

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591179

研究課題名(和文) 肺癌の特異的血清およびエクソソーム由来マイクロRNAの同定および個別化治療の応用

研究課題名(英文) Identification of serum exosomal microRNA in lung cancer

研究代表者

清家 正博 (SEIKE, MASAHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30366687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌特異的な血清エクソソーム由来マイクロRNA (miRNA) を同定することを目的とする。非小細胞肺癌細胞(NSCLC)20株の細胞培養上清中のエクソソームからの網羅的miRNA 発現解析にて、17のmiRNAが肺癌細胞上清中エクソソーム内で有意に発現が上昇していた。NSCLC患者20例の血清中のエクソソーム由来miRNA網羅的発現解析にて、肺癌患者で有意に発現上昇している13のmiRNAを同定した。このうち、miR-30c発現上昇を共通に認め、腺癌、特にEGFR陽性肺腺癌において発現が高かった。血清エクソソームmiR-30cは、NSCLC、特に肺腺癌における新規バイオマーカーになり得る。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify a unique serum exosomal microRNAs (miRNAs) in lung cancer. First, we analyzed serum exosomal miRNA expression profiles of culture supernatant from 20 non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and normal epithelial cells. Exosomes were isolated from serum using Exoquick Exosome solution. The presence of exosomes was performed with CD9/CD63 exosome markers. MiRNA profiling was performed by miRNA microarray. Seventeen miRNAs were significantly overexpressed in supernatant from NSCLC cells. We also performed serum exosomal miRNA profiling using serum samples from 20 NSCLC patients. We found that thirteen serum exosomal miRNAs were significantly upregulated in NSCLC patients. Notably, we found that miR-30c expression was significantly higher in both serum and cell supernatant samples as well as cell samples in NSCLC, especially in lung adenocarcinoma. The serum exosomal miR-30c may be useful as novel biomarker in NSCLC, especially in lung adenocarcinoma.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 マイクロRNA エクソソーム 血清

### 1. 研究開始当初の背景

MiRNAは、低分子RNAの一種で転写後修飾調節機構を有し、癌抑制遺伝子や癌遺伝子の発現を制御し、癌の腫瘍形成や薬剤耐性等の生物学的なプロセスにおいて重要な役割を担うことが報告されている。申請者らは、これまでに肺癌に関わるmiRNAを同定し、以下の研究成果を得ている。

- (1) 肺癌組織を用いた解析で、肺腺癌の予後と相関するmiRNA (miR-155, let-7a) の同定に成功した (Yanaiharu N, Seike M, et al. Cancer Cell. 2006)。
- (2) 肺癌細胞株を用いた解析で、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤; EGFR-TKI 感受性に miR-21 が関与していることを明らかにし、EGFR-TKI 耐性化の克服に関する新たな知見を報告した (Seike M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。
- (3) 肺癌細胞株 30 株パネルの抗癌剤感受性データベースを構築し、各抗癌剤や分子標的剤の感受性に関わる miRNA を同定した (平成 21-23 年度基盤研究 C)

これらの研究成果から、miRNA 発現異常が肺癌の診断マーカー/予後因子/治療標的になりえることを見出したが、次なる研究戦略として求められることは、血清などの肺癌患者の体液中に存在する分泌型 miRNA の解明である。さらに、細胞間コミュニケーションの媒介役として様々な生理現象や疾患に関わるとされる膜小胞エクソソームが、近年、癌細胞からも分泌されることが報告された。タンパク質のみならず miRNA も運搬することが報告され、抗腫瘍免疫応答の制御等発癌に関わることが明らかになった。このように癌細胞由来エクソソームと血中分泌型 miRNA の意義の解明は、肺癌の miRNA の真の臨床応用に向けての最終段階の研究であると考えられる。

