

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20134

研究課題名(和文)腎細胞癌特異的エクソソームにおけるmiRNA網羅的探索と、新規治療標的の同定

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of microRNA in serum specific exosomes for renal cell carcinoma enables to detect novel therapeutic target.

研究代表者

中田 渡(NAKATA, Wataru)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30648019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、腎癌の有用な血液バイオマーカーは存在しない。近年、多くの癌腫においてエクソソームがバイオマーカーとして注目されている。エクソソームは、細胞から分泌される30～200 nmの膜小胞で、あらゆる体液中に存在し、内部にマイクロRNA(miRNA)などを内包し、膜により分解から免れている。本研究の目的は、血清エクソソーム中miRNAによる腎癌の新規診断モデルの構築である。血清エクソソーム中miRNAを抽出し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。ランダムフォレスト解析で構築した腎癌診断モデルの診断能は、感度97.8%、特異度50.0%であり、良好な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Reliable biomarkers for renal cell carcinoma (RCC) have yet to be found. Recently, exosome is getting more attention as an emerging biomarker for several types of cancer. Exosomes are lipid bilayer vesicles containing protein, messengerRNA and microRNA (miRNA). The aim of this study is to construct novel diagnostic model for RCC using miRNAs in serum exosomes. We performed miRNAs microarray analysis of exosomes and identified miRNAs that expressed more highly in exosomes in RCC patients compared to those in healthy volunteer. Novel diagnostic model constructed by random forest analysis had a good capability (sensitivity 97.8%, specificity 50.0%) for the diagnosis of RCC.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：腎癌 腎細胞癌 エクソソーム マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

腎癌の日本での罹患数・死亡数は、10万人中で18.1人/7.0人であり、増加傾向にある。早期腎癌は局所治療で根治できるが、転移性・再発性腎癌は依然予後不良である。腎癌の診断は、画像検査や組織学的検査でなされるが、CTなどの画像検査は被爆や医療費の問題が、組織学的検査は得られる情報は多いが侵襲性が高く反復して施行できない問題がそれぞれ存在する。また腎癌は典型的な不均一な癌腫であり、一部の組織学的検査では癌の全容を把握することは困難である。これらの問題を克服する腎癌の血液バイオマーカーが求められている。

血液検査は、比較的低侵襲であり、また繰り返し採取可能であり、liquid biopsyとも言われ、癌の診断・モニタリングに有用である。血液バイオマーカーのリソースの1つとして、エクソソームが注目されている。エクソソームは、細胞から分泌される30~200nmの膜小胞で、あらゆる体液中に存在し、内部にタンパクやメッセンジャーRNA、マイクロRNA(miRNA)を内包し、膜により分解から免れている(図1)(文献)。またエクソサイトーシス・エンドサイトーシス機序を介し、細胞・組織間の情報伝達に関与しているとされ、癌細胞はエクソソームを血液を含む体液中に分泌することで、周囲の微小環境をより浸潤・増殖しやすい状態に変化させることや、エクソソームが標的臓器に到達し、癌細胞が転移しやすい環境を整えることが明らかになってきた(文献)。これらのことから、我々は腎癌患者血清エクソソーム中の網羅的miRNA発現解析を行い、腎癌患者特異的に発現変化するmiRNAを探索し、腎癌の新規診断モデルを構築することを目的とした。

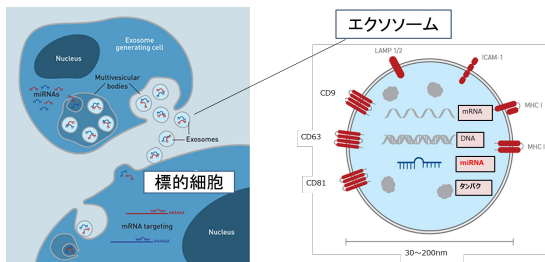


図1 エクソソームの構造(文献 改)

