

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590703

研究課題名(和文)エクソソーム由来microRNA解析による胃癌転移予測マーカーの開発

研究課題名(英文)Exosomal microRNAs as diagnostic biomarkers in metastatic gastric cancer

研究代表者

大島 啓一 (Ohshima, Keiichi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：10399587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞が分泌する小胞(エクソソーム)中に含まれるmicroRNAならびにタンパク質を分析対象とした血液中で測定可能な新しい腫瘍マーカーまたはバイオマーカーの開発を目的とした。胃癌、十二指腸癌、膵癌等、消化器癌の細胞株を主に用いて、マイクロアレイによるエクソソーム中microRNAの網羅的な解析、ならびに質量分析装置によるエクソソーム中タンパク質の同定を行った。その結果、スキルス胃癌と膵癌にそれぞれ特異的なエクソソームmicroRNA群の発見、さらに高転移性十二指腸癌と高転移性膵癌細胞株にそれぞれ特異的なエクソソームタンパク質として、PABP1およびEps8を見出した。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small vesicles secreted from cells that transport their embedded molecules by a kind of bidirectional exocytosis- and endocytosis-like pathways. Expression patterns of exosomal molecules such as proteins and RNAs can be indicative of cell type since their signature is thought to be unique among cells.

Using human cancer cell lines, we have conducted profiling of exosomal microRNAs and proteins using microarray and mass spectrometry. As a result, specific microRNA profiles were found in exosomes derived from scirrhous type gastric and metastatic pancreatic cancer cells, respectively. In addition, a comparative proteome analysis identified exosomal proteins with metastatic marker potential such as polyadenylate binding protein 1 (PABP1) for duodenal cancer and epidermal growth factor receptor pathway substrate (Eps8) for pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：エクソソーム 腫瘍マーカー microRNA セクレトーム プロテオミクス マイクロアレイ 培養上清 質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 血中腫瘍マーカーの開発はその簡便性や低浸潤性により、癌の診断学に対して多大な期待を示す。循環血液や尿等の体液中における発見により、microRNA (マイクロRNA、miRNA) は体液中の腫瘍マーカー・バイオマーカーとなる可能性がある。microRNA が体液中で安定に検出される理由は、細胞から分泌される小胞の一種(エクソソーム、exosome) に封入されることで、酵素からの分解を受けないためと言われる。エクソソームは培養細胞の上清液にも存在することが知られ、我々は培養細胞のセクレトーム (secretome, 細胞が分泌する物質の総体) 解析を基盤手法として上清液中の microRNA を網羅的解析した結果、胃癌高転移細胞株 AZ-P7a において let-7 microRNA family がエクソソームを介して特異的に細胞外に放出することを見出した。さらに細胞内外画分では異なる microRNA プロファイリングを認めたことは、組織分析によりマーカー候補となった microRNA が必ずしも血清等の体液中で検出されないことを示唆した。

(2) 我々は microRNA に加えて培養上清液中のプロテオーム解析により、肺小細胞癌細胞株からニューロテンシン前駆体やユビキチン等のタンパク質やペプチドを同定してきており (Ogura S, Ohshima K *et al.* *Proteomics Clinical Application* 2008)、ニューロテンシン前駆体については、ELISA の確立を行い、腫瘍マーカーとしての有用性について検討を行っているところである。培養細胞の培養上清液を腫瘍マーカー探索に用いる理由は、(1) 生体試料では食事や環境的变化により腫瘍非依存的な分子の発現や状態変化が起こること、(2) 37 °C で培養した上清液から検出される物質は生体内で安定に存在する可能性があること、及び(3) 試料の入手ならびに大量調製の容易性などが挙げられる。我々はこうした培養細胞のセクレトーム解析を基盤技術として、臨床応用可能な血中腫瘍マーカーの開発を目指して研究中である。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞株の培養上清液のセクレトーム解析を基盤手法として、培養細胞の上清液中に含まれる microRNA やタンパク質の解析から得られる知見をもとに、新しい血中腫瘍マーカーの開発を目指す。検討項目は、let-7 microRNA family が胃癌の転移予測マーカーとして臨床応用への可能性についての検証、網羅的解析とデータマイニングにより、培養細胞上清中エクソソーム画分における microRNA やタンパク質を同定し、新たなマーカー候補を見出すこと、以上 2 つから構成される。

