

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390247

研究課題名（和文）

Exosome 中の microRNA を標的とした消化器癌の新規診断・治療法の開発

研究課題名（英文）

Clinical significance of serum exosomal micro RNA in human esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20240905

研究成果の概要（和文）：

近年、exosome を介した microRNA の移動・運搬による細胞間および臓器間の機能制御といった新たなメカニズムが示唆されている。食道癌/非癌症例について exosome 中の miR-21 の発現を比較したところ、食道癌の群で発現が有意に高かった。また、進行度の高い症例で miR-21 の発現が高値であった。血清から抽出した exosome 中の miR-21 の発現は食道癌において高く、この解析手法は食道癌の診断に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Exosomes are 40-nm to 100-nm membrane vesicles that are secreted by various cells, and they play a major role in cell-cell communication. The expression levels of exosomal miR-21 were significantly higher in patients with ESCC than those with benign diseases. Exosomal miR-21 was positively correlated with tumor progression and aggressiveness, suggesting that it may be a useful target for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：食道癌・miR・miRNA

1. 研究開始当初の背景

Exosome は生体内および培養液中のほとんどの細胞から分泌される 40-100 nm の膜小胞である。興味深いことに、microRNA は、例えば癌細胞では exosome に封入されて細胞外に

分泌され血液等の体液中を循環していることが分かっている。Exosome が内包する miRNA は、exosome の細胞間輸送機能により他の細胞へ運搬/伝達され、転写後遺伝子調節に働くことが出来る。我々は、これまで食

道扁平上皮癌において miR-21 が細胞増殖と浸潤を調整することを明らかにしている。また、血清中の miR-21 の発現は ESCC 症例で有意に高く、miR-21 が ESCC における有用なバイオマーカーになりうる可能性があることを示している。そこで今回我々は、食道扁平上皮癌において生体内に存在する exosome が内包する small RNA のうち、miR-21 が高い発現を認めると仮定した。食道癌症例において組織、血清内で高発現する miR-21 が、細胞間連絡を受けるため exosome に内包されて循環を行う機能が存在すれば、exosome を抽出し内包する miR-21 の発現を解析することでより特異的で検出率の高いバイオマーカーとしての意義をもつのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、食道扁平上皮癌の血清中に存在する exosome とその中に内包する microRNA の意義を明らかにすることを目的とする。食道癌組織あるいは血清において miR-21 の高発現を報告したが、食道癌患者の血清中のエクソソーム中においても miR-21 は高発現であるという作業仮説をたて検証を行う。具体的には、食道癌症例および対照症例の血清から exosome を採集し、さらに exosome から RT-PCR を用いて microRNA を抽出してその発現プロファイルを解析する。特に、食道癌患者で高発現の miR-21 について検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 患者検体を用いた研究に関しては、熊本大学生命科学研究部の倫理委員会の承認を経た後に実施した(倫理第 560 号)。2009 年から 2011 年までに熊本大学医学部附属病院消化器外科で手術を受けた食道扁平上皮癌患者及び同時期の非癌患者(無症候性胆石症やヘルニアなどの良性疾患)にインフォームドコンセントを行い、入院時の採血から血清を採取した。そのうち、術前治療が行われていない癌症例 51 症例と非癌症例 41 例を本研究の対象とし、実験時まで -80°C で保管した。

(2) 血清からの exosome の抽出：
血清から exosome を抽出する際は、exosome 抽出試薬である ExoQuick Exosome Precipitation Solution (System Biosciences, Mountain View, CA)を用いた。血清から細胞片や微細な浮遊物を除去するため 3000g 15 分遠心分離を行い、さらに径 $0.45\ \mu\text{m}$ の PVDF filter (Millipore, Billerica, MA)を通して濾過を施行した。濾過した上澄みに ExoQuick を加え -20°C で 12 時間静置の後、1500g 30 分の遠心分離で exosome をペレット状にして収集し、 $20\ \mu\text{l}$ の phosphate-buffered saline (PBS)を加えて溶液を作成した。Exosome の蛋白としての