2. 研究の目的

(1) 腎癌患者血清エクソソーム中の網羅的miRNA発現解析を行い、腎癌患者特異的に発現変化するmiRNAを探索する。

(2) 血清エクソソーム中miRNAによる腎癌の新規診断モデルを構築する。

3. 研究の方法

(1) 対象は腎癌患者93名及び健常者46名であり、他の悪性腫瘍を合併している症例は除外した。腎癌患者は全例、生検もしくは手術によって病理組織学的に淡明細胞型腎癌

であることを確認した。全例、血清350ulを採取し、超遠心法を用いてエクソソームを回収した。エクソソームの回収は以下の3点で確認した(Western blot法にてエクソソームのマーカであるCD63、CD81、CD9の発現解析、ナノ粒子解析装置を用いた粒子径の測定、透過型電子顕微鏡にてCD9陽性の粒子の確認)。

(2) 続いて、3D-Gene™ miRNA Oligo Chipを用いたマイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。回収した血清エクソソームからToray 3D-Gene™ reagentを用いてRNAを抽出し、miRNeasy Mini Kit™にてRNAを精製した。3D-Gene™ miRNA Oligo Chipを用いたmiRNAマイクロアレイによる網羅的miRNA発現解析を行った。

(3) 統計学的手法であるランダムフォレスト解析(図2)により、健常者/腎癌患者の2群と、健常者/小径腎癌患者/進行性腎癌患者の3群での検討を行い、新規腎癌診断モデルを構築した。

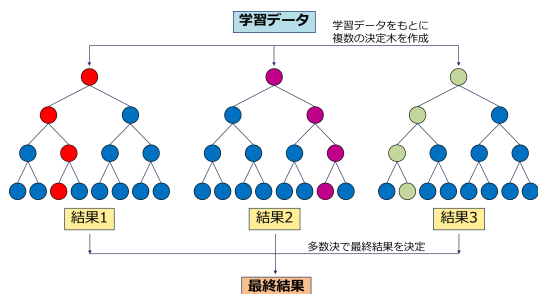


図2 ランダムフォレスト解析の原理

(4) 腎癌診断に有用なmiRNAを、ロジスティック回帰分析および交差検証を用いて選定した。また選定したmiRNAのシグナル値を用いて、各検体において腎癌予測確率を算出した。

4. 研究成果

(1) 以下の3種類の手法で血清から超遠心法でエクソソームが抽出できていることを確認した。

Western blot法にてエクソソームの表面マーカであるCD63、CD81、CD9の発現を確認した(図3A)。

ナノ粒子解析装置を用いて回収した粒子が100-200nmであることを確認した(図3B)。

透過型電子顕微鏡にてCD9陽性の粒子を確認した(図3C)。

(2) 健常者/腎癌患者の2群において、ランダムフォレスト解析で構築した腎癌診断モデルの診断能は、感度97.8%、特異度50.0%、area under the curve (AUC) = 0.739であった(図4)。

