

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09179

研究課題名(和文) 血液・気道上皮被覆液miRNA発現解析に基づく呼吸器疾患バイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Study of biomarkers in respiratory disease based on the expression analysis of miRNAs in blood and epithelial lining fluid.

研究代表者

寒川 卓哉 (SAMUKAWA, Takuya)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：10363623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間全体の成果として下記の3つを報告した。

1. 血清B細胞活性化因子(BAFF)が特発性間質性肺炎CFIP (IPF + idiopathic NSIP)から膠原病関連間質性肺炎(CTD-ILD)を鑑別する有用な血液マーカーとなる。2. 肺扁平上皮癌においてmiRNA 218はTDP52を直接制御し、腫瘍抑制に作用する。3. 気道被覆液中napsin Aは原発性肺腺癌の有用なバイオマーカーとなる。

研究成果の概要(英文)：1. Serum B cell-activating factor (BAFF) may be a useful marker for distinguish connective tissue disease associated interstitial lung disease from chronic fibrosing interstitial pneumonia. 2. miRNA-218 on lung squamous cell carcinoma directly regulates oncogenic TDP52 and appears to function as a tumor suppresser through targeting of TDP52. 3. Evaluation of napsin A levels in epithelial lining fluid may be useful for distinguishing primary lung adenocarcinoma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：呼吸器疾患 バイオマーカー 気道上皮被覆液 miRNA

### 1. 研究開始当初の背景

原発性肺腺癌の血液診断マーカーとして CEA が測定されているが、特異度、感度共に低いため早期診断には不向きである。一方、microRNA (miRNA) は 21 ~ 23 塩基程度からなる短鎖 RNA で、mRNA のように直接タンパク質をコードしないが、遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。この miRNA の発現パターンが癌を含む種々の疾患で変化することが報告されており、癌の診断、治療に関するバイオマーカーとして有望視されている。早期診断を目指したエクソソーム miRNA 解析は組織、血液、喀痰を検体として報告が相次いでいるが、ELF を検体としての解析報告は少ない。

Napsin A は、特発性肺線維症 (IPF) の血清マーカーとして既存マーカー (KL-6、SP-D、SP-A) と同等に有用であることを申請者が報告した、II 型肺胞上皮に特異的に発現する分子量 38KDa のアスパラギン酸プロテアーゼである。原発性肺腺癌と転移性肺腺癌の鑑別に有用であると報告され、本邦においては原発性肺腺癌の病理組織学的診断バイオマーカーとして免疫組織学的検査に用いられているが、申請者らの解析では原発性肺腺癌患者における血清 napsin A はコントロール群に比べ有意な上昇を認めず肺癌における血液バイオマーカーとしての有用性は認めなかった。しかし、原発性肺腺癌患者において気管支鏡下に腫瘍近傍で採取した気道上皮被覆液 (ELF: epithelial lining fluid) 中 napsin A はコントロール (対側正常肺組織 ELF) に比べ有意に上昇を呈しており、ELF 検体では肺腺癌のバイオマーカーとして有用であることが予想される。

膠原病関連間質性肺炎 (CTD-ILD) は一般的に治療反応性が良く、特発性間質性肺炎 (IIP) に比して予後は良好である。しかし、CTD-ILD では、その背景となる膠原病の診断基準を一部分しかみださない不全型が存在するため、CTD-ILD と IIP を鑑別することは困難である。B 細胞活性化因子 (B cell-activating factor belonging to the TNF family: BAFF) は、TNF ファミリーに属するヒトとして報告された 285 のアミノ酸からなる膜蛋白である。単球、マクロファージ、樹状細胞の細胞膜上に発現し可溶性として分泌され B 細胞の分化、生存、増殖に重要な役割を果たしているサイトカインであるが、膠原病関連間質性肺炎 (CTD-ILD) に着目した報告はない。

### 2. 研究の目的

肺癌における miRNA の発現解析を行い、末梢血液および気道上皮被覆液 (ELF: epithelial lining fluid) を用いて、呼吸器疾患の早期診断を目指したエクソソーム microRNA (miRNA)、napsin A、BAFF のバイオマーカーとしての有用性を明らかにする。

血液中 miRNA の原発性肺腺癌の早期診断

マーカーとしての報告がなされてきているが、確立されたものはなく、ELF を検体とした報告は少ない。血清 napsin A は特発性肺線維症 (IPF) において異常高値を呈するが、ELF を用いた解析では原発性肺腺癌のバイオマーカーとなる可能性が高い。

