

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10583

研究課題名(和文) エクソソームに包埋された核酸を用いた胃癌早期診断法の確立

研究課題名(英文) establishment of early diagnostic method in gastric cancer using exosome RNA

研究代表者

吉山 繁幸 (Yoshiyama, Shigeyuki)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：60444436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌細胞株ならびに胃間質細胞株の培養上清液より、別記の方法でエクソソームRNAを抽出しmicroRNA arrayに外注依頼し、データ解析し胃癌細胞株で異常発現している12miRNAを候補miRNAとして選定した。preliminary studyとして胃癌患者(n=10)ならびに健常者(n=10)の血清よりエクソソームRNAを抽出しqRT-PCR法で候補miRNAを定量し、統計解析ソフトでリスクスコアを作成した所、胃癌患者では健常人と比べてリスクスコアが有意に高値であり(P<0.0001)、リスクスコアによってArea Under Curve(AUC):0.966の精度で胃癌患者を識別しえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から分泌される細胞外微小小胞であるエクソソームは、癌細胞からも血液中に分泌され、癌細胞から分泌されたエクソソームは目的の細胞へと運ばれ、細胞間や組織へのシグナル伝達をおこない、癌進展や転移に関与する事が明らかになってきている。エクソソーム内に包埋されたmicroRNAsはヒト生体内で安定した状態で存在し、癌種ごとに特異的プロファイリングを形成するとされ、胃癌においても新規のバイオマーカー分野として深く探求していくに値するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We extracted exosomal-RNA from the culture-supernatant of gastric cancer cell line and gastric stromal cell line by the method mentioned separately, offered microRNA-array to outsource, then analyzed the data and identified 12 miRNAs which were significantly dysregulated in gastric cancer cell line. As a preliminary study, exosomal RNA was extracted from the sera of gastric cancer patients (n = 10) and healthy subjects (n = 10). Then the candidate miRNAs were quantified by qRT-PCR method, and risk score was created by statistical software. The risk score was significantly higher in gastric cancer patients than that in healthy controls (P <0.0001), and discriminated gastric cancer patients by the accuracy of Area Under Curve (AUC): 0.966.

研究分野：胃癌診断・予後に関するバイオマーカー

キーワード：胃癌 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本含めて東アジアや南米に患者が多い疾患で、近年検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は年々減少傾向にあるものの、2018年度の日本における胃癌の死者数は44,192人(男28,843人、女15,349人)で、肺癌、大腸癌に次いで第3位と依然、死亡者数の多い疾患である(厚生労働省 人口動態統計より)。

現在わが国では、胃癌検診は主に胃透視検査あるいは内視鏡検査が行われており、胃内視鏡検査においては2014年のガイドライン改訂に伴い、一次検診の方法として推奨された。しかしながら胃内視鏡検査は侵襲的であり、また機器の洗浄などを含めた煩雑さやコスト面などで多数の人数の検診を行うには改善点は多いと考えられる。一方で血液検査における腫瘍マーカーなど、非侵襲的で、早期胃癌発見に貢献できる新規のスクリーニング方法の確立は急務であると考えられる。また胃癌においては近年、内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)の普及に伴い、早期胃癌は手術を回避し内視鏡的切除で治癒可能とされる。その一方、ESD後に組織型、脈管侵襲、深達度等の因子により非治癒切除となった場合追加外科手術が推奨されているが、実際粘膜下層浸潤胃癌のリンパ節転移率は約15%であり、残りの患者に対しての外科手術は結果的に過大治療となっている現状がある。

これらを踏まえ、非侵襲的に早期胃癌や胃癌リンパ節転移を診断できる方法を確立すれば、国民の健康に大いに貢献でき、胃癌治療に関わる医療費の削減も期待できると考えられる。

細胞から分泌される細胞外微小小胞であるエクソソームは血液中で安定した状態であり、エクソソーム包埋されたmicroRNAsは癌種ごとに特異的プロファイリングを形成するとされ、新規のバイオマーカー分野として深く探求していくに値するものと考えられる。

2. 研究の目的

細胞から分泌されるエクソソームは、30~200nmの細胞外微小小胞であり、かつては細胞内の老廃物を排出するとされていたが、エクソソーム内にはDNA、RNA、脂質、タンパク質などを豊富に含む事が明らかになっている。癌細胞からも同様にエクソソームが血中に分泌されており、癌細胞から分泌されたエクソソームは目的の細胞へと運ばれ、細胞間や組織へのシグナル伝達をおこない、癌進展や転移に関与する事が明らかになってきている。

microRNAは22塩基対前後のsmall non-coding RNAで、複数の遺伝子の3'UTRに結合して遺伝子発現を制御する機能を有するとされるが、血液中に遊離した状態以外に、エクソソーム内で包埋された状態でも存在し、エクソソーム内のmicroRNAは非常に安定しており、癌特異的なプロファイリングを有するとされ、新規のバイオマーカーとして今後ますます注目されていくと考えられる。

