

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15817

研究課題名(和文) 血清エクソソーム中のmiRNAパネルを用いた食道扁平上皮癌の早期診断モデルの構築

研究課題名(英文) A novel exosomal miRNA-based diagnostic panel for detection of esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

三好 人正 (MIYOSHI, Jinsei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：00814625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：3つの網羅的データベースよりESCCに高発現する18個のmiRNAを選出した。ESCC組織32例及び正常組織32例におけるこれらのmiRNA発現を調べたところ、いずれもESCCで有意に亢進していた。次いで、ESCC症例の血清検体50例及び健常人血清50例におけるmiRNA発現を調べたところ、8個のmiRNAがESCC症例で有意に亢進していた。さらに、ESCC280例と健常人128例の血清を用いて8個のmiRNA発現を調べ、数理的手法によりmiRNAパネルを用いたESCCの早期診断モデルを構築した(AUC=0.83)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のモデルはスクリーニングマーカーとしての臨床応用に加え、術後や化学療法中のモニタリングマーカーとしても応用可能である。さらに、我々が同定したmiRNAパネルは治療標的にもなる。つまり、癌進展に関わる多数の遺伝子を同時に制御することができるmiRNAの特性を利用し、全く新たな創薬開発への応用が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We initially identified a panel of 18 most differentially expressed miRNAs from the RNA-Seq data and all were successfully validated in three independent in-silico datasets and 32 pairs of matched cancer and normal tissues. Remarkably, a combination panel of these 8 miRNAs could significantly discriminate ESCC patients from normal subjects in serum cohort. Next, we assessed and optimized a 8-miRNA panel with an impressive AUC value of 0.83.

研究分野：消化器内科

キーワード：miRNA ESCC exosome biomarker liquid biopsy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌の死亡率の高さと早期発見の重要性:

食道癌は我が国で年間1万人以上が死亡しており、世界でも全ての癌種中、6番目に多い死亡率である。組織学的には特に ESCC が多く、我が国では食道癌の9割以上を ESCC が占めている。食道癌の死亡率の高さの原因として、食道は解剖学的に周囲の脈管が豊富で、漿膜がないことから癌が容易に浸潤・転移を来すこと、また、食道癌は早期には自覚症状がなく、早期発見が非常に困難な事などが挙げられるが、現在、早期発見のためのスクリーニングマーカーは存在しない。従って食道癌患者にとって一番重要な早期発見可能、かつ低侵襲なスクリーニングマーカーの開発が急務となっている。

これまでの血中 ESCC バイオマーカー研究の限界:

今までにも多くの ESCC 早期診断マーカーの研究がされてきたが、以下に示す様々な問題から、臨床応用されるまでには至っていない。

- (1) 癌は多種多様な遺伝子変異を蓄積するため、腫瘍内不均一性を持っている。しかし、多くの研究が単独マーカー探索アプローチであり、そのため診断能に限界があった。
- (2) マイクロアレイ解析を用いた研究は、プローブ搭載数やダイナミックレンジに限界があり、搭載されていない遺伝子の発現や低発現域の遺伝子の検出が不可能であった。
- (3) 検体数やコホートの種類に限界があり、特に世界の ESCC 患者の9割を占めるアジアとアフリカの両コホートを兼ね備えたものはなく、研究の信頼性、応用性に問題があった。

早期癌診断バイオマーカーとしてのエクソソーム miRNA の重要性:

miRNA は、様々な癌により特有の発現パターンを示すため、新たな腫瘍マーカー候補として注目されている。しかし、miRNA は癌が脈管に侵襲後、血中に放出されるため、早期癌のマーカーとしては不向きである。研究代表者はこの問題を解決するため、エクソソームと呼ばれる miRNA を介して癌細胞の情報伝達に重要な役割を果たす小胞体に注目した。癌は発生から進展の過程で常に周辺細胞との密接な情報伝達を行っており、早期癌の段階で既にエクソソームは血中に放出されることが報告され、血液を用いた早期癌の腫瘍マーカーとして注目されつつある。

2. 研究の目的

ESCC は切除により治癒可能な疾患であるが、早期発見が困難なため、世界的に死亡率が高い。よって早期診断マーカーの早急な開発が ESCC 治療の最良の戦略である事は疑いの余地がない。しかし現在、有用な低侵襲 ESCC スクリーニングマーカーは存在しない。そこで我々は以下の目的(1)-(3)を血中 ESCC 早期診断マーカー構築へのアプローチとする。

- (1) 血中 ESCC 早期診断 miRNA パネルを同定する。
- (2) miRNA パネルを用い数学的手法に基づいた ESCC 早期診断モデル式を構築する。
- (3) 早期診断モデル式を複数の独立コホート(アジア、アフリカ)で検証する。

3. 研究の方法

(1) 目的 1: 血中 ESCC 早期診断 miRNA パネルの同定

目的 1a: ESCC と正常組織の miRNA 発現を比較した3つの RNA-Seq ビックデータ(TCGA, GSE55856, GSE43732)を解析し、共通して4つの基準(Adjusted P-value<0.05, $\log_2 FC > 0.5$, AUC value>0.7, Up-regulated miRNA)を全て満たす18種の miRNA(18-miR)を同定した(図1)。さらに、ROC 曲線を用い、18-miR パネルは癌をほぼ100%(AUC=0.98, 0.99, 0.98)の精度で診断できることを3つのデータベースで示した(図2)。

