

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K15617  
研究課題名(和文) エクソソームを用いた新たな頭頸部癌のバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomaker for head and neck cancer in exosome

## 研究代表者

丹生 健一 (Ken-ichi, Nibu)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：20251283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌培養細胞株を用いてエクソソームの単離とマイクロRNAの抽出法を確立した。この技術を利用して、頭頸部癌患者を対象とした臨床研究の計画を作成し、本施設の臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。本臨床研究では、腫瘍組織及び腫瘍組織の流出静脈から得られた血液、健側正常組織および健側正常組織の流出静脈から得られた血液から、エクソソームを単離してマイクロRNAを抽出する。現在、症例を集積中であり、得られた結果を比較検討することにより頭頸部癌に特異的なマーカーを見出す予定である。得られた腫瘍特異的なマーカーをプロモーターとして組み込んだアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の開発に利用する

研究成果の概要(英文)：Technical procedures of exosome isolation and microRNA extraction from head and neck cancer cell lines were established. Based on these techniques, protocol of clinical research to identify novel biomarker for head and neck cancer was prepared and approved by Kobe University ethical committee. In this research, tissues of tumor and bloods from draining vein of tumor as well as tissues of contralateral normal organ and bloods from draining vein of contralateral normal organ are harvested. Exosomes are extracted and microRNAs are extracted from these materials. Results will be analyzed to identify novel biomarkers for head and neck cancer. Our results will contribute to early diagnosis of head and neck cancer and lead to development of gene therapy using replication-selective adenoviral vector with specific promotor for head and neck cancer.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：エクソソーム マイクロRNA 頭頸部癌 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部は視覚、聴覚、平衡覚、嗅覚、味覚などの感覚、音声言語によるコミュニケーション、呼吸、摂食嚥下など様々な役割を担っている。従って頭頸部に発生した悪性腫瘍に対しては、癌の根治とともにこれら機能の維持が求められる。根治とQOLの維持という2つの命題を両立させるには、早期発見・早期治療がなによりの方略だが、頭頸部癌の多くは進行癌であり、約50%に再発がみられる。

現在、頭頸部癌の腫瘍マーカーとしては、血清中の squamous cell carcinoma (SCC) 抗原が用いられているが、その感度は40%程度であり (Inal et al., Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg, 2004)、臨床現場では実用的とはいいがたく、より感度の高い腫瘍マーカーの登場が望まれる。我々はこれまで、頭頸部癌に対する新たな腫瘍マーカーの開発を目指して、メタボロミクスの技術を用い探索など行ってきた (Yonezawa et al., Cancer Genomics Proteomics, 2013) が、未だ実用化には至っていない。より安定し、より効率的なバイオマーカーを求め中、今回の着想に至った。

エクソソームとは細胞は性状やサイズの異なる様々な小胞を分泌しており、分泌された小胞は血液などの体液に含まれて体内を循環している。20~900nm にわたるサイズ分布を持つと報告されている細胞外小胞のうち、エクソソームは100nm 以下に粒形分布を持つ微小な小胞である。2007年にエクソソーム中に mRNA やマイクロRNA (miRNA) が存在していることが発見されて (Valadi et al., Nat Cell Biol, 2007) 以降、エクソソームは細胞間コミュニケーションの担い手として非常に重要な研究対象になっている。一方で、エクソソームに内包された miRNA は体液中でも RNase による分解から守られて安定な状態で存在しうるため (Fleischhacker M et al., Biochim Biophys Acta, 2007)、エクソソーム放出時

の細胞の情報をそのまま保持していると考えられる。従って、非侵襲的な診断用バイオマーカーとして利用可能であり、近年、大きな注目を集めている。

血清中のエクソソーム内 miRNA を用いたバイオマーカー探索は、卵巣癌 (Taylor DD et al., Gynecol Oncol, 2008) や、膠芽腫 (Skog J et al., Nat Cell Biol, 2008) など報告がみられるが、頭頸部癌では上咽頭癌の血液や唾液中 (Houali K et al., Clin Cancer Res, 2007) 癌細胞株 (Zhang Z et al., Oncol Lett, 2014) に存在するエクソソームに含まれるタンパクについての報告はあるが、臨床検体を用いたエクソソーム内 miRNA についての検討は未だ見られない。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、頭頸部癌患者における鼻汁中、唾液中あるいは血中に存在する診断に役立つバイオマーカーの探索である。しかし、がん細胞から分泌されるエクソソームは、右図のようにがんの進行に関わる様々な役割を担っていることが明らかにされつつある。本研究により頭頸部癌患者におけるエクソソームのデータを広く得ることで、頭頸部癌の進行メカニズムの解明に繋がる可能性がある。また、エクソソーム内 miRNA のプロファイルにおいて、腫瘍の増殖や抑制に関わる miRNA の発現変化が見られた場合、それらを siRNA の技術を用いてノックダウンあるいは高発現させることで腫瘍の増殖抑制につながることを期待でき、腫瘍に対する全く新しい治療の開発へ繋がる可能性を秘めている。我々は、これまで頭頸部癌細胞株を用いて siRNA によりヒト乳頭腫ウイルスの発がん機構を抑えることが抗腫瘍効果を持つことを報告しており (Adhim Z et al., Acta Otolaryngol, 2013)、in vitro, in vivo 共に siRNA に関する豊富な実験ノウハウを有している。本研究の結果を踏まえ、すぐに