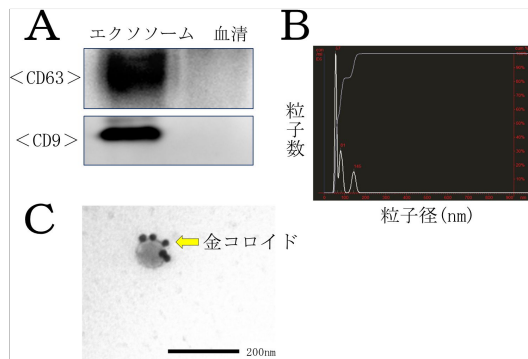


図3 エクソソームが回収できていることを確認した。A Western blot 法、B ナノ粒子解析装置、C 透過型電子顕微鏡

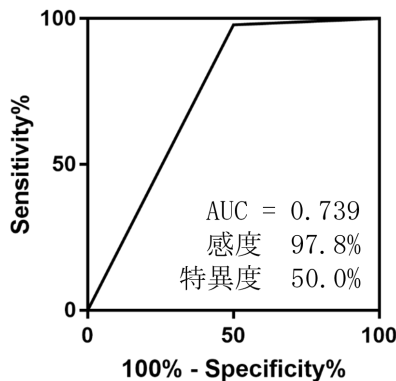


図4 ランダムフォレスト解析で構築した腎癌診断モデルの診断能

また、健常者/小径腎癌患者/進行性腎癌患者の3群においてランダムフォレスト解析を行い構築した腎癌診断モデルの正診率は、78.4%であった。

(3) ロジスティック回帰分析および交差検証を用いて、腎癌診断に有用な miRNA を3種選定した。3種の miRNA のマイクロアレイシグナル値から得られる腎癌予測確立は、腎癌患者で健常者に比して有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、小径腎癌患者の腎癌診断確率は健常者に比して有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (図5)。

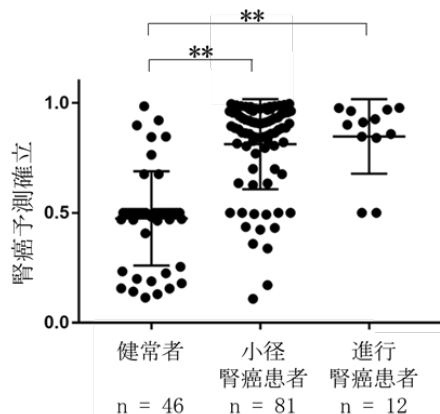


図5 小径腎癌患者、進行性腎癌患者共に健常者と比して腎癌予測確立が有意に高かった。 \*\*  $p < 0.01$

また、この3種の miRNA で構成された腎癌診断確率の腎癌診断能は、感度 80.7%、特異度 87.0%、 $AUC = 0.856$  であり(図6 A)、また小径腎癌に対する診断能は、感度 80.3%、特異度 87.0%、 $AUC = 0.850$  であった(図6 B)。

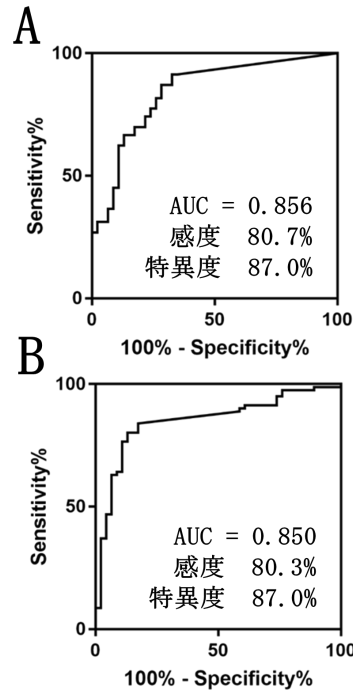


図6 ロジスティック解析で算出した腎癌診断確率による腎癌診断能(A)、小径腎癌診断能(B)

(4) 上記研究成果(2)(3)と並行して、血清エクソソーム中 miRNA のマイクロアレイ解析の結果から、腎癌診断に有用な miRNA の組み合わせを導き出すため、人工知能を用いたディープラーニングによる診断モデル構築を進めている。研究成果(2)(3)で構築した計学的診断モデルと比較し、その有用性の検証を進める。現在、腎癌の有用な血液バイオマーカーは存在せず、本研究で構築した血清エクソソームを用いた腎癌診断モデルの臨床応用が期待され、患者への負担、医療費の削減を含めた社会への貢献の意義は大きいと考えている。

#### <引用文献>

- Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*. 2012. 119: 646-648  
DOI : 10.1182/blood-2011-11-389478.
- Peinado H, Alečković M et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012. 18 : 883-891  
DOI : 10.1038/nm.2753.

#### 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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中田 渡 (NAKATA, Wataru)  
大阪大学・医学系研究科・招へい教員  
研究者番号：30648019

(2)研究協力者

植村 元秀 (UEMURA, Motohide)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：40631015

野々村 祝夫 (NONOMURA, Norio)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：30263263