本研究では、胃癌患者の血液から抽出したエクソソーム内のmiRNAs発現を網羅的に解析してプロファイリングを確立し、早期胃癌診断の上での、ならびに早期胃癌リンパ節転移陽性症例同定の上での新規のバイオマーカーの確立を目指す。同バイオマーカーの樹立により、胃癌の予後改善のみならず、国民医療費削減にも寄与しうる研究を行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1)胃癌細胞株のエクソソーム抽出

胃癌細胞株(MKN7, MKN45, MKN74, KATO3, NUGC3など)をFBS含有(ウシ由来のエクソソームは除去済)の培養液を用いて培養の後に上清をサンプリングし、ExoQuick-TCを用いてエクソソームを抽出する。胃由来繊維芽細胞HS738や正常腸上皮細胞InEpCや血管内皮細胞株HUVECも培養して上清からエクソソームを抽出し、抽出したエクソソームのプロファイリングを比較する。

(2)エクソソームの蛋白発現分析

(1)の過程で、胃癌細胞株ならびに正常組織細胞株より抽出したエクソソーム内のCD63, CD9, CD81, HSP70(エクソソームの特異的バイオマーカー)をWestern blot法で定量し、エクソソームの収量が十分であることを確認する。その後XPEP Exosome Mass Spec Kitを用いて蛋白を抽出しペプチドライブラリーを作成し、プロテオミクスを用いて、網羅的にエクソソームに発現する蛋白のプロファイリングを比較評価する。

(3)胃癌患者特異的蛋白発現エクソソームの定量

当科で手術施行した胃癌患者10例の癌組織と血清(術前/術後)、ならびに健常者の血清10例をサンプリングしエクソソームを抽出する。抽出したエクソソームは4um-aldehyde/sulphateラテックスビーズに吸着し、(2)で候補として選択した蛋白に対する二次抗体と反応させFACS analysisを用いて胃癌由来エクソソームを定量する。癌組織では免疫染色でも同定された蛋白発現量を評価する。

(4)胃癌患者特異的エクソソームmiRNAパネルの作成、ならびに診断能の検証

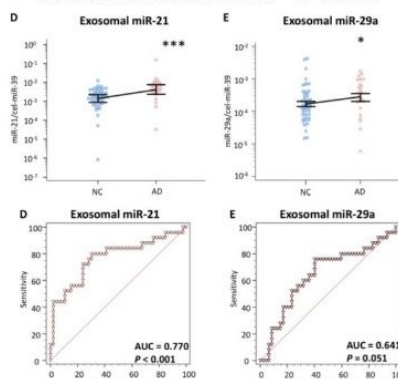
(3)同様に胃癌患者10例と健常者10例の血清から抽出したエクソソームを、外注依頼でmiRNA arrayをおこない、エクソソーム内のmiRNAプロファイリングを網羅的に解析し、比較評価する。胃癌患者に特異的なエクソソーム包埋miRNA数種類を同定しエクソソームmiRNAパネルを作成する。その後胃癌患者100例、健常者100例の血清から抽出したエクソソームを用いて、左記のmiRNAをqRT-PCR法で定量し、エクソソームmiRNAパネルによる胃癌診断能を検証する。

4. 研究成果

細胞外微小小胞であるエクソソームに包埋された microRNAs は癌種ごとに特異的プロファイリングを形成するとされており、我々はそのバイオマーカーとしての可能性に着眼しこれまでも研究活動ならびに論文報告をおこなってきている。

我々は、大腸腺腫(高リスク/低リスク)ならびに健常人の血液から抽出したエクソソームを用いてエクソソーム包埋 miRNA レベルを定量し、高リスク大腸腺腫患者では、健常人と比べてエクソソーム包埋 miR-21 ならびに miR-29 レベルが有意に高値であり、これらのエクソソーム包埋 miRNA が高リスク大腸腺腫を判別する上でバイオマーカーとなりうる可能性に関して報告している (右図、Uratani R, Toiyama Y, et al. PLoS One. 2016 Oct 19;11(10):e0160722)。

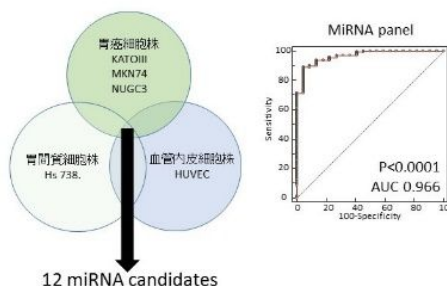
エクソソーム包埋 miR-21 と miR-29a は大腸腺腫症例で有意に高発現で、高リスク大腸腺腫の診断マーカーとなりうる