血清 BAFF は、IPF のバイオマーカーとしての有用性も報告されているが、膠原病関連間質性肺炎の新規バイオマーカーとしての実用性が高いと考えられ、その有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

2010 年から 2013 年に鹿児島大学で手術を施行した肺扁平上皮癌 31 検体、非癌部 24 検体より total RNA を抽出し、qRT-PCR 法により miRNA の発現を解析した。細胞株はヒト肺扁平上皮肺癌細胞株である EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞を使用した。また、標的遺伝子の機能を確認明らかにするため、標的遺伝子の siRNA を導入した細胞株を用いて機能解析を行った。

CTD-ILD の診断における血清 BAFF 値の有用性を特発性間質性肺炎と比較し明らかにするために、健常者 (n=26)、慢性線維性間質性肺炎 (CFIP) (n=19)、分類不能型膠原病関連間質性肺炎 (UCTD-ILD) (n=16)、および CTD-ILD (n=33) 患者を対象として、血清 BAFF、KL-6、SP-D 値を測定し、呼吸機能検査との相関や肺組織における BAFF の発現を免疫組織学的染色を用いて検討した。

低侵襲で気道上皮被覆液を採取できる気管支鏡下マイクロサンプリング (BMS: bronchoscopic microsampling) 法の有用性が報告されている。BAL は生理食塩水の回収が不良な例が多く液体成分の定量的解析には問題がある。一方、BMS 法では任意の気道レベルからのサンプリングが可能であり、ELF を直接採取するため生理食塩水による希釈の推定が不要で液体成分の定量的解析が可能である。BMS の手技; ポリエチレン製の外筒と吸水性の高いポリエステル製ファイバロッドを先端に装着したプローブ (1.15mm) を使用する (オリンパス社プローブ BC-401C)。気管支鏡の鉗子口から外筒ごとプローブを挿入し、目的とする部位で外筒から出したファイバロッドを気道粘膜に密着させ 5~10 秒間静止させる。その後、外筒内に収納したプローブは外筒ごと気管支鏡から抜き、先端のファイバロッドに吸収された ELF を抽出し、液体成分の解析を行う。ロッドには、20~26 $\mu$ L の ELF が吸収される。

胸部画像検査にて肺野結節影を指摘され、原発性肺腺癌が疑われ手術適応と考えられた症例を連続で本研究に登録し、BMS 法にて病変部 (nodule site) と対側健常肺の非病変部 (contralateral site) から ELF を採取し、napsin A、CEA を測定した。

### 4. 研究成果

肺扁平上皮癌において腫瘍の進展に関するネットワーク検索を miR-218 起点として行った。扁平上皮癌部(n=31)および扁平上皮癌細胞株では、非癌部(n=24)と比較し、有意に miR-218 の発現低下を認めた(p<0.0001)。miR-218 を EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞に核酸導入した機能解析では、増殖抑制、遊走能の抑制、浸潤能の抑制を認めた(p<0.0001)。データベースを用いて miR-218 の結合が推定される 36 遺伝子を選出し、遺伝子候補一覧において最上位の遺伝子である TPD52 に着目し解析した。免疫染色において非癌部に比較し癌部で TPD52 の過剰発現を認めた。EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞への miR-218 核酸導入において、蛋白レベルでの TPD52 発現抑制を認めた(p<0.0001)。si-TPD52 を EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞に核酸導入し、遊走能の抑制、浸潤能の抑制を認めた(p<0.0001)。以上の結果から、miR-218 は TPD52 を直接制御し、腫瘍抑制性に作用することが示された。

CTD-ILD の診断における血清 BAFF 値の有用性を明らかにするために、健常者(n=26)、慢性線維性間質性肺炎(CFIP) (n=19)、分類不能型膠原病関連間質性肺炎 (UCTD-ILD) (n=16)、および CTD-ILD (n=33) 患者を対象として、血清 BAFF、KL-6、SP-D 値を測定し、肺組織における BAFF の発現を免疫組織学的染色を用いて検討し、以下の結果を得た。