濃度は、micro BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific KK, Tokyo, Japan)を用いて評価した。

(3) 電子顕微鏡による exosome の観察：
サンプルは HEPES バッファーで希釈した。パラフィルムに試料滴を 1 滴載せ、グリッドを 10 秒接触させた。グリッド上の余分な水分を除去した後グリッドを 2%酢酸ウラニル水溶液、または 2%リンタングステン酸水溶液の液滴に約 5 秒間接触させ、余分な水分をろ紙で除去した。数分間、自然乾燥し、JEM-1200EX で観察を行った。

(4) Western blot 法：

6well plate に培養した細胞を PBS で 2 回洗浄し、溶解バッファー[25mM Tris-HCl (pH 7.4) , 100 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1mM Na₃VO₄, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride]を用いて細胞を溶解した。その上清サンプルを 10%アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、ニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad) に転写した。5%スキムミルクを加えた 0.1%Tween 20-TBS 溶液を用いて 4°C で 12 時間ブロッキングした。一次抗体はマウス抗 CD-63 抗体 (1:2000, BD Transduction Laboratories, USA)およびラビット β -actin 抗体 (1:2000, Sigma-Aldrich, USA)を用い、二次抗体は HRP 標的抗マウス IgG 抗体、ラビット IgG 抗体 (Amersham Bioscience) を用いた。抗体希釈には Can Get Signal (TOYOBO, Japan) を使用し、検出には ECL Detection System (GE Healthcare) で行った。

(5) exosome 中の small RNA の抽出：
新鮮凍結組織、細胞株から RNA を抽出する際には、mirVana microRNA isolation kit (Ambion) を用い、protocol に従って total RNA を抽出した。すべての RNA サンプルは -80°C で保存した。抽出した RNA サンプルの純度と濃度は NanoDrop ND-1000 system (Nanodrop, Wilmington, DE)を用いて定量化し、RNA の quality は Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて評価した。

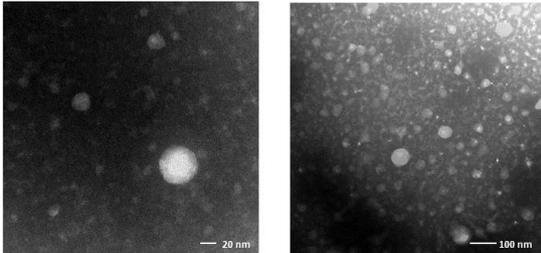
(6) 定量的 real-time PCR 法：
microRNA の定量 real-time PCR には、Taqman microRNA assay (Applied Biosystems)を用いた。Total RNA 10ng で reverse transcription (RT) を行った後に、LigtCycler 480 System II (Roche Diagnostics, USA)を用いて PCR を行った。PCR 反応は、 95°C 10 分間ののち、 95°C 30 秒間、 58°C 30 秒間で 45 サイクル行った。miR-16 を内在性コントロールとして 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ 法で比

較定量した。

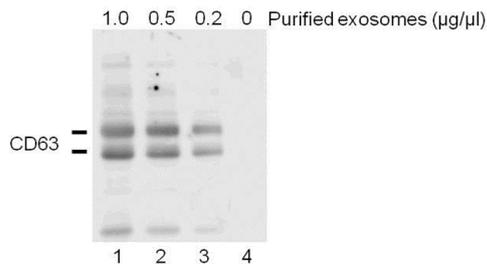
4. 研究成果

(1) 透過性電子顕微鏡とウェスタンブロット法による血清内 exosome の確認：

血清からの exosome 抽出について、透過型電子顕微鏡 (TEM) で exosome の確認を、ウェスタンブロット法で蛋白としての存在確認を行った。TEM による観察は、exosome 抽出前後それぞれの血清で行った。血清中の exosome は直径 20~100nm の小嚢胞として観察された。



ウェスタンブロット法は exosome の表面抗体の一つである CD63 を用いて行った。4 種類の exosome の濃度に比例し、蛋白の発現を確認することが可能であった。



