

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17421

研究課題名（和文）大腸腺腫/早期大腸癌由来のエクソソームを用いたリキッドバイオプシーの開発

研究課題名（英文）Development of liquid biopsy using exosomes released from patient-derived colorectal adenoma organoid

研究代表者

諸井 林太郎 (Moroi, Rintaro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90803594

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）：本研究では、リキッドバイオプシーによる大腸腺腫の診断方法を開発した。大腸腺腫オルガノイド培養上清中のエクソソーム内miRNAにおいてmiR-4323、miR-4284、miR-1268a、miR-1290、miR-6766-3p、miR-21-5p、miR-1246の発現高値が認められた。10 mm以上の大腸腺腫症例で内視鏡治療前後の比較を行い、治療後血清エクソソームmiR-4323、miR-4284、miR-1290、miR-1246の発現が低下した。4つのmiRNAを組み合わせることで大腸腺腫の診断能の向上が認められた。大腸腺腫におけるリキッドバイオプシーの候補となるmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではオルガノイド培養技術を用いることでこれまで困難であった大腸腺腫のエクソソームの評価とリキッドバイオプシーの有用性を明らかにした。オルガノイド培養技術を用いることで、臓器、疾患を問わずエクソソーム研究が可能となる。今後疾患特異的なエクソソームを明らかにすることで機能解析や新たなバイオマーカーの発見、さらにはそれらをターゲットとした治療にも繋がると考えられる。また、本研究で明らかにしたバイオマーカーを用いることで、これまでのスクリーニング検査で発見困難であった大きな大腸腺腫を発見できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We established organoid cultures from normal colon and CRA using resected specimens. Exosomes were isolated from the conditioned medium organoids. To identify candidates miRNAs for liquid biopsy, we prospectively compared changes in their expression in serum and exosomes before and after endoscopic resection in 26 patients with CRA. Seven exosomal miRNAs were overexpressed in CRA organoids: miR-4323, miR-4284, miR-1268a, miR-1290, miR-6766-3p, miR-21-5p, and miR-1246. The expression levels of four exosomal miRNAs (miR-4323, miR-4284, miR-1290, and miR-1246) and two serum miRNAs (miR-1290 and miR-1246) were significantly lower in post-treatment sera. Combined expression of four exosomal miRNAs could identify both CRA with respective areas under the curve (AUCs) of 0.698. We found that exosomal miRNAs derived from CRA organoid culture could be potential diagnostic biomarkers for CRA.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 大腸腺腫 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

我が国の大腸癌罹患率の現状と検診方法

わが国では大腸癌の罹患率が急激に上昇しており、部位別悪性新生物死亡率は女性で第1位、男性第3位である。罹患率はこの50年間で約10倍となり、大腸癌の life time risk(一生のうち大腸癌になる確率)は男性8.7%、女性7.1%と非常に高値である。大腸癌の発生は良性腫瘍である腺腫を経て大腸癌となる adenoma-carcinoma-sequence が提唱されている。前癌病変である腺腫の切除により大腸癌の罹患率や死亡率を低下する事が明らかとされている。また、早期大腸癌の5年生存率は99%と良好であるが、遠隔転移を有する進行癌では14.0%と極端に悪化する。このように、大腸癌は早期治療により完治が見込まれる疾患である。現在本邦では大腸癌の一次検診として便潜血検査、二次精密検査は大腸内視鏡検査が用いられている。便潜血検査は進行大腸癌の陽性率は60-75%であるが、早期大腸癌の陽性率は3%-40%と低値である。また、そもそも腺腫の検出を目的とした検査ではない。完治が見込まれる早期癌や腺腫の簡便なスクリーニング法は確立されておらず、新たな検査法の創出が望まれている。

