

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18091

研究課題名（和文）尿中癌由来エクソソーム内包miRNAの網羅的解析による腎癌診断バイオマーカー探索

研究課題名（英文）Identification of non-invasive miRNA biomarkers for ccRCC by comprehensive analysis of urinary exosomes

研究代表者

王 聡 (wang, cong)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70783893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：尿中に癌特異的なエクソソーム内包miRNAを同定するために、我々は確立した組織培養由来エクソソーム抽出法を用いて、腎癌組織から特異的なエクソソームを単離することに成功し、内包miRNAを精製し、網羅的解析により組織由来癌特異的なエクソソーム内包miRNAの候補を同定した。次に腎癌患者、健康者尿中エクソソームを超遠心法を用いて抽出し、尿中エクソソーム内包miRNAの網羅的解析にも成功し、尿中有意に発現上昇しているmiRNA候補を同定した。しかし現段階では腎癌患者尿中および腎癌組織由来エクソソーム中に共通してみられた内包miRNAの存在を確認できなかった。更なる解析によって、探索する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は確立した組織培養由来エクソソーム抽出法を用いて、今回腎癌組織および正常組織からそれぞれ特異的なエクソソームを単離することに成功し、さらに内包miRNAの抽出も可能であることを検証できた。また腎癌患者および健康者尿中エクソソームの回収単離にも成功し、尿中エクソソーム内包miRNAの解析も成功した。今後他癌種への応用も可能と考え、さらに研究の幅を広げることにより、癌特異的なマーカーの探索に役に立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We focused on miRNAs of urinary exosomes with the aim of identifying novel biomarkers of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). We extracted exosomes not only from urine, but also directly from surgically resected tissue samples by ultracentrifuge methods in order to detect cancer-specific urinary exosomal miRNAs. Microarray analyses were conducted. 8 candidates miRNAs extracted from tissue samples were found to be significantly higher in ccRCC patients and 12 candidates miRNAs were identified significantly higher from urine samples. As the candidates from the two groups were different from each other, we could not identify cancer-specific exosomal miRNAs from urine in ccRCC, and further studies are needed in this area.

研究分野：腎癌

キーワード：腎癌 エクソソーム miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎癌の早期診断や治療効果モニタリングを可能とする有用な血液バイオマーカーは存在しない。エクソソームは体液中に安定に存在し、分泌細胞の情報を内包しており、liquid biopsy のリソースとして注目されている。近年、癌細胞は miRNA を豊富に内包するエクソソームを分泌しており、その miRNA を介して癌微小環境に影響を及ぼすことがあきらかとなっている。これまで血中エクソソーム内包 miRNA の網羅的解析によるバイオマーカー探索が行われてきたが、臨床応用段階まで進んでいるものが少ない。これまで尿中に癌特異的なエクソソームが存在することが証明されており、我々は血中エクソソーム内包 miRNA のプロファイルとの違いに着目した。

### 2. 研究の目的

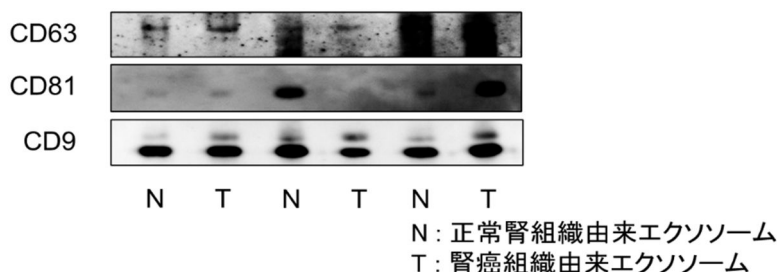
腎癌患者尿中および組織由来エクソソーム内包 miRNA に着目し、網羅的 miRNA 発現解析により、特異的に発現変動する miRNA 候補を同定し、バイオマーカーとしての有用性を検討する。さらに同定した候補 miRNA の機能解析を行い、腎癌進展メカニズムの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