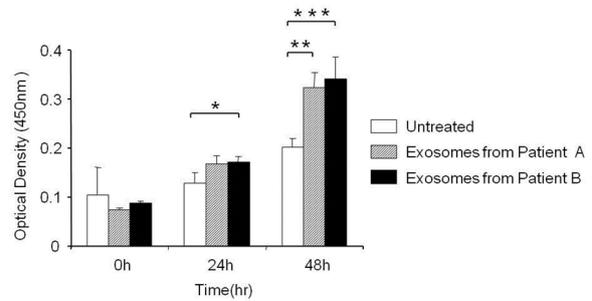
(2) exosome 中の microRNA を含む small RNA の解析：

血清から exosome 由来の microRNA を抽出することは、本研究において重要な行程の一つであった。血清から exosome 抽出試薬を用いて exosome を抽出した後、miRvana miR 抽出キットを用いて濃縮 exosome 溶液からさらに exosome 由来の microRNA を抽出した。抽出した small RNA を Bioanalyzer を用いて解析したところ、25 nucleotide-long small RNA の高値が確認され、18S と 28S ribosom 由来の RNA は殆ど検出されなかった。これは、exosome 内の small RNA に microRNA が豊富に含まれていることを示す。この結果によって、血清中の exosome から microRNA をより特異的に抽出できたことを確認した。

(3) 血清 exosome による癌細胞の増殖に及ぼす影響：

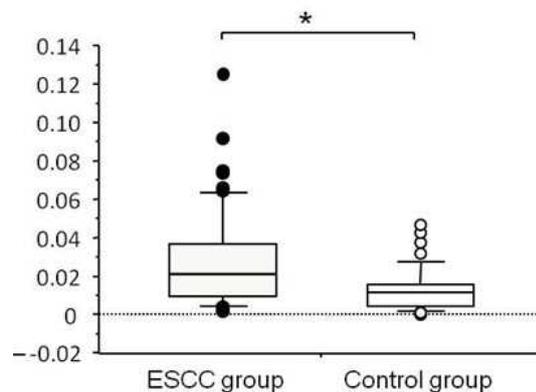
次に、食道癌患者の血清から抽出した exosome が実際に食道癌細胞に影響を及ぼすかどうかを検証した。食道癌細胞である TE-1

細胞株に異なる食道癌患者 2 例から抽出した血清由来の exosome をそれぞれ加えた群と加えない control 群で細胞増殖の比較を行った。細胞増殖は 24 時間後には exosome 付加群で高い傾向を認め、48 時間後には有意に高い増殖を認めた。この結果から、血清 exosome が食道癌細胞の生物活性に関与することが示唆された。



(4) 食道扁平上皮癌患者血清の exosomal miR-21 の発現：

血清サンプルは、食道扁平上皮癌の診断で治療前の患者 51 例と、同時期の無症候性胆嚢結石症や腹壁癒痕ヘルニアといった非癌症例 41 例(対照群)から採取した。年齢、性別、血液検査における CRP 値は 2 群間で有意に異なった。各サンプルから exoquick を用いて exosome を抽出し、さらに miRvana microRNA isolation system を用いて exosomal microRNA を抽出した。抽出した microRNA に対し、miR-21 を target とした定量的 RT-PCR を施行した。尚、miR-16 を内在性コントロールとして 2- $\Delta\Delta$ CT 法で比較定量した。miR-21 の発現は exosome を抽出した血清と比べ exosome が有意に高値であった。食道扁平上皮癌患者の血清から抽出した exosome 由来の miR-21 の発現は、対照群と比較して有意に高値であった (P=0.0009)。