エクソソームを用いたリキッドバイオプシー研究への期待と問題点

エクソソームは100nmの小胞顆粒で、多くの種類の細胞から分泌される。脂質二重膜を有し顆粒の内部には蛋白質、核酸(mRNA、miRNA、DNA)、脂質を含む。細胞外に分泌され別の細胞に移動する事が可能で、受容体や酵素と全く異なった細胞間伝達機構、細胞の恒常性維持機構として注目されている。近年、腫瘍細胞からもエクソソームが分泌され、血中にも安定的に存在する事が分かってきた。癌特異的なエクソソーム内の miRNA などを候補にし、血液検査のみで診断する「リキッドバイオプシー」に関する研究が多数報告されている。大腸癌患者では let-7a、miR-1229 など複数のエクソソーム miRNA の発現が同定されている(Ogata-Kawata H, et al .PLoS One. 2014 ;9(4):e92921)。一方で、これまでの研究には様々な問題点が存在する。培養細胞からエクソソームを抽出するには長期的な培養が必須である。患者由来の大腸腫瘍の長期培養は困難であったため(Cancer Res, 1976. 36:4562-4569)、これまでの研究は大腸癌の Cell line 由来のエクソソーム miRNA・蛋白を候補とし、大腸癌患者の血清エクソソームを用いて検証する手法が用いられてきた。Cell line は進行癌由来であり、腺腫や早期癌由来エクソソームの網羅的検索は不可能であった。また、患者由来の腫瘍細胞からのエクソソームの抽出は困難であったため、大腸癌患者血清から同定されたエクソソーム miRNA・蛋白が、本当に腫瘍から分泌されているかの証明は不可能であった。

大腸腺腫・早期大腸癌からエクソソームの抽出はできないのか？

近年、大腸上皮幹細胞の維持に必要なニッチ調整因子(Wnt/R-spondin、EGF、noggin 等)が明らかとされた。2016年には、これらを培地に添加しマトリゲル内で三次元オルガノイド培養する事で、ほぼ全ての腸管上皮、腺腫、腺癌の in vitro 長期培養が可能となった(Cell Stem Cell 2016, Jun 2;18(6))。我々はこのオルガノイド培養システムを用いて、これまで不可能であった腺腫、早期大腸癌の長期培養株を作成する事でエクソソームの抽出が可能となるのではないかと考えた。それにより腺腫・早期大腸癌由来のエクソソーム miRNA や蛋白が新規に同定可能となる。さらには、患者由来腺腫・早期大腸癌オルガノイドから抽出したエクソソーム miRNA・蛋白と、同一患者の治療前後の血清エクソソームの変化を比較検証することで腫瘍からの分泌が初めて証明可能となると考えた。この手法により大腸腺腫の早期診断のためのリキッドバイオプシーの開発が可能と考えた。

2. 研究の目的

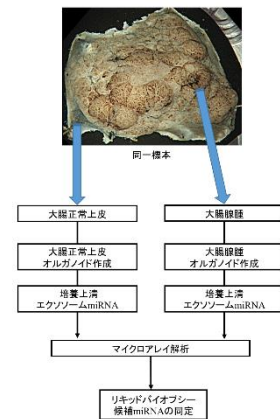
本研究の目標は内視鏡治療可能な大腸腫瘍性病変をリキッドバイオプシーにより早期発見可能とすることである。これまでのリキッドバイオプシー研究は、進行癌患者と健常者の血液サンプルを比較検討したものしかない。また、大腸腺腫は長期培養不可能であり、候補 miRNA は進行癌由来の大腸癌培養細胞株から抽出していた。本研究では、近年新たに確立された三次元オルガノイド培養法により、腺腫・早期癌の長期培養株を作成する。同一患者で、内視鏡治療前後の血液内エクソソーム miRNA と、同一患者から樹立した腺腫・早期癌オルガノイド長期培養株上清から得られたエクソソーム miRNA・蛋白を比較する新規の手法で、リキッドバイオプシーの候補となる大腸腺腫・早期癌特異的 miRNA の同定を試みる。