3. 研究の方法

本研究の方法は、培養細胞の上清中に含ま

れるエクソソームの回収と、それに続くエクソソーム中に含まれる分析方法は、対象別に microRNA とタンパク質の 2 つに大きく分けられる。

(1) エクソソームの回収

分析対象とする細胞株

胃癌、膵癌、大腸癌、肺癌、乳癌等の癌細胞株を用いた。細胞培養は 10%血清含有培地で 48 時間行った。ウシ胎児血清(FBS)は予め超遠心処理により FBS 由来のエクソソーム画分を除去した後、培養に使用した。

上清液の回収

48 時間培養後の上清液は細胞や残骸等を遠心分離により除去した後、回収した。

上清液中のエクソソーム画分の回収

上清液をさらに超遠心分離処理 (100,000 × g, 1 h) した沈渣をエクソソーム画分とした。

(2) エクソソーム中の microRNA の解析

ヒトでは 2009 年 9 月までに 894 種の microRNA が同定されているが、本研究ではその中から腫瘍マーカー候補となる microRNA を見つけ出す手段として、網羅的解析を可能にするマイクロアレイを用いた。有意差を認めた microRNA については、個々の存在確認をリアルタイム RT-PCR で行った。

マイクロアレイによる網羅的解析

培養上清液またはエクソソーム画分から抽出した microRNA を含む total RNA について、miRNA 発現解析用アレイ (human miRNA microarray, Agilent) を用いたマイクロアレイ手法により試料中の microRNA 含有量を網羅的に求めた。データマイニングは統計解析ソフトウェア GeneSpring (Agilent) を用いて行い、腫瘍細胞株間のデータ比較からマーカー候補となる microRNA を抽出した。

リアルタイム RT-PCR による確認

マイクロアレイ実験結果のデータマイニングにより抽出された個々の microRNA について、エクソソーム画分中の存在量を定量 RT-PCR 装置 (Applied Biosystems 7900 HT) を用いて求めた。

(3) エクソソーム中のタンパク質の解析

我々による HPLC と質量分析による同定手法 (Ogura S, Ohshima K *et al.* *Proteomics Clinical Application* 2008) を用いて培養上清液及びエクソソーム画分に含まれるタンパク質解析を行った。

質量分析を用いたタンパク質・ペプチドの同定

培養上清液またはエクソソーム画分抽出物を HPLC により精製した後、NanoLC-リニアトランプ-TOF 質量分析装置 (Hitachi NanoFrontier) を用いて、タンパク質の同定率を行った。

ウェスタンブロットングによる発現確認

同定されたタンパク質について培養上清液

またはエクソソーム画分抽出物中の存在確認を入手可能な市販抗体を用いて行った。

4. 研究成果

本研究の成果は、培養癌細胞上清液中のエクソソーム画分の網羅的解析により、癌特異的な microRNA およびタンパク質を同定したことである。これらの発見は、腫瘍あるいはバイオマーカーの開発に繋がるものとなる。なお、本研究期間内に、AZ-521 細胞株が胃癌から十二指腸癌細胞株へ変更された情報 (https://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?ID=237#) を細胞供給元 (独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク) から得られたことにより、let-7 microRNA family と転移性胃癌の検証実験は中止した。本研究成果について、エクソソーム中の分析対象成分別、すなわち、microRNA とタンパク質に区別し、以下記述した。

(1) エクソソーム中の microRNA の解析

マイクロアレイを用いたエクソソーム中の microRNA に対する網羅的解析により、スキルス胃癌と膵癌細胞株由来エクソソーム中で、それぞれ特異的に含まれる microRNA を認めた。

スキルス胃癌細胞株における microRNA 群

スキルス胃癌細胞株 (柳原五吉先生、安田女子大学、現国立がん研究センターより一部提供) 13 種を含む胃癌細胞株 26 種のエクソソームにおける microRNA の同定とクラスタリング分析を行った結果、スキルス胃癌に特異的な microRNA 群の存在を認めた。この結果は、難治性スキルス胃癌に対するマーカーとなる可能性を示唆するものである。

膵癌細胞株における miR-223 の特異性

膵癌、胃癌、大腸癌、乳癌等様々な癌細胞株 99 種のエクソソームにおける microRNA 解析を行い、その存在量をヒートマップ上で示した結果、膵癌で特異性の高い microRNA 群を認めた (図 1)。

