

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08797

研究課題名(和文)尿中exosomeのmicroRNA分析による受動喫煙者の早期肺癌検診方法の開発

研究課題名(英文) Detection of early lung cancer using expression of microRNA in urinary exosomes according to smoking status

研究代表者

石川 成美 (Ishikawa, Shigemi)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：60232253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：尿中exosomesの解析が肺癌早期発見に有用かを検討する。肺がん患者35名、対照40名から尿を採取し、尿中exosomesのmicroRNAs (miR-21、miR-486-5p) およびMMP-1/CD63の発現を測定した。その結果、miR-486-5pの発現量は性差がみられ、女性の肺癌症例(非喫煙者)では顕著に有意に低い発現量、男性肺癌では有意に高発現を示した。MMP-1/CD63発現は肺癌、中でも非喫煙者腺癌で対照健常者に比し有意に高かった。尿中exosomeのmiR-486-5p、MMP-1/CD63解析は、肺がんスクリーニングとして有望と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の最たる点は、より簡便に採取できる尿のexosome解析から肺がん早期発見に寄与する知見を得た点である。尿中exosomeに含まれるmicroRNAsとしてmiR-21、miR-486-5pを、oncogeneとしてmatrix metalloproteinase (MMP)-1を検討し、うちmiR-486-5pが女性肺癌で、MMP-1は非喫煙者肺がん、早期発見に資する結果が得られた。昨今、増加傾向を示す非喫煙者、および女性肺癌の早期発見に役立つ可能性を示したと言える。

研究成果の概要(英文)：[Purpose] We isolated urinary exosomes as a screening source for lung cancer (LC) and measured both expression of microRNAs (miRs) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). [Methods] Thirty-five LC patients and 40 healthy controls provided the first urines in the morning. The expression of miR21, miR-486-5p and the expression of MMP-1/CD 63 in urinary exosomes were measured by qRT-PCR and Western blotting, respectively. [Results] The mean expression levels of miR-486-5p in male LC patients showed significantly higher those of male healthy controls. Whereas that in female LC patients showed lower those of female healthy controls. The expression ratio of MMP-1/CD63 in 35 LC patients was significantly higher compared with those in 40 healthy controls. [Conclusion] Combined expression of miR-486-5p and MMP-1/CD63 in urinary exosomes suggested the great advantage for non-smoker females to detect early stage adenocarcinoma.

研究分野：肺がん、スクリーニング

キーワード：lung cancer screening micro RNA exosome smoking

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、肺癌の診断に exosomes の microRNAs (miRs) が有用とする報告がある¹⁾。Exosomes は正常の細胞からも出されている 30~100nm の miRs、oncogene、脂質、蛋白質を含有した小胞で、組織・臓器における細胞間の情報伝達に関与し、遠隔の臓器細胞にもたらされ、発育・成長・増殖・細胞の死などの調節に関与している²⁾。病態において癌細胞からの exosomes は遠隔の臓器細胞に取り込まれ、がん転移の niche 形成に貢献している³⁾。Exosomes の miRs および oncogenes が注目されている。

肺癌の臨床面で、これを診断に応用できるとする報告数は僅かである⁴⁾。従来の報告は全て血中の exosomes であるが、我々はもっと簡便に尿中 exosomes の miRs を検出する方法を開発してきた⁵⁾。我々が注目した miRs はがん抑制遺伝子を target とする miR-21⁶⁾ および細胞増殖に関与する遺伝子 PIK3R1 を target とする miR-486-5p⁷⁾、oncogene として肺癌早期に発現が報告されている matrix metalloproteinase (MMP)-1 である⁸⁾。

2. 研究の目的

能動、受動喫煙、非喫煙の違いに配慮しつつ、肺癌症例の早期発見に有用な biomarker の確立を目指した。このために、非喫煙者で受動喫煙が推測される肺癌症例と直接喫煙による肺癌症例において、尿から exosomes を抽出して miR-21 と miR-486-5p および MMP-1 を測定し、非喫煙者肺癌症例を早期に発見できるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者

肺癌の外科治療で入院し、本人の署名を受けた同意書がある患者数は 35 名である。能動喫煙 14 名、喫煙歴がある 11 名、生来全く喫煙していない非喫煙者 11 名の計 35 名である。一方国際医療福祉大学病院の人間ドック受診者について、身体に理学的異常所見を認めず、尿・血液生化学検査・便潜血反応・胸部 X 線検査・心電図・腹部超音波検査・胃部 X 線または上部消化管内視鏡検査、また全員ではないが大腸内視鏡検査、男子では PSA、女子では婦人科検診・乳房超音波・マストグラフィーなどを受けた検査データで異常がなかった各年齢層で男子 20 名および女子 20 名の同意を得て対照者とした。