3. 研究の方法

研究1. 大腸腺腫、早期癌オルガノイドの樹立とエクソソームの抽出、解析

- (1) 大腸腺腫・癌オルガノイド培養の樹立:内視鏡で切除された大腸腺腫、早期大腸癌を用いる。癌の場合 TMN 分類で:T1, N0, M0 までの早期癌を対象とする。単離した細胞をマトリゲル内で培養する。ニッチ形成因子 (EGF、Noggin、B-27、ガストリン等) を添加し疑似的なニッチを保つ。近接する正常腸管上皮のオルガノイド培養株も樹立する。
- (2) エクソソームの回収、RNA、蛋白の抽出:得られた培養細胞株の上清を回収し超遠心法および ExoQuick(System Biosciences)を用いて抽出する。抽出したエクソソームの形態を電子顕微鏡、NanoSight で解析し、Total Exosome RNA and Protein Kit(Invitrogen)を用いて totalRNA、蛋白を精製する。得られたエクソソームを表面マーカーの CD63, CD9 をウエスタンブロット(WB)で確認する。
- (3) マイクロアレイ:正常上皮オルガノイド由来エクソソームと、大腸腫瘍オルガノイド由来エクソソームを比較検証する。正常/腫瘍エクソソーム間の miRNA をマイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現プロファイルと比較する。GreenChip miRNA Assay(affymetrics)を用いて 2 群間で発現が異なる miRNA を絞り込む。

図1

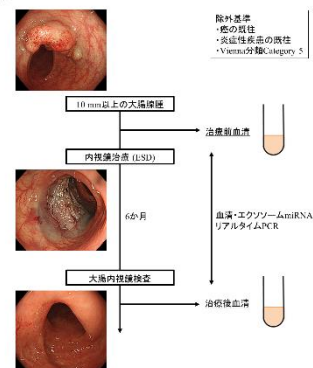


研究2. 血清中エクソソームの抽出と変動 miRNA・蛋白の検出

血清中エクソソームの治療前後の変動を確認するため、治療前1か月以内と、治療後6~12か月後の血清を用いる。

- (1) 血液サンプルからエクソソームの抽出:血清分離後、研究1と同様に超遠心法、もしくは ExsoQuick を用いてエクソソームを抽出する。研究1で得られた結果から、オルガノイド培養由来エクソソーム、治療前後の血液内エクソソームとともに発現が変化していた miRNA・蛋白を同定し、リキッドバイオプシーの候補 miRNA・蛋白を同定する。
- (2) 研究1、2の結果から候補とした miRNA・蛋白が他の患者血液サンプルでも同様に検出可能か前向き検証を行う。

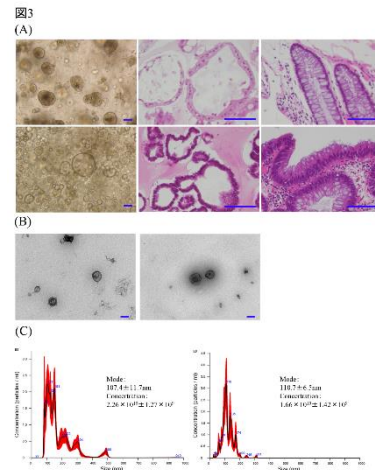
図2



4. 研究成果

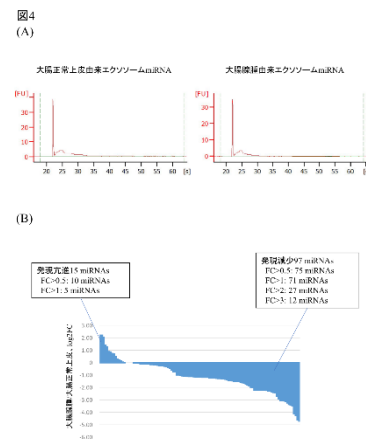
オルガノイドの作製と培養上清からのエクソーム分離

内視鏡治療が施行された大腸腺腫症例の切除標本より大腸正常上皮オルガノイド培養株、大腸腺腫オルガノイド培養株をペアで樹立した。作製したオルガノイドから観察用切片を作成し、H-E 染色を行い摘出された同一患者の標本と比較した。オルガノイドは腸管上皮様の構造物を有していることが確認された。大腸腺腫オルガノイドでは大腸正常上皮オルガノイドと比較し、核が紡錘形となっており、軽度のN/C比の増大、偽重層化といった大腸腺腫に特徴的な変化が認められた(図3A)。次に、オルガノイド培養上清から超遠心法によるエクソソーム分画の分離を行った。分離されたエクソソーム分画では透過型電子顕微鏡で100 nm前後の小胞が観察され(図3B)、ナノ粒子解析システムでエクソソーム分画中の微粒子は100 nm前後にピークを認めた(図3C)。