目的 1b: 早期 ESCC の血清エクソソーム(n=50)、健常者の血清エクソソーム(n=50)、同じ ESCC 症例の癌組織(n=50)とペアの正常組織(n=50)を用い、miRNA を抽出後、18-miR パネルの各 miRNA 発現を TaqMan real-time PCR(qRT-PCR)法にて測定する。血清からのエクソソーム精製は超遠心分離機を用い超遠心分離法で行う。

目的 1c: エクソソームは情報伝達を行う様々な細胞から血中に放出されており、早期 ESCC に特異的な miRNA パネルを同定するために、18-miR のうち ESCC 組織と血中エクソソームでも共通して有意に高発現する miRNA を血中 ESCC 早期診断 miRNA パネルとする。

(2) 目的 2: 数学的手法に基づいた ESCC 早期診断モデル式の構築

目的 2a: 共同研究施設から得たアジア人の独立コホート : 血清(ESCC:60, 健常:60)を用い、エクソソームを精製後、その中の最終 miRNA パネルそれぞれの miRNA の発現を qRT-PCR 法にて測定する。

目的 2b: 目的 2a の値を基に、多重ロジスティック回帰分析による ESCC 早期診断モデル式: $\text{Logit}(p) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + \dots + b_kX_k$ (Coefficients: $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$) を作成する。

(3)目的 3: 早期診断モデル式の他コホート(アジアコホート、アフリカコホート)での検証
 すでに共同研究施設から独立アジアコホート、独立アフリカコホートの血清を得ている。

目的 3a: 独立アジアコホート：血清(ESCC:100, 健常:50)を用い、アジアコホートを基に作成した早期診断モデル式を他の独立アジアコホートでも検証する。

目的 3a: アフリカ人の独立コホート: 血清(ESCC:300, 健常:100)を用いて検証することにより、我々の早期診断モデル式のさらなる有用性と頑健性を示す。

4. 研究成果

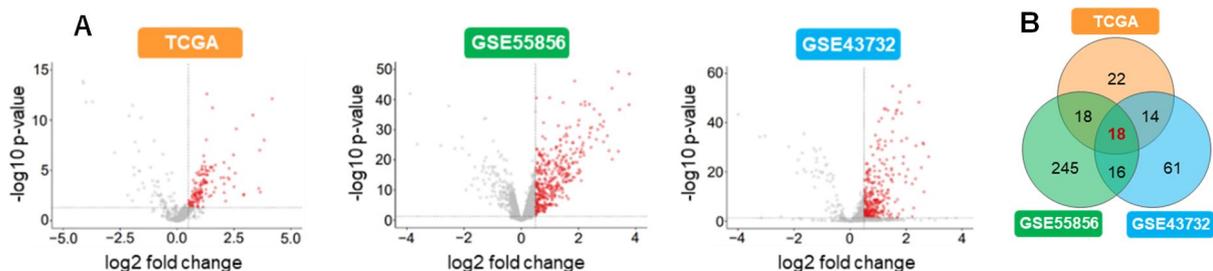


図 1: ESCC 組織データベース解析による候補 miRNA (18-miR) の選定

(A) 3つの ESCC 組織ビッグデータ分析から ESCC で高発現する miRNA をそれぞれ選出した。
 (B) それぞれ選出された miRNA のうち、全てに共通した 18 種の miRNA を候補 miRNA (18-miR) とした。

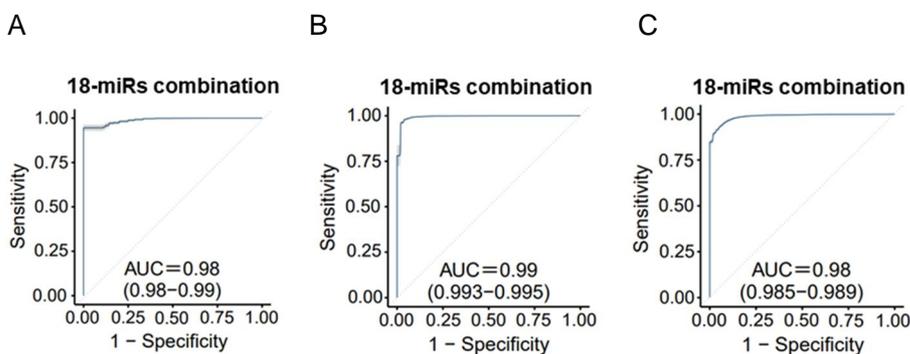


図 2: 18-miR パネルの ROC 曲線を用いた ESCC 診断能の検証

(A) TCGA (B) GSE55856 (C) GSE43732 の 3つの ESCC 組織データベースを用いて、18-miR パネルは ESCC 組織と正常組織をいずれもほぼ 100% (AUC=0.98, 0.99, 0.98) の精度で診断できた。

ESCC 組織 32 例及び正常組織 32 例におけるこれらの miRNA 発現を調べたところ、いずれも ESCC で有意に亢進していた。次いで、ESCC 症例の血清検体 50 例及び健常人血清 50 例における miRNA 発現を調べたところ、8 個の miRNA が ESCC 症例で有意に亢進していた。さらに、ESCC 280 例と健常人 128 例の血清を用いて 8 個の miRNA 発現を調べ、数理的手法により miRNA パネルを用いた ESCC の早期診断モデルを構築した (AUC=0.83)。

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
--	---------------------------	-----------------------	----