(2) 尿からの exosomes 抽出方法

磁気ビーズを利用した exosomes 単離キット (Exosome isolation kit, Miltenyi Biotec., Germany) を用いて尿から exosomes を単離した。単離した exosomes は、抗 CD63 抗体を用いて Western Blot および電顕で既に exosomes であることを確認した⁵⁾。Exosomes から RNA を抽出するために RNase-free water 200 μ l に溶解し、RNA を分離するために mirVana PARIS Kit (Ambion, Austin, Texas, USA) を用いた。

(3) PCR による miR-21 の測定

尿 exosomes 中の miR-21 相対発現の測定は、Step One Plus[®] (Applied Biosystems, MA, USA) を用いて定量的 RT-PCR を行った。相対発現とは、対照健常者の発現量を 1.0 として算出する (Δ CT)⁵⁾。

(4) MMP-1/CD63 発現比の測定尿 exosomes からの MMP-1/CD63 発現比は Western blotting により測定された。すなわち、抗 MMP-1 抗体 (abcam plc, Cambridge, UK) および抗 CD63 抗体 biotin conjugated (BioLegend Inc, CA, USA) を使用して行われた。肺癌症例と対照例の MMP-1/CD63 発現比を Image J 1.52a⁹⁾ で画像処理し、比較した⁵⁾。

(5) 統計解析

統計処理は PRISM 7 for Mac OS X (GraphPad Software, Inc; La Jolla, CA) により解析した。各群の数値は median [95% confidence interval (CD)] で示し、有意差検定は Student t test, Mann-Whitney U test で $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

4. 研究成果

(1) 肺癌 35 例の TNM 分類所見と喫煙状況

肺癌 35 例の病理所見は比較的早期の肺癌が多かった。Stage 0、Stage IA1、IA2 および IA3 はそれぞれ 1 例、6 例、7 例、3 例で 17 例みられ、全体の 47%であった。男子は 8 例、女子は 9 例で、能動喫煙者 (current) 6 例 (男子 4 例、女子 2 例)、喫煙歴がある者 (former) 5 例 (男子 4 例、女子 1 例)、生来全く喫煙していない非喫煙者 (never) 6 例 (男子 1 例、女子 5 例) であり、非喫煙者肺癌に女子が多いことが注目された。

Stage IB は 4 例 (男子 4 例、current 1 例、former 2 例、never 1 例)。Stage IIA は 1 例 (男子、never)、Stage IIB は 4 例 (男子 4 例、current 3 例、former 1 例)。Stage IIIA は 2 例 (男子 1 例 current、女子 1 例 never)、Stage IIIB は 1 例 (男子、former) であった。

一方、肺癌進行例は Stage IVa が 2 例 (男子、never と current) および Stage IVb が 5 例 (男子 4 例、current 2 例、former と never が各 1 例、および女子 1 例、former) で 7 例 (20%) であった。

(2) 肺癌症例と対照健常者での miR-21 および miR-486-5p 相対発現および MMP-1/CD63 発現比の比較

miR-21 は昨年報告したが各群で変化なかった。miR-486-5p 相対発現は対照健常者で男女差が認められた (Fig. 1)。女子が高値で男子が低下していた。肺癌症例は逆に男子で高く、女子で低値であった (Fig. 1)。一方で、肺癌症例における MMP-1/CD63 発現比は、対照健常者と比較して男女とも有意に高い値を示した (1.87 [95%CI: 1.33-2.41] vs 0.81 [95%CI: 0.61-1.01], $p=0.0004$) (Fig. 2)。また、MMP-1/CD63 発現比を肺癌ステージごとに対照健常者と比較したところ、Stage I 症例および Stage II 症例において有意に高値が認められた。

(3) 喫煙状況別の miR-21 および miR-486-5p 相対発現および MMP-1/CD63 発現比較

MiR-21 相対発現を喫煙状況別に検討したが各群に違いは見られなかったが、miR-486-5p では有意に男子喫煙者で低値であった。一方、MMP-1/CD63 発現比は、非喫煙者肺癌で有意に高値であった。非喫煙者腺癌男子 4 例は 2.63[95%CI:0.81-4.44]、非喫煙者腺癌女子 6 例は 3.21[95%CI:1.71-4.71]で女子の方が数値的には高い結果であった。

結果のまとめ

非喫煙者女性腺癌の miR-486-5p 発現量は対照健常人より低下し、MMP-1/CD63 の発現は Stage I と II で有意に高値であり、女性の非喫煙者腺癌の早期発見に資する結果であった。miR-486-5p および MMP-1/CD63 を用いてのスクリーニング検査法として有望な成績であった。