大腸正常上皮・大腸腺腫オルガノイド由来エクソソーム miRNA の網羅的解析

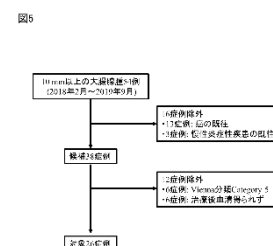
オルガノイド培養上清中のエクソソーム分画から total RNA を抽出した。得られた RNA は電気泳動を行い、リボソーム RNA の混入がないことを確認した(図4A)。大腸正常上皮由来エクソソーム miRNA の3例と、大腸腺腫由来エクソソーム miRNA の3例の発現差をマイクロアレイ解析で比較した。大腸腺腫由来エクソソームでは、大腸正常上皮由来エクソソームに比較し15個のmiRNAの発現が亢進、97個のmiRNAの発現が低下していた(図4B)。大腸腺腫由来エクソソームで、発現が亢進し Fold Change (FC) > 0.5 を満たす miRNA は10個(miR-4323, miR-4284, miR-1268a, miR-1290, miR-6766-3p, miR-21-5p, miR-1246, miR-2278, miR-3148, miR-595)であった(表2)。また、大腸腺腫由来エクソソームで発現が低下し FC > 0.5 を満たす miRNA は75個あった。FC > 3 を満たす miRNA は12個(miR-630, miR-6087, miR-4442, miR-5703, miR-6833-5p, miR-711, miR-7150, miR-6133, miR-4534, miR-6865-5p, miR-6775-5p, miR-4716-3p)であり、特に発現量に変動がみられたため表2に示した。



大腸腺腫由来エクソソームで発現が亢進していた10個のmiRNAのうち、FC > 1 を満たす5個のmiRNA(miR-4323, miR-4284, miR-1268a, miR-1290, miR-6766-3p)と、過去に大腸腫瘍に関連した報告のある2つのmiRNA(miR-21, miR-1246)をリキッドバイオプシーの候補miRNAとした。

内視鏡治療後4つの血清エクソソーム miRNA と2つの血清 miRNA の発現が低下する

次に前述の候補 miRNA の血清内での発現と診断的価値をリアルタイム PCR により確認した。登録された54例のうち癌の既往をもつ13例、慢性炎症性疾患の既往をもつ3例を除外し、治療後の病理結果でVienna分類Category 5であった6例、治療後の採血を得ることができなかった6例をさらに除外し、最終的に26症例を対象とした(図5)。臨床的特徴を表3に示す。26人の内



視鏡治療前後の血清サンプルで、6つの候補 miRNA (miR-4323、miR-4284、miR-1290、miR-6766-3p、miR-21-5p、および miR-1246) の発現を検証した。miR-1268a はプライマー作成困難であり評価できなかった。内視鏡治療後、血清エクソソーム miRNA では miR-4323、miR-4284、miR-1290、miR-1246 の発現レベルが低下した (図 6)。

同様に、血清 miRNA でも 26 人の内視鏡治療前後の血清で検証した。治療後血清 miR-1290、miR-1246 の発現レベルが低下した (図 7)。さらに、miRNA の発現レベルと臨床因子の関連を調べるために各 miRNA の単変量解析、多変量解析を行った。血清 miR-1290 において発現を増加させる因子は腫瘍の面積が有意な因子であった。

