

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06429

研究課題名(和文)BNPを介した新規Cancer autocrine pathwayの解明

研究課題名(英文)Mechanism of cancer autocrine pathway by BNP secretion

研究代表者

津谷 康大(Tsutani, Yasuhiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：10534985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに肺癌細胞株においてはBNPの分泌は確認されていない。次段階として我々は癌細胞のエクソソーム分泌に注目した。エクソソーム中には様々なsmall RNAが含まれている。健常者と肺腺癌患者の血清中small RNAの網羅的解析を次世代シーケンサーを用いて行った。肺腺癌患者において特定のsmall RNAが高発現していることが判明した。また癌患者の血清中に特異的に発現しているこれらのsmall RNAのいくつかは癌患者の血清中エクソソーム、がん細胞株培養上清にも発現していることが明らかとなった。これらのsmall RNAは新たながん診断バイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have not detected BNP secretion from lung cancer cell line. As a next step, we focused on the secretion of exosomes from cancer cells. we compared circulating small RNAs between healthy people and lung adenocarcinoma patients by next generation sequencer. Some small RNAs highly expressed in serum of lung adenocarcinoma patients. Some of these small RNAs were highly detected in circulating exosomes in serum of cancer patients and supernatant of cancer cell lines. These results suggested that some circulating small RNAs can be a novel diagnostic biomarkers to detect lung adenocarcinoma.

研究分野：肺癌

キーワード：small RNA

1. 研究開始当初の背景

研究者らはこれまでに複数の脂肪肉腫細胞株が BNP (B-type natriuretic peptide)を細胞外に分泌し、それが自らの受容体に結合し生存シグナルを活性化させる autocrine pathway を持つことを証明した。また脂肪肉腫が分泌する BNP は生体 (血漿中)でも確認可能であり、BNP が脂肪肉腫の新たなバイオマーカーとなりうることを証明した。

肺癌患者においても BNP の不活性化分子である NT-prpBNP が血中で増加しているという報告があり、脂肪肉腫と同様に肺癌細胞が BNP を分泌し、autocrine pathway を持つ可能性が示唆され、このメカニズムについて肺癌細胞を用いて研究し、肺癌においても新たなバイオマーカーとしての可能性を見出すことが可能であると考えた。

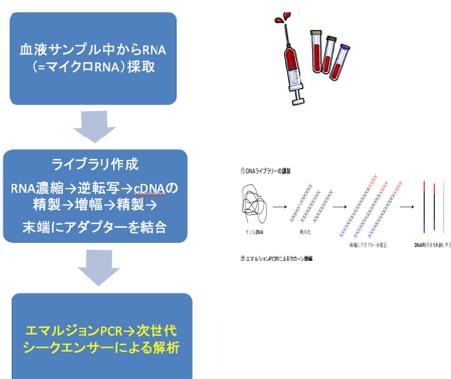
2. 研究の目的

肺癌細胞が分泌する分子に注目し、分泌分子が癌に関わるメカニズムの解明と新たな癌バイオマーカーの開発を目的とする。

3. 研究の方法

・肺癌細胞株を用い、培養上清中の BNP を ELISA 法にて測定する。

・健常人の血清 20 検体と肺腺癌患者の血清 20 検体を用い、RNA を抽出。次世代シーケンサー(NGS)を用い、small RNA の発現について網羅的に解析し、肺腺癌患者において有意に高発現、あるいは低発現している small RNA を同定する (図 1)。



(図 1) NGS による血清中 small RNA の解析

・上記で同定された small RNA の発現レベルが他機種の NGS においても再現されるかを確認する。

・別検体セットを用い、上記で同定された

small RNA の発現が健常者と比較し肺腺癌患者で有意に差があることを確認する。

・健常人、肺腺癌患者の血清中エクソソームを抽出し、エクソソーム中の small RNA の発現レベルを NGS を用いて比較する。

・がん細胞株の培養上清中のエクソソームを抽出し、これに含まれる small RNA を NGS にて測定する。

4. 研究成果

・肺癌細胞株において、BNP の分泌は現時点では確認されていない。

我々は癌細胞が分泌するエクソソームに注目した。エクソソーム中にはマイクロ RNA などの small RNA が含まれることが知られており、これらは新たな癌診断バイオマーカーとなりうる (図 2)。



(図 2) エクソソーム中に含まれる small RNA

・健常人と肺腺癌患者血清中 small RNA の比較において、複数の small RNA (マイクロ RNA 及び transfer RNA 断片) が肺腺癌患者において高発現していた (図 3、4)。

Fold changeが2倍以上のsmall RNA(miRNA)

肺腺癌群、非患者群とも全例で発現しているmiRNA						Fold change(肺癌群のread数/normal群のread数)
length	name	match type	fold change	p value		
ACTGGACTTGAGTCAGAGGCC	22	mir-378a	Mature 3'	3.09	0.016	556/180