- ・CTD-ILD 患者の血清 BAFF 値は、CFIP 患者や健常者に比して有意に上昇していた(p<0.01)。

- ・CTD-ILD 患者の血清 BAFF 値は、肺機能の間に有意な負の相関を示した (r=-0.4, p=0.02)。

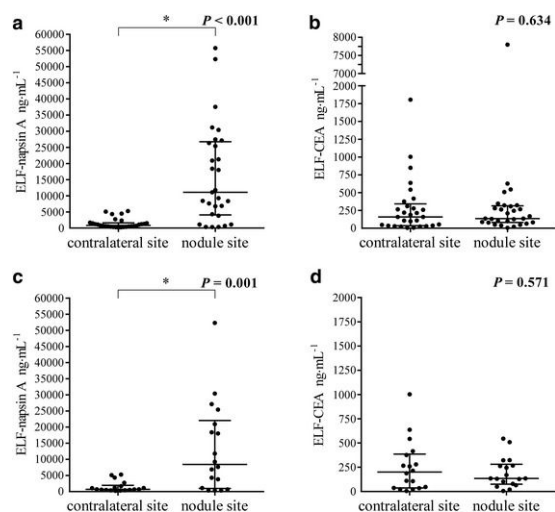
- ・BAFF は CTD-ILD 肺組織の肺泡マクロファージ、リンパ濾胞、線維芽細胞および肺泡壁に強く発現していた。

- ・血清 SP-D、KL-6 値は CTD-ILD 患者と CFIP 患者の 2 群間において有意差を認めなかった。

血清 SP-D と KL-6 値は CTD-ILD と CFIP 患者間で有意差はみられず、疾患活動性との相関関係も認めなかったが、血清 BAFF 値は CTD-ILD 患者において有意に上昇したことから CTD-ILD を診断するための有用な血清バイオマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、CTD-ILD 患者の血清 BAFF 値と肺機能には負の相関関係がみられたことから、血清 BAFF 値は肺病変の重症度を反映していることも考えられた。

原発性肺腺癌が疑われ、手術的適応と考えられる 43 例を連続して登録し BMS 法で病変部(nodule site)、非病変部(contralateral site)の ELF を採取し napsin A と CEA を比較検討した。原発性肺腺癌と診断された 29 例において、ELF 中 napsin A は非病変部に比較し病変部で著明に異常高値を呈し(図 1 a)有意であった(p<0.001)が、ELF 中 CEA は病変部・非病変部において有意な差は認めなかった(図 1 b) (p=0.642)。気管支鏡検査で確定診

断に至らず、手術にて原発性肺腺癌の診断が確定した 18 例の検討においても ELF 中 napsin A は非病変部に比較し病変部で著明に異常高値を呈し(図 1 c)有意であり(p=0.001)が、ELF 中 CEA は病変部・非病変部において有意な差は認めなかった(図 1 d) (p=0.57)。



原発性肺腺癌の診断バイオマーカーとしての ROC 解析での曲線下面積(AUC)は napsin A 0.840 に対して CEA 0.542 であった。以上の結果から、ELF 中 napsin A は原発性肺腺癌の有用なバイオマーカーと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

### 学会発表

1. Uchida A, Samukawa T, Kumamoto T, Mataka H, Mizuno K, Higashimoto I, Inoue H: Napsin A levels in epithelial lining fluids in patients with primary lung adenocarcinoma. American Thoracic Society International Conference 2016. 2016.5.13-18, San Francisco
2. Hamada T, Samukawa T, Kumamoto T, Higashimoto I, Mizuno K, Watanabe M, Inoue H: Serum B cell activating factor (BAFF) as a prognostic biomarker in interstitial lung diseases associated with connective tissue diseases. European Respiratory Society International Congress 2014. 2014.9.6-10, Munchen

### 論文発表

1. Uchida A, Samukawa T, Kumamoto T, Ohshige M, Hatanaka K, Nakamura Y, Mizuno K, Higashimoto I, Sato M, Inoue H: Napsin A levels in epithelial lining fluid as a diagnostic biomarker of primary lung adenocarcinoma. BMC Pulm Med 17(1):195, 2017
2. Kumamoto T, Seki N, Mataka H, Mizuno K, Kamikawaji K, Samukawa T, Koshizuka K, Goto Y, Inoue H. Regulation of TPD52 by antitumor microRNA-218 suppresses cancer cell migration and invasion in lung squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 49(5) 1870-1880 20167.

3. Hamada T, Samukawa T, Kumamoto T, Hatanaka K, Tsukuya G, Yamamoto M, Machida K, Watanabe M, Mizuno K, Higashimoto I, Inoue Y, and Inoue H. Serum B cell-activating factor (BAFF) level in connective tissue disease associated interstitial lung disease. BMC Pulm Med 15(1): 110-8, 2015

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

寒川 卓哉 ( SAMUKAWA, Takuya )  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師  
研究者番号：10363623

##### (2)研究分担者

井上 博雅 ( INOUE, Hiromasa )  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：30264039