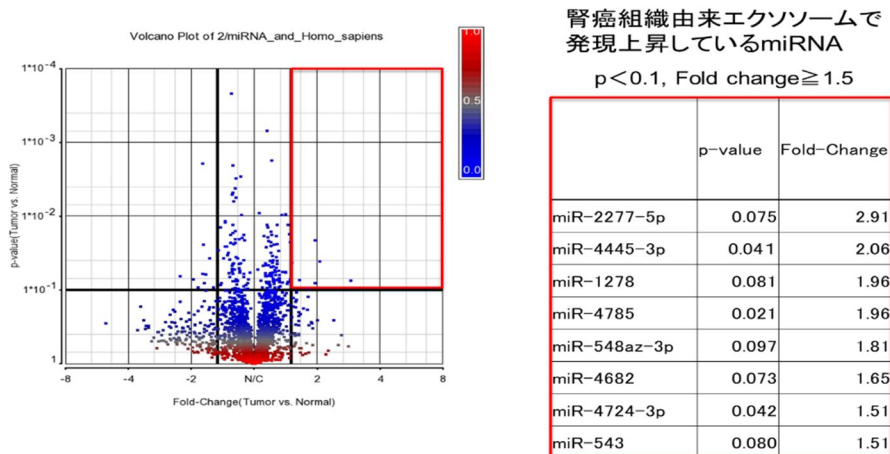
腎癌患者および健常者尿サンプルおよび組織検体から超遠心法を用いて、エクソソームをまず回収単離した。次にエクソソーム内包 miRNA を精製し、マイクロアレイによる網羅的解析で、癌患者の尿中エクソソーム内および腎癌組織検体由来エクソソーム内でそれぞれ特異的に上昇している miRNA をバイオマーカー候補として選定し、さらに共通して見られた癌特異的な発現変化を示す miRNA 候補の有無を比較検討した。

### 4. 研究成果

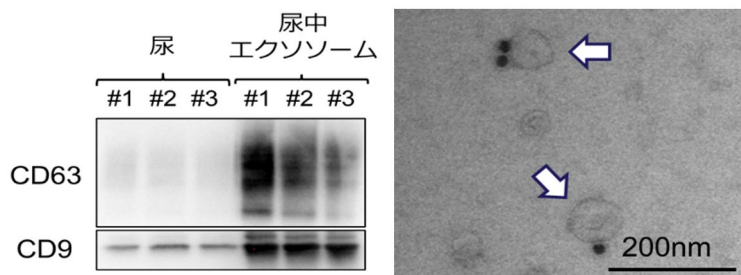
(1) 腎癌組織および正常組織から直接分泌されるエクソソームを抽出する方法を用いて、組織由来エクソソームを単離した。抽出したエクソソームにおいて、エクソソーム特異的な膜表面タンパクである CD9, CD63, CD81 が発現していることを western blot 法で確認した。



(2) 腎癌組織および正常組織由来エクソソーム回収後、miRNeasy kit を用いて、内包 miRNA を抽出精製し、さらに GeneChip miRNA 4.0 Array を用いて、網羅的 miRNA マイクロアレイ解析による発現解析を行った。以下結果：

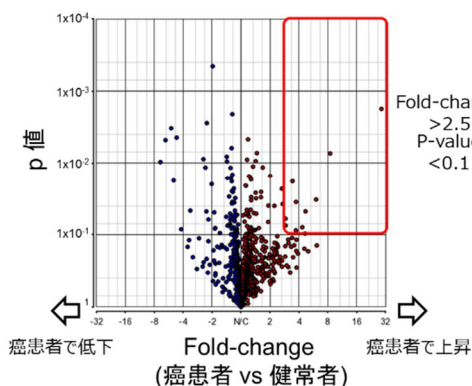


(3) 同様による超遠心法を用いて、尿中エクソソームの回収と確認を行った。  
 下左図は Western blot 法で CD9,CD63 が膜表面に発現していることを示した。  
 下右図は電子顕微鏡で 200nm 以下の粒子であるエクソソームを確認したことを図示している。  
 エクソソーム表面の CD9 膜タンパクに対し、抗体および金コロイドで標識したものを矢印で図示している。



(4) 尿 40ml から超遠心法を用いて、エクソソーム内包 miRNA を単離精製後、網羅的マイクロアレイ解析を行い、癌患者の尿中エクソソーム内有意に上昇している miRNA をバイオマーカー候補として選定した。

### 1) Volcano plotによる miRNA発現比較



### 2) 癌患者尿中エクソソーム内で上昇していたmiRNA

	Fold-change	p 値
miR-155-5p	28.79	0.002
miR-122-5p	8.60	0.005
miR-205-5p	5.99	0.030
miR-1910-5p	4.47	0.049
miR-1268a	4.34	0.097
miR-3185	4.27	0.077
miR-15a-5p	3.89	0.031
miR-21-5p	3.76	0.089
miR-183-5p	3.04	0.049
miR-132-3p	2.88	0.079
miR-877	2.78	0.030
miR-31-5p	2.65	0.022

腎癌組織由来エクソソーム内包 miRNA の中で正常組織由来エクソソーム内包 miRNA と比較して有意に発現上昇している miRNA 候補と腎癌患者尿中に健常者と比較して有意に発現上昇している miRNA 候補に共通した miRNA 候補を絞れず、現在さらに検討を進めている段階である。

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

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