考察

MMP-1/CD63 発現比は、非喫煙者腺癌の早期発見に統計学的に有意な成績であった。miR-486-5p は miR-21 より女性では肺癌で良い結果であった。miR-2f1 は PTEN, HOXD10, TM1, PDCD4, MASPINなどを target とし⁶⁾、がん抑制遺伝子の産生を微調整している。一方、miR-486-5p は全細胞の増殖遺伝子の産生を微調整している⁷⁾。女子では MMP-1/CD63 発現比と miR-486-5p を測定しスクリーニングとして期待されるものであった。特に非喫煙者の女性の腺癌を早期に発見できる可能性がある。乳癌では miR-21 が早期癌でも発現が低かった。それぞれのがんの種類で判別するのに適切な miR を選択する必要がある。肺癌と miRs の研究は Yanaihara ら¹⁰⁾の論文を嚆矢とするが、血液中の miRs を直接分析し、遺伝子を内包する exosomes を target として分析していない。Exosomes から miRs を分析しているのは 9 論文にすぎない¹¹⁻¹²⁾。尿 exosomes を分析対象にしている論文は報告がない。我々が検討した結果からは女子で miR-21 より miR-486-5p の方が肺癌のスクリーニングに良い結果であった。男子に相応しい miR を見出したい。

MMP-1 は上述したが、肺癌初期に組織で発現が報告されている⁸⁾。MMP-1 のプロモーターに Ets 遺伝子が発現してくると MMP-1 陽性が見られるなど、遺伝子研究から肺癌での知見が 2000 年頃から報告され、肺癌での研究報告が最近多くみられる。今回の尿 exosomes からの MMP-1 の発現が肺癌早期発見に貢献できる成績で、さらに症例数を増加させて検証することと、肺癌の男女の違い、病理所見、Stage からの所見、喫煙状況、様々の因子から検討することをさらに進めたい。人間ドック受診者では超高齢受診者は少ないが、MMP-1 が関与する筋骨格系疾患患者における尿 exosomes の

MMP-1/CD63 発現比が非喫煙者肺癌検診に問題はないかさらに検討したい。

今後の展望

我々が既に発表した総説¹³⁾で詳細に記載したように、GPC5 遺伝子が関与する肺癌は疫学調査がしつかりとされており、直接喫煙が少ない肺癌患者に見られるがん抑制遺伝子である。今回の検討で miR-21 および MMP-1 で女性非喫煙者腺癌は明らかな違いが見られたが、GPC5 が関与する肺癌を target とする miR-21714, 15) を測定してさらに比較する必要がある。GPC5 遺伝子を抑制する miR として miR-620 も報告されているが、target gene の証明が不十分なので、miR-217 を検討する。これが男子の非喫煙者のスクリーニングに適切かを今後の研究課題としたい。

<引用文献>

- 1) Cazzoli R, Buttitta F, Nicola MD, Malatesta S, Marchetti A and Pass HI. Micro RNAs derived circulating exosomes as non-invasive biomarkers for screening and diagnose lung cancer. J Thoracic Oncol 2013; 8: 1156-1162.
- 2) Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature Cell Biol 2007
- 3) Anastasiadou E, Slack F. Malicious exosomes. Science 2014; 346 (6216) : 1459-1
- 4) Zhou X, et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. Oncotarget 2017; 8: 6513-6525.
- 5) Ando W, Kikuchi K, Uematsu T, Yokomori H, Takaki T, Sogabe M, et al. Novel breast cancer screening: combined expression of miR-21 and MMP-1 in urinary exosomes detects 95% of breast cancer without metastasis. Sci Rep 2019; 9:13595
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50084-5>
- 6) Zhu S, Si M-L, Wu H, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene Tropomyosin 1 (TPM1). JBC 2007; 282: 14328-14336
- 7) Tian F, Wang J, Ouyang T, Lu N, Lu J, Shen Y, et al. Mir-486-5p serves as a good biomarker in non-small cell lung cancer and suppresses cell growth with the involvement of a target PIK3R1. Frontiers in Genetics 2019; 10:688. Doi: 10.3389/fgene.2019.00688.
- 8) Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, Mittelstrass K, Timofeeva M, et al. Matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) is associated with early-onset lung cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17: 1127-35.
- 9) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25years of image analysis. Nat Methads 2012; 9: 671-675.
- 10) Yanaihara N, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006; 9: 189-198.
- 11) Shen J, Liu Z, Todd NW, Zhang H, Liao J, Yu Lei, et al. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. BMC Cancer 2011; 11:374
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/374>
- 12) Shan X, Zhang H, Zhang L, Zhou X, Wang T, Zhang J-Y, et al. Identification of four plasma microRNAs as potential biomarkers in the diagnosis of male lung squamous cell carcinoma patients in China. Cancer Medicine 2018; 7 (6): 2370-2381. Doi: 10.1002/cam4.1490
- 13) Okazaki I, Ishikawa S, Ando W, Sohara Y. Lung adenocarcinoma in never smokers: Problems of primary prevention from aspects of susceptible genes and carcinogens. Anticancer Res 2016; 36: 6207-6224.
- 14) Guo L, Wang J, Zhang T, Yang Y. Glypican-5 is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer cells. Biochem Biophys Rep 2016; 6:108-112.
- 15) Wang H, Dong X, Gu X, Qin R, Jia H, Gao J. The MicroRNA-217 Functions as a Potential Tumor

