiles in extracellular vesicles from the plasma of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *FEBS Open Bio* **9**, 2052-2062, 2019.
- 45 Li, J., Li, Z., Jiang, P., Peng, M., Zhang, X., Chen, K., Liu, H., Bi, H., Liu, X. & Li, X. Circular RNA IARS (circ-IARS) secreted by pancreatic cancer cells and located within exosomes regulates endothelial monolayer permeability to promote tumor metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* **37**, 177, 2018.
- 46 Li, Z., Yanfang, W., Li, J., Jiang, P., Peng, T., Chen, K., Zhao, X., Zhang, Y., Zhen, P., Zhu, J. & Li, X. Tumor-released exosomal circular RNA PDE8A promotes invasive growth via the miR-338/MACC1/MET pathway in pancreatic cancer. *Cancer Letters* **432**, 237-250, 2018.
- 47 Zhang, X. O., Wang, H. B., Zhang, Y., Lu, X., Chen, L. L. & Yang, L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* **159**, 134-147, 2014.
- 48 Limb, C., Liu, D. S. K., Veno, M. T., Rees, E., Krell, J., Bagwan, I. N., Giovannetti, E., Pandha, H., Strobel, O., Rockall, T. A. & Frampton, A. E. The Role of Circular RNAs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Biliary-Tract Cancers. *Cancers* **12**, 2020.
- 49 Tempero, M. A., Uchida, E., Takasaki, H., Burnett, D. A., Steplewski, Z. & Pour, P. M. Relationship of carbohydrate antigen 19-9 and Lewis antigens in pancreatic cancer. *Cancer Research* **47**, 5501-5503, 1987.

- 50 Guo, M., Luo, G., Lu, R., Shi, W., Cheng, H., Lu, Y., Jin, K., Yang, C., Wang, Z., Long, J., Xu, J., Ni, Q., Liu, C. & Yu, X. Distribution of Lewis and Secretor polymorphisms and corresponding CA19-9 antigen expression in a Chinese population. *FEBS Open Bio* **7**, 1660-1671, 2017.
- 51 Hori, M., Matsuda, T., Shibata, A., Katanoda, K., Sobue, T. & Nishimoto, H. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **45**, 884-891, 2015.
- 52 Oyama, H., Tada, M., Takagi, K., Tateishi, K., Hamada, T., Nakai, Y., Hakuta, R., Ijichi, H., Ishigaki, K., Kanai, S., Kogure, H., Mizuno, S., Saito, K., Saito, T., Sato, T., Suzuki, T., Takahara, N., Morishita, Y., Arita, J., Hasegawa, K., Tanaka, M., Fukayama, M. & Koike, K. Long-term Risk of Malignancy in Branch-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Gastroenterology* **158**, 226-237.e225, 2020.

8. 謝辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科 小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたりまして以下の先生方に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学消化器内科

大塚基之先生、岩田琢磨先生、田中恵理先生、關場一磨先生、柴田智華子先生

大宮シティクリニック

森山優先生、中川良先生

がん研究所、がんエピゲノムプロジェクト

丸山玲緒先生

その他、様々な点で御協力いただいた東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。