肺腺癌群で全例で、または多数で発現しているmiRNA						Fold change(肺癌群のread数/normal群のread数)
length	name	match type	fold change	p value		
GAAGCTGAATCCATAGGCT	19	mir-146b	Mature 5' sub	8.32	0.002	139/17
TGACCTATGAATGCAGAGCC	20	mir-192	Mature 5' sub	4.99	0.015	1578/316
GAAGACTAGTGAATTTTGTGT	21	mir-7-1/mir-7-2/mir-7-3	Mature 5' sub	4.08	0.006	191/47
GAAGACTAGTGAATTTTGTGT	20	mir-7-1/mir-7-2/mir-7-3	Mature 5' sub	3.4	0.029	264/78
CACAGAAATATGGC	15	mir-195	Precursor	2.83	0.016	131/46

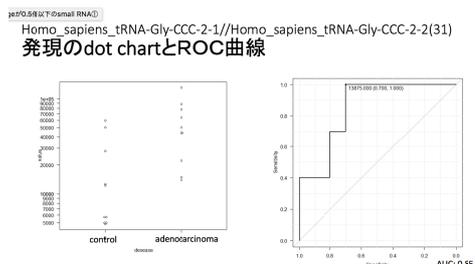
(図 3) 肺腺癌患者で高発現するマイクロ RNA

Fold changeが2倍以上のsmall RNA(trRNA断片)

length	name	fold change	p value	Fold change(肺癌群のread数/normal群のread数)	
GGCCCGCTGTACTGATATGCAAGAT	31	Home_sperm_rRNA-Gly-CCC-1-1/Normal_sperm_rRNA-Gly-CCC-2-2	2.92	0.0143	55119 / 18868
GGCCCGCTGTACTGATATGCAAGAT	29	Home_sperm_rRNA-Gly-CCC-1-1/Normal_sperm_rRNA-Gly-CCC-2-2	2.99	0.00918	1081 / 361
GGCCCGCTGTACTGATATGCAAGAT	30	Home_sperm_rRNA-Gly-CCC-1-1/Normal_sperm_rRNA-Gly-CCC-2-2	2.85	0.0226	150432 / 52701
GGCCCGCTGTACTGATATGCAAGAT	32	Home_sperm_rRNA-Gly-CCC-1-1/Normal_sperm_rRNA-Gly-CCC-2-2	2.45	0.0379	103991 / 42391

(図4) 肺腺癌患者で高発現する transfer RNA 断片

・上記で同定された small RNA の中には肺腺癌を高確率で予測できる可能性のあるものが含まれていた(図5)。



(図5) 肺腺癌患者の血清中に高発現していた transfer RNA の断片による肺腺癌診断予測の ROC 曲線

・上記で同定された small RNA の発現レベルは他機種の NGS を用いても同様の結果を示した。

・現在は健康人、肺腺癌患者の血清エクソソーム中の small RNA 発現レベルを NGS で比較中である。

(まとめと展望)

現在我々が注目している circulating small RNA の解析は liquid biopsy の観点から世界的に注目される手法の一つである。

Small RNA の発現を NGS で測定することにより、1塩基の違いを同定できる点(isomiRの同定)において新規性は高いと考えられる。この1塩基の違いが癌バイオマーカー、メカニズムにおいてどのような役割を持っているかはまだ分かっていないため、今後の研究が大いに期待される。

また現在その役割が全く分かっていない transfer RNA の断片の発現も健康人と肺腺癌患者において違いが見られている。この transfer RNA も新規バイオマーカーとしての候補であり、その機能解析も行なっていく予定である。

乳癌患者と健康人の血清中 small RNA の比較で同定されたバイオマーカー候補のいくつかは、血清エクソソーム中 small RNA の比較においても同様の結果を示しており、そのバイオマーカー候補が circulating エクソソーム由来であることが示唆されている。

また乳癌細胞株の培養上清中エクソソームからも上記で同定された small RNA の発現が確認されているため、このバイオマーカー候補が癌が分泌しているエクソソーム由来であることも示唆されている。肺癌においても同様の結果が期待される。

通常は同定された small RNA の発現は RT-QPCR などで測定するが、本研究結果から

は、1塩基の違いを正確に同定することが非常に重要であると考えていること、また今後の日常診療においても NGS を用いた網羅的遺伝子解析は標準化していくことが予想されるため、引き続き、NGS による解析を続けていく予定である。

現時点で同定している癌バイオマーカー候補の中には、複数の癌種において高発現している small RNA も存在しており、将来的に広範な癌スクリーニング診断として NGS 解析による small RNA 測定が有用となる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津谷 康大 (TSUTANI YASUHIRO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：10534985

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