### 2. 研究の目的

非小細胞肺癌(NSCLC) 特異的な血清マイクロ RNA (miRNA)、特にエクソソーム由来 miRNA の存在を解明し、肺癌の新規血清バイオマーカーとして臨床応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) エクソソーム由来 miRNA 同定法の確立
- (2) NSCLC 細胞株 20 株培養上清からのエクソソーム由来 miRNA 網羅的発現解析
- (3) NSCLC 患者の血清エクソソーム由来の miRNA 網羅的発現解析
- (4) NSCLC 細胞株/培養上清/血清の miRNA 解析の対比による NSCLC 特異的な血清エクソソーム miRNA の同定

### 4. 研究成果

- (1) エクソソーム由来 miRNA 同定法の確立  
NSCLC 細胞株上清または血清からエクソソーム分画のみを抽出し、miRNA を精製する方法の最適化を検討した。細胞の条件設定に加え、超遠心法、複数の Exosome 抽出キットを用いた検討で、ExoQuick Exosome precipitation solution からのエクソソーム分画抽出と miRNA 精製の最適化に成功した。エクソソーム分画は、CD9/CD63 マーカーにて検証し、細胞株上清または血清からの再現性のあるエクソソーム分画の抽出に成功した(図 1)。

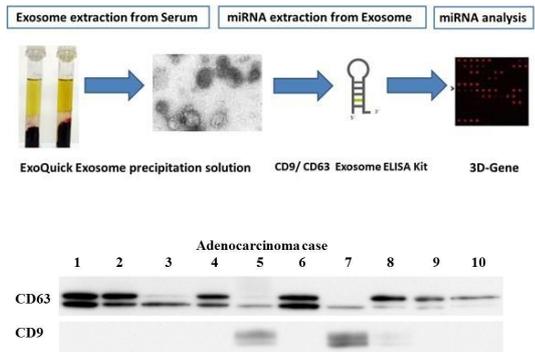


図 1 エクソソーム miRNA 発現解析方法と CD9/CD63 マーカーによるエクソソーム分画の検証

- (2) NSCLC 細胞株 20 株培養上清を用いた miRNA 網羅的発現解析  
肺腺癌細胞株 11 株 (PC9, NCI-H1975, NCI-H1650, A549, LC2/ad, NCI-H441, PC14, PC3, ABC1, RERF-LC-KJ, RERF-LC-MS) と肺扁平上皮癌細胞株 9 株 (EBC1, PC1, PC10, LC1/sq, LK2, SQ5, QG56, RERF-LC-AI, LC1F) に加え、正常気管支上皮細胞 (BET-2A) を対照として培養上清中のエクソソーム由来 miRNA 網羅的発現解析を施行した。17 の miRNA が肺癌細胞株上清で有意に発現上昇を認めた(図 2)。

	Tumor Intensity	Normal Intensity	Ratio
hsa-miR-6765	297	30	9.82
hsa-miR-7977	1869	191	9.80
hsa-miR-4258	632	71	8.93
hsa-miR-92a	382	47	8.10
hsa-miR-93	99	13	7.97
hsa-miR-4443	960	128	7.48
hsa-miR-17-5p	78	11	6.93
hsa-miR-7975	2688	400	6.71
hsa-miR-3648	3831	572	6.70
hsa-miR-193b	113	18	6.28
hsa-miR-4454	10099	1616	6.25
hsa-miR-1273	90	15	6.01
hsa-miR-30c	68	12	5.81
hsa-miR-1260b	282	49	5.71
hsa-miR-6132	469	83	5.64
hsa-miR-4648	323	59	5.52
hsa-miR-204	1179	225	5.25