図6 血清エクソソームmiRNA

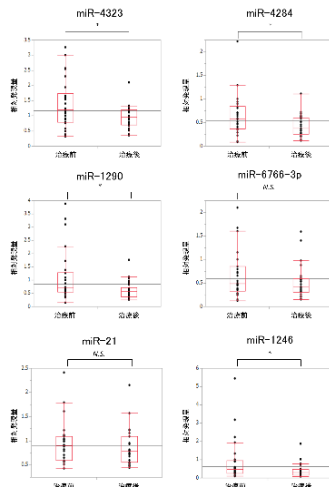
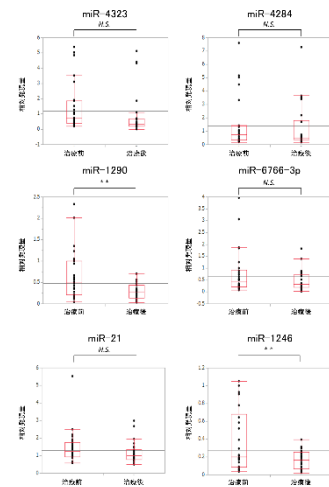


図7 血清miRNA

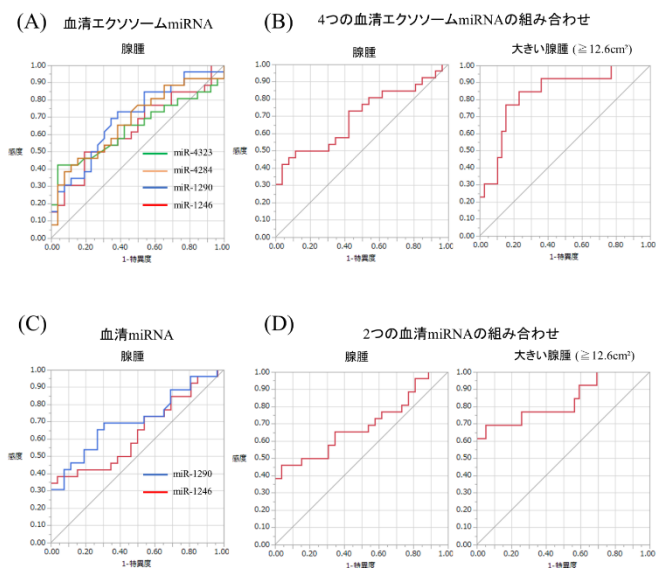


ROC 曲線を用いた候補 miRNA のバイオマーカーとしての診断能の評価

内視鏡治療後に発現が低下した候補 miRNA に関して ROC 曲線を使用して大腸腺腫の診断能を分析した。血清エクソソーム miR-4323、miR-4284、miR-1290、miR-1246 の AUC 値はそれぞれ 0.637 (95% confidence interval (CI) = 0.470-0.776)、0.677 (95% CI = 0.514-0.805)、0.694 (95% CI = 0.534-0.818)、0.635 (95% CI = 0.472-0.772) であった (図 8A)。4つのエクソソーム miRNA を組み合わせると単一の miRNA よりも大腸腺腫の診断能は高くなり (AUC 値 0.698 (95% CI = 0.536-0.823))、大きい腫瘍 (腫瘍面積中央値 (12.6cm²) 以上と定義した) においては AUC 値 0.834 (95% CI = 0.660-0.929) とさらに診断能の向上が認められた (図 8B)。

同様に血清 miRNA でも分析を行い、血清 miR-1290、miR-1246 の AUC 値はそれぞれ 0.705 (95% CI = 0.544-0.827)、0.639 (95% CI = 0.476-0.776) (図 8C)、2つの血清 miRNA を組み合わせると AUC 値は 0.691 (95% CI = 0.528-0.817) であり、大きい腫瘍では AUC 値 0.834 (95% CI = 0.628-0.938) であった (図 8D)。

図8



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Handa T, Kuroha M, Nagai H, Shimoyama Y, Naito T, Moroi R, Kanazawa Y, Shiga H, Kakuta Y, Kinouchi Y and Masamune A	4. 巻 0
2. 論文標題 1. Liquid Biopsy for Colorectal Adenoma: Is the Exosomal miRNA Derived From Organoid a Potential Diagnostic Biomarker?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Transl Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 :e00356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14309/ctg.0000000000000356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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