上記の研究成果もあり、今回エクソソーム包埋 miRNA の胃癌診断バイオマーカーとしての可能性に着目した研究を進める事とした。

胃癌細胞株 (KATOIII, MKN74, NUGC3) ならびに胃間質細胞株 Hs738 と血管内皮細胞株 HUVEC の培養上清液より、前述の方法でエクソソームさらにはエクソソーム RNA を抽出し microRNA array に外注依頼した。normalize された raw data をもとに、Hs738/HUVEC と比べて胃癌細胞株で異常発現している 12miRNA を候補 miRNA として選定した。その結果をもとに preliminary study として胃癌患者 (n=10) ならびに健常人 (n=10) の血清よりエクソソームさらにはエクソソーム RNA を抽出し qRT-PCR 法で候補 miRNA を定量した。定量結果をもとに統計解析ソフトウェアでリスクスコアを作成した所、胃癌患者では健常人と比べてリスクスコアが有意に高値であり (P<0.0001)、リスクスコアによって Area Under Curve (AUC):0.966 の精度で胃癌患者を識別するという結果であった (右上図)。

候補 miRNA panel による胃癌診断能に関する検証 (preliminary study)

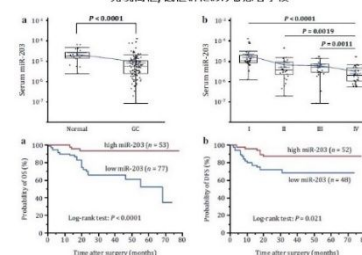


この結果はあくまで少数サンプルを用いての preliminary study であり、今後もサンプル数を大幅に増やすなどし、エクソソーム miRNA の胃癌バイオマーカーとしての有用性に関してさらなる研究を継続していく必要がある。

また本研究に付随してだが、我々は胃癌患者において miRNA のバイオマーカーとしての可能性に注目して研究発表、論文報告をおこなっている。

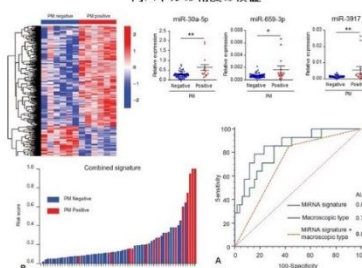
我々は血清 miR-203 の発現は胃癌患者では健常人と比べて有意に低値で、病期が進行するとともに低発現となり、血清 miR-203 低発現患者では高発現患者と比べて生存予後ならびに無再発予後が有意に不良である事を報告している (右図、Imaoka H, Toiyama Y, Yasuda H, et al. Gastric Cancer. 2016 Jul;19(3):744-53)。

胃癌患者における血清 miR-203 の発現、ならびに血清 miR-203 発現高値/低値群における患者予後



また我々は、腹膜播種陽性/陰性胃癌患者の癌組織から抽出した RNA で microRNA array を施行し、腹膜播種陽性症例に異常高発現の候補 miRNA を 5 つ選定、うち 3miRNA (miR-30a-5p, -659-3p, -3917) は qRT-PCR 法での validation phase においても腹膜播種陽性症例で有意に高発現であり、この 3miRNA の発現値をもとに作成したリスクスコアを用いると、AUC:0.82 と高精度に胃癌腹膜播種症例を識別しうる事を報告している (右図、Shimura T, Toiyama Y, et al. Ann Surg. 2019 Oct 28. Epub ahead of print)

胃癌腹膜播種症例に特異的な miRNA パネルの作成、ならびに同パネルの精度の検証



研究成果として示してきた通り、患者血清中のエクソソーム、ならびにエクソソーム包埋 miRNA は、今後胃癌診断バイオマーカーとして、ならびに胃癌個別化治療を選択する上でのバイオマーカーとしてさらなる発展を遂げる可能性を有すると考える。本研究においては、1. エクソソームの抽出を前述のキットに代わり超遠心法で施行する (エクソソーム収量は減少するものの抽出されるエクソソームの純度が高まるとされる)、2. discovery phase としてエクソソーム RNA を用いて microarray ではなく次世代シーケンズで候補 miRNA を選定する、3. validation のサンプル数を大幅に増やすなど、バイオマーカー研究としての質を高める上で幾つかの改善点があり、今後も研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Narumi A, Ichikawa T, Ide S, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Araki T, Kusunoki M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 876-883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-018-07112-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura Tadanobu, Toden Shusuke, Kandimalla Raju, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Kanda Mitsuro, Baba Hideo, Koderu Yasuhiro, Kusunoki Masato, Goel Ajay	4. 巻 -
2. 論文標題 Genomewide Expression Profiling Identifies a Novel miRNA-Based Signature for the Detection of Peritoneal Metastasis in Patients With Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLA.00000000000003647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、安田裕美、藤川裕之、大北喜基、吉山繁幸、廣純一郎、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、楠正人
2. 発表標題 胃癌分泌型エクソソーム特異的蛋白の同定と、それを用いたエクソソーム包埋遺伝子情報の網羅的解析
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志村匡信、問山裕二、奥川喜永、東田周祐、安田裕美、吉山繁幸、大井正貴、荒木俊光、楠正人、Ajay Goel
2. 発表標題 胃癌腹膜播種に特異的なmicroRNAパネルの同定ならびにその臨床的意義
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	
研究 分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・名誉教授 (14101)	
研究 分担者	安田 裕美 (Yasuda Hiromi) (60586767)	三重大学・医学部附属病院・学内講師 (14101)	
研究 分担者	毛利 靖彦 (Mohri Yasuhiko) (70345974)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	