でも次のステップへ進むことが可能であり大きな成果が期待できる。

### 3. 研究の方法

頭頸部癌患者の腫瘍組織と血清を採取する。それらを前処理した後に超遠心分離およびフィルターを用いてエクソソームの単離を行う。単離したエクソソームからマイクロRNA (miRNA)の抽出を行い、次世代シーケンサーを用いてmiRNAの網羅的解析を行う。それぞれの組織型や病期、病理学的な悪性度といった臨床情報と、得られたRNA 情報を照らし合わせ、統計学的な解析を行う。最終的に組織型や予後を判定するマーカーとなり得る miRNA 発現プロファイルの特定を目標とする。

#### (1)得られた臨床検体の前処理

頭頸部癌腫瘍組織:我々の施設で手術治療を受ける頭頸部癌患者を対象とする。手術において腫瘍が摘出されると、すぐに病理標本とは別に切り出して氷上で検体を実験室へ運搬する。消化酵素を含む培地で約24時間処理後に、プレートへ播種する。一晚100,000xgで超遠心分離することによりエクソソームを除去した血清を培地に加え、48時間培養した後に培養上清を採取し、エクソソームの単離過程へ移る。培養上清内には、腫瘍細胞のみから分泌されたエクソソームが含まれており、血液中のエクソソームの構成と比較する。血清は採取後すぐに4°Cで運搬し、エクソソームの単離へと移る。

#### (2)エクソソーム単離:

300xgおよび2000xgの低速で二度遠心分離し上清を採取する。その後0.80µmのフィルターで濾過し他の小胞を除去する。さらに80分間100,000xgの超遠心分離を行い、沈殿したペレットからエクソソームを単離する。単離したエクソソームはナノサイト(カンタムデザイン社)等を用いて、小胞のサイズや濃度を確認する。

(3)miRNA の抽出: 単離したエクソソームから QUIAGEN 社の miRNeasy mini kit 等を用いて miRNA の抽出を行う。抽出した miRNA は Bioanalyzer (Agilent 社) 等を用い、RNA の品質評価を行う。

### 4. 研究成果

#### (1)エクソソームの単離とマイクロRNAの抽出法の確立

頭頸部癌培養細胞株を用いてエクソソームの単離とマイクロRNAの抽出法を確立した。

#### (2)頭頸部癌を対象とした臨床研究の推進

頭頸部癌患者を対象とした臨床研究の計画を作成し、本施設の臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

本臨床研究では、腫瘍組織及び腫瘍組織の流出静脈から得られた血液、健側正常組織および健側正常組織の流出静脈から得られた血液から、エクソソームを単離してマイクロRNAを抽出する。

現在、症例を集積中であり、得られた結果から腫瘍に特異的なマーカーを見出す予定である。

得られた成果は頭頸部癌の早期発見につながるるとともに、腫瘍特異的なマーカーをプロモーターとして組み込んだアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の開発に貢献するものと期待される。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1: Shinomiya H, Ito Y, Kubo M, Yonezawa K, Otsuki N, Iwae S, Inagaki H, Nibu KI. Expression of amphiregulin in mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: a molecular and clinicopathological study. Hum Pathol. 2016;57:37-44.

2: Fujita T, Yamashita D, Irino Y, Kitamoto J, Fukuda Y, Inokuchi G, Hasegawa S, Otsuki N, Yoshida M, Nibu K. Metabolomic profiling in inner ear fluid by gas chromatography/mass spectrometry in guinea pig cochlea. Neurosci Lett. 2015;606:188-93.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丹生 健一 (Ken-ichi Nibu)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20251283

### (2)研究分担者

大月 直樹 (Naoki Otsuki)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：40343264

### (3)連携研究者

藤田 岳 (Takeshi Fujita)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：90533711

### (4)研究協力者

上原奈津美 (Natsumi Uehara)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40570502