図 2 NSCLC 細胞株培養上清で有意に発現上昇を認めたエクソソーム miRNA

### (3) NSCLC 患者血清を用いたエクソソーム miRNA 網羅的解析

NSCLC 患者 20 例の血清中のエクソソーム由来 miRNA の網羅的発現解析を施行した。13 の miRNA が NSCLC 血清で有意に発現上昇を認めた(図 3)。

miRNA	T intensity	N intensity	Ratio	p value
hsa-miR-1915	222	34	6.46	0.015
hsa-miR-30c	409	75	5.43	0.003
hsa-miR-4730	597	111	5.32	0.000
hsa-miR-4534	619	125	4.94	0.003
hsa-miR-4271	803	169	4.75	0.001
hsa-miR-642a	1430	311	4.59	0.002
hsa-miR-652	429	97	4.42	0.001
hsa-miR-21	135	31	4.39	0.050
hsa-miR-1225	400	95	4.22	0.003
hsa-miR-4294	1832	440	4.16	0.005
hsa-miR-671	695	168	4.12	0.002
hsa-miR-6124	652	158	4.12	0.001
hsa-miR-6510	565	137	4.11	0.003

図 3 NSCLC 患者血清で有意に発現上昇を認めたエクソソーム miRNA

### (3) 血清/細胞培養上清/細胞内のエクソソーム内 miR-30c 発現の検証

細胞培養上清と血清からのエクソソーム miRNA 解析の中で、miR-30c が共通して発現上昇を認めた miRNA であった。

miR-30c の NSCLC 細胞 20 株の細胞内での miRNA の発現を qRT-PCR 法にて検討し、上清および血清の発現プロファイルとの比較検討を組織型別に行った。

miR-30c の肺癌細胞内の発現プロファイルは上清および血清の発現プロファイルと同様の傾向を示した。また、miR-30c の発現は腺癌、特に EGFR 陽性肺腺癌において発現が高かった(図 4)。

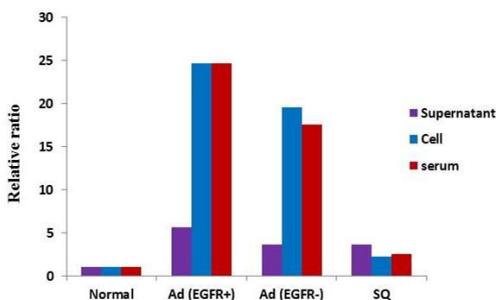


図 4 肺腺癌、EGFR 陽性肺腺癌のエクソソーム内における miR-30c の高発現

以上の結果より、miR-30c は非小細胞肺癌、特に肺腺癌における新規の血清バイオマーカーになり得る。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kitamura K, Seike M, Okano T, Matsuda K, Miyanaga A, Mizutani H, Noro R, Minegishi Y, Kubota K, Gemma A. MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 13(2):444-53.2014

### 〔学会発表〕(計 8 件)

清家正博、肺癌における miRNA を用いた新規治療法の探索、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム、2013 年 1 月 19 日、東京。

清家正博、miRNA と肺癌、第 53 回日本呼吸器学会学術集会、2013 年 4 月 19 日 東京。

清家正博、肺癌感受性予測研究の展望 第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24 日、京都。

清家正博、MiRNA による新規肺癌治療戦略、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム、2014 年 2 月 1 日、東京。

清家正博、Omics と感受性予測研究 第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月 28 日、横浜。

清家正博、肺癌における miRNA 異常の解明と新規治療法の開発に向けた研究 第 55 回日本肺癌学会学術集会、2014 年 11 月 15 日、京都。

Seike M, MicroRNA and lung cancer 51st APSR Annual Meeting, Nov,11, 2013.Yokohama

Seike M, Kitamura K, Noro R, Soeno C, and Gemma A. MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF- $\beta$ -induced epithelial mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells. 2014 AACR Annual Meeting, April 20, 2014, San diego.

### 〔図書〕(計 1 件)

清家正博、弦間昭彦、呼吸器のバイオマーカーとしての microRNA、科学評論社、THE LUNG perspective, 22(4): 413-417, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清家正博 (SEIKE MASAHIRO)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30366687

(2) 研究分担者

弦間昭彦 (GEMMA AKIHIKO)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20234651

(3) 連携研究者

なし