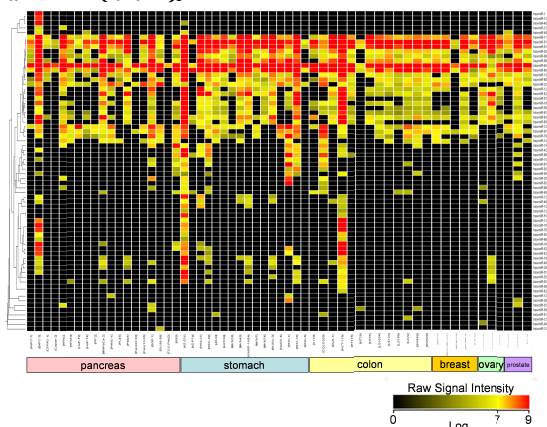


図 1 癌細胞株 99 種におけるエクソソーム画分中の microRNA 分布

その後の検討により、miR-223 が他の臓器由来の癌細胞に比べて、エクソソーム中での含有量が高い傾向を示した。この結果は、

miR-223 が膵癌腫瘍マーカー候補となることを示唆した。

(2) エクソソーム中のタンパク質の解析

プロテオーム解析により、十二指腸癌と膵癌細胞株に由来するエクソソーム中でそれぞれ特異的に含まれるタンパク質 polyadenylate binding protein 1 (PABP1) 及び epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) を認めた。

高転移性十二指腸癌細胞株エクソソームにおける PABP1 の特異性

十二指腸癌細胞株 AZ-521 とその高転移性株 AZ-P7a 細胞株に由来するエクソソームのプロテオーム解析において、PABP1 が AZ-521 細胞に比べて AZ-P7a 細胞エクソソームに多く存在することを認めた (図 2)。一方、細胞内画分での PABP1 発現は両細胞に違いは認められなかった。さらに、PABP1 は消化器系癌をはじめ他の細胞株のエクソソーム中での存在量は AZ-521 細胞同様、極めて少なかった。

また、PABP1 の過剰発現安定株を両細胞株に対して作製したところ、AZ-P7a 細胞株でのみ、エクソソーム中への PABP1 放出が確認された。一方、green fluorescent protein (GFP) の過剰発現安定株では、両細胞株ともエクソソーム中への GFP の放出が認められた。従って、PABP1 のエクソソームを介した細胞外への放出は AZ-P7a 細胞特異的であり、かつ AZ-P7a 細胞におけるタンパク質の放出には、何らかの選別が行われている可能性を示した。以上の結果は、PABP1 が転移性十二指腸癌に対するバイオマーカーとなり得ることを示唆するものである。

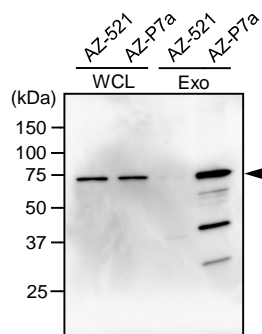


図 2 AZ-521 及び AZ-P7a 細胞株における細胞内(WCL)とエクソソーム(Exo)画分における PABP1 存在レベル

悪性度の高い膵癌細胞株エクソソームにおける Eps8 の特異性

肝転移巣及び原発巣からそれぞれ樹立された膵癌細胞株、SU.86.86 および MiAPaca-2 に由来するエクソソームのプロテオーム解析を行い、SU.86.86 に特異的に同定されたタンパク質の中で、同定されたフラグメント数が最も高い Eps8 に注目し、膵癌をはじめとした他の細胞株に由来するエクソソーム中のタンパク質レベルをウェスタンブロット

イングにより検討した。その結果、検討した 35 株における Eps8 の存在は、膵癌細胞 8 株と大腸癌細胞 1 株及び胃癌細胞株 1 株に認められた(表 1)。特に膵癌では、肝転移と腹水由来細胞株に存在し、原発巣由来の細胞株では認められなかった。

また、SU.86.86、HuP-T4、MiAPaca-2 及び BxPC-3 細胞に対する悪性度を走化性(migration)ならびに浸潤性(invasion)を指標に xCelligence (Roche)を用いて検討した結果、肝転移巣由来株 SU.86.86 が他の 3 細胞株に対して悪性度が有意に高かった ($p < 0.001$)。また、腹水由来細胞株 HuP-T4 は、原発巣由来株 MiAPaca-2 及び BxPC-3 に対して高い有意性を示した ($p < 0.001$)。以上の結果は、エクソソーム中における Eps8 量と細胞の悪性度との間に強い相関性を認め、Eps8 が膵癌の悪性度を予測するバイオマーカーとなり得ることを示唆するものである。