Fig.1

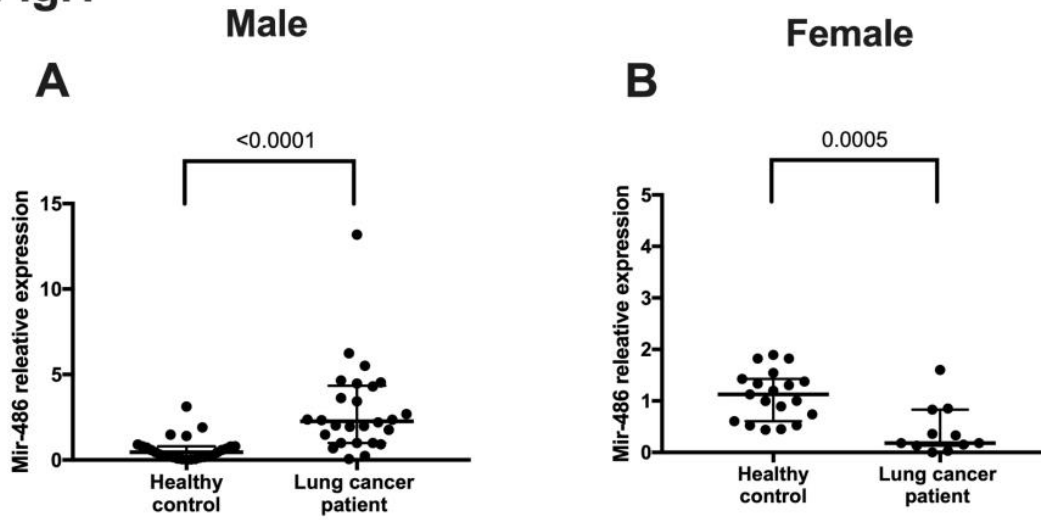
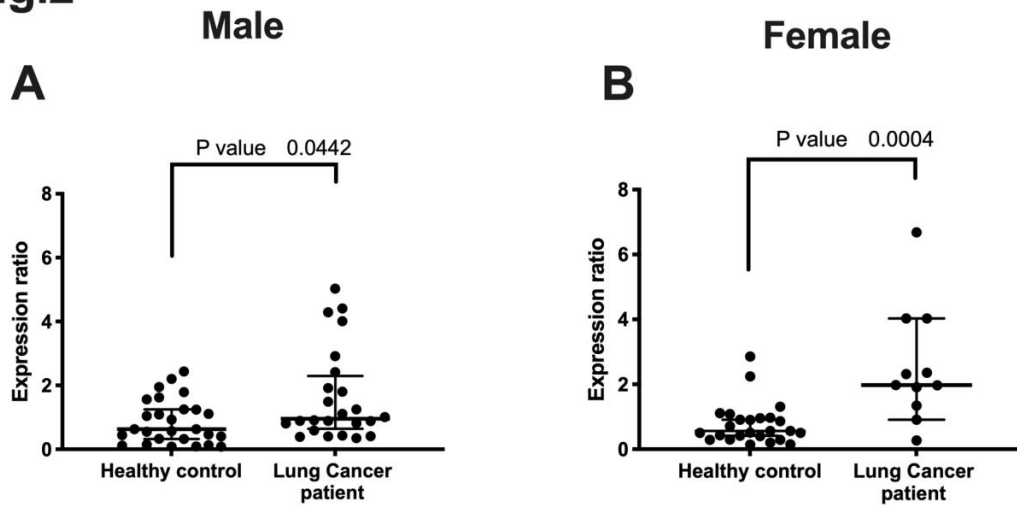


Fig.2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	高後 裕 (Kougo Yutaka) (10133183)	国際医療福祉大学・大学病院・教授 (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関