(5) 食道扁平上皮癌患者血清における exosome 中の miR-21 の発現と臨床病理学的因子の相関：

食道扁平上皮癌患者 51 例に関して、miR-21

の発現の中央値で2群に分け、臨床病理学的因子と miR-21 発現の相関について解析を行った。年齢の中央値は 68.0±7.465 才であった。miR-21 の高発現群において、患者の75%が男性だった。miR-21 低発現群では92.6%が男性であった。年齢が68才以上の患者は高発現群で有意に高かった。臨床病理学的評価として、腫瘍因子は、T3/4 症例は高発現で有意に高かった(80.8% vs. 56%; P = 0.0422)。術前診断でのリンパ節転移陽性率は、高発現群で80.8%、低発現群で68%であった。遠隔転移陽性率は、高発現群により多く認めた(30.8% vs. 12%; P = 0.0410)。clinical Stage III/IVの症例は、高発現群で75%、低発現群で60.9%であった。以上の結果より、食道癌症例においてmiR-21の高発現と高年齢、Tstage進行例、リンパ節転移陽性、遠隔転移、cStage進行例とが有意な相関を示すことが確認された。

今回我々は食道癌症例において、治療前の血清から抽出した exosome が内包する miR-21 の発現が非癌症例と比べ高いことを示した。Exosome 由来の miR-21 は臨床病理学的因子と関連しており、癌診療の診断・治療の新たな標的遺伝子となりえる。

今後、血液をはじめ比較的容易に確保できる体液検体から exosome を分離し、その中に存在する microRNA と種々の疾患との関連性が明らかにされ、幅広く一般臨床に応用される可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 189 件)

1. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H.
「Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 in human esophageal squamous cell carcinoma, as a clinical biomarker」
Cancer ; 119:1159-1167, 2013 査読有 DOI:10.1002/cncr.27895.
2. Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Kamohara H, Baba H, Mimori K
「Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in esophageal squamous cell carcinoma」
Br J Cancer ; 106:182-188, 2012 査読有 DOI: 10.1038/bjc.2011.509.
3. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M,

Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H:
「Micro RNA- 200b regulates cell proliferation, invasion and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma. 」

Ann Surg Oncol 19 Suppl 3:656- 64 2012 査読有

DOI: 10.1245/s10434-012-2217-6.

[学会発表] (計 677 件)

1. 田中洋平、蒲原英伸、澤山 浩、志垣博信、岡部弘尚、渡邊雅之、馬場秀夫
「食道癌における血清オキソノーム中の microRNA 発現の検討～biomarker としての可能性～」
2012年10月26日、第50回日本癌治療学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 田中洋平、蒲原英伸、蔵重淳二、渡邊雅之、馬場秀夫
「食道癌における血清エキソソームが内包する microRNA～バイオマーカーとしての検討～」
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月21日 ロイトン札幌 (北海道)
3. 田中洋平、蒲原英伸、澤山 浩、志垣博信、美馬浩介、蔵重淳二、岡部弘尚、渡邊雅之、馬場秀夫
「食道癌患者と非癌患者における血清エキソソーム中の microRNA 発現の比較検討」、2012年7月20日、第67回日本消化器外科学会、富山県民会館 (富山県)
4. 田中洋平、渡邊雅之、蒲原英伸、志垣博信、澤山浩、蔵重淳二、木下浩一、齋藤誠也、岡部弘尚、長井洋平、井田智、石本崇胤、岩槻政晃、馬場秀夫
「食道癌患者と非癌患者の血清中に存在するエキソソームの microRNA 発現の比較検討」
2012年4月13日、第112回日本外科学会定期学術集会、幕張メッセ (千葉県)
5. Tanaka Y, Watanabe M, Kamohara H, Kurashige J, Mima K, Okabe H, Baba H
「The expression of exosomal microRNA in serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma.」
2012年4月3日、AACR Annual Meeting 2012, McCormick Place West (アメリカ・シカゴ)
6. 岩槻政晃、三森功士、渡邊雅之、深川剛生、森 正樹、馬場秀夫 「胃癌転移を制御する骨髄中新規 microRNA、遺伝子の同定」
JDDW2010 2010年10月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20240905

(2) 研究分担者

林 尚子 (HAYASHI NAKO)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：20452899

渡邊 雅之 (WATANABE MASAYUKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：80254639