表 1 癌細胞株におけるエクソソーム画分における Eps8 存在レベル

Tissue	Derivation	Cell line	Exosomal Eps8 by WB	Relative Eps8 amount
pancreas	liver metastasis	SU.86.86	+++	1.000
	liver metastasis	CFPAC-1	+	0.492
	liver metastasis	PK-8	+	0.293
	liver metastasis	KP-3	+	0.838
	liver metastasis	PK-45H	+	0.940
	liver metastasis	PK-1	-	0.062
	liver metastasis	KLM-1	-	0.063
	liver metastasis	PK-59	-	0.159
	ascites	HuP-T3	++	0.342
	ascites	HuP-T4	+	0.973
	ascites	HPAFII	+	1.254
	primary tumor	MIAPaCa-2	-	0.052
	primary tumor	BxPC-3	-	0.352
	primary tumor	Panc10.05	-	0.240
primary tumor	PK-45P	-	0.402	
primary tumor	PANC-1	-	0.326	
primary tumor	PSN1	-	1.000	
Stomach		KATOIII	-	0.344
		SNU-1	-	0.145
		NUGC-4	+	2.604
		NUGC-3	-	0.071
		SNU-16	-	0.191
		HGC27	-	0.148
lung		SBC-1	-	0.706
		SBC-3	-	0.022
		NCH-H1581	-	0.056
		NCH-H1650	-	0.141
		NCH-H1770	-	0.090
		SW1271	-	0.215
Colon		COR-L23	-	0.044
		HT115	-	0.163
		CoLo201	-	0.437
		CoLo205	-	0.510
		DLD-1	-	0.184
		LoVo	+	3.514

グレー表示は、細胞の悪性度を走化性(migration)及び浸潤性(invasion)を指標に xCelligence を用いて検討した膵癌細胞株 4 種である(本文参照)。

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 8 件)

Terashima M, Tanabe K, Yoshida M, Kawahira H, Inada T, Okabe H, Urushihara T, Kawashima Y, Fukushima N, Nakada K. Postgastrectomy Syndrome Assessment Scale (PGSAS)-45 and Changes in Body Weight are Useful Tools for Evaluation of

Reconstruction Methods Following Distal Gastrectomy. Ann. Surg. Oncol. 21, Suppl. 3, 370-378 (2014).

DOI: 10.1245/s10434-014-3583-z

Hatakeyama K, Wakabayashi-Nakao K, Ohshima K, Sakura N, Yamaguchi K, Mochizuki T. Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. BMC Res. Notes. 6, 381 (2013).

DOI: 10.1186/1756-0500-6-381

Hatakeyama K, Fukuda Y, Ohshima K, Terashima M, Yamaguchi K, Mochizuki T. Placenta-specific novel splice variants of Rho GDP dissociation inhibitor are highly expressed in cancerous cells. BMC Res. Notes. 5, 666 (2012).

DOI: 10.1186/1756-0500-5-666

Wakabayashi-Nakao K, Maruyama K, Ishii H, Muramatsu K, Hatakeyama K, Ohshima K, Ogura S, Nakajima T, Yamaguchi K, Mochizuki T. Investigation of proNT/NMN secretion from small cell lung carcinoma cells using a mouse xenograft model. Oncol. Rep. 28, 1181-1186 (2012).

DOI: 10.3892/or.2012.1926

Ohshima K, Takeda S, Hirose M, Akiyama Y, Iguchi K, Hoshino M, Yamaguchi K, Mochizuki T. Structure-function relationship of the nuclear localization signal sequence of parathyroid hormone-related protein. Biomed. Res. 33, 191-199 (2012). <http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.33.191>

Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, Katai H, Sano T, Imamura H, Sasako M; ACTS-GC Group. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. Clin. Cancer Res. 18, 5992-6000 (2012). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1318

Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Tokunaga M, Sasaki K, Terashima M. Intramucosal gastric cancer with fifteen metastatic lymph nodes: report of a case. Hepatogastroenterology. 59, 2233-2237 (2012).

DOI: 10.5754/hge10102

Tokunaga M, Terashima M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Yasui H, Boku N. Survival benefit of palliative gastrectomy in gastric cancer patients with peritoneal metastasis.

〔学会発表〕(計3件)

大島啓一、膵がん細胞エクソソームに含まれる Eps8 タンパク質、第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月3日、横浜

大島啓一、癌細胞から放出されるエクソソーム中のプロテオーム解析、第71回日本癌学会学術総会、平成24年9月21日、札幌

大島啓一、胃癌細胞株が放出するエクソソーム中のプロテオーム解析、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月4日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 啓一 (OHSHIMA, Keiichi)
静岡県立静岡がんセンター (研究所)・その他部局等・その他
研究者番号: 10399587

(2) 研究分担者

寺島 雅典 (Terashima, Masanori)
静岡県立静岡がんセンター (研究所)・その他部局等・その他
研究者番号: 40197794

図1 癌細胞株99種におけるエクソソーム画分中の
microRNA 分布