

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460457

研究課題名(和文)細胞間通信を担うエクソソームとがん発症との関連解析

研究課題名(英文) Interaction analysis of plasma exosome miRNA and tumorigenesis

研究代表者

堺 明子 (SAKAI, AKIKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60205698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞から分泌されるexosomeのがん発症及び進展に及ぼす影響を解明することを目的として、担がん患者の血漿exosomeのmiRNAを解析した。具体的には膵がん特異的に発現変動するmiRNAをマイクロアレイ解析し、qRT-PCRで検証した。膵がんでのmiRNA発現亢進がみられ、悪性度の高い群のmiRNA変動が最も多かった。qRT-PCRではプラットフォームの測定原理などの違いによるconflictのため、アレイとの確実な一致は得られなかった。その大きな障壁となっているmiRNAの標準化について血漿DNAを用いた手法を試み、miRNA測定の内部標準・モニターとしての活用可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Tumors release the exosome containing microRNAs which function as a mediator of cell-cell communication to provide cancerous microenvironment near and far. We analyzed the exosome miRNAs in blood plasma of pancreatic cancer patients. Overall, miRNAs were highly expressed in cancer patients, and the number of altered expressed miRNAs was higher in malignant than in benign. Differentially expressed miRNAs by microarray analysis showed low reproducibility in qRT-PCR, reflecting imperative analytical platform differences. Though we selected seven miRNAs as candidates of pancreatic cancer occurrence, we regret to say they have little confidences. One of the crucial issue leading the conflict of inter-platform and inter-study is the absence of consensus of normalization standard for evaluating miRNA expression. We tested an idea of using circulating free DNA as some internal control of blood plasma, and found high correlation with miRNAs, which might be useful in future.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム miRNA 血漿 がん

## 1. 研究開始当初の背景

エクソソーム (exosome) は細胞内の多胞性エンドソームから産生され、細胞外に分泌される膜小胞で、直径は30nmから100nm、その内部にメッセンジャーRNA (mRNA) やマイクロRNA (miRNA) を含み、直接、あるいは血液や体液をとおして、様々な細胞間コミュニケーションをおこなっている。がんや神経疾患、免疫疾患などの領域において、exosomeの分泌は、周辺細胞をローカルかつ迅速に調節していると考えられ、数多くの研究が進められているが、中でも特に注目されているのが、がんにおけるexosomeの役割である。様々ながんにおいて、がん細胞からのexosome分泌は通常よりも増大しており、また、それらは各がん特有のmiRNAを内包していることが知られている。これら特有のmiRNAを他の細胞に伝達することで、がんは自身に有利なように周辺の微小環境を整え、血流の先の遠隔転移先の環境を変化させていると考えられる。

miRNAは、おもにタンパク質への翻訳段階で遺伝子発現を精妙にコントロールしており、各種のがんにおいても発現変動がみられることから、がんの発症や進展への寄与、及び腫瘍マーカーとしての活用という両面からの研究が進められている。

本研究では担がん患者の血漿中のexosomeを回収し、含有miRNAの定性・定量解析をおこなって、がんの発症や進展にもなる細胞間コミュニケーションの変化を追跡する。さらに、miRNA発現による悪性化を検証し、細胞内シグナルカスケードの次段階としての新たな視点から、exosomeの果たす役割を評価する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん患者の血流に乗ったexosomeが、miRNAを介してがんの発症や進展に関与している様態を解明することである。具体的には、がん特有のmiRNAの種類と、それを運搬するexosomeに関する発現様式の特長をおこなって、細胞間コミュニケーションの面から、がんの発症・進展への理解を深めることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、担がん患者の血漿から回収したexosomeについて、含有miRNAの定性・定量解析をマイクロアレイおよびリアルタイムPCRにより解析し、がんの発症や進展にもなる変動するmiRNAを特定する。さらに、周辺細胞あるいは血流を介した細胞への作用を解析して、発現変動miRNAがどのようなシグナル経路でがんの発症・進展に関与するのかを検証する。

## 1) 血漿 exosome の抽出

血漿からのExosome抽出にはExosome Isolation kit - serum and plasma (miRCURY)を使用し、miRNA抽出には、Total exosome RNA and protein isolation kit (Invitrogen)を用いた。Exosome抽出には、ExoMirキット (BiooScientific) も使用した。これは、直径30nmから100nmのexosomeを、ポアサイズ20nmおよび200nmの二重のフィルターを通すことによって捕捉するものである。exosome回収の評価を、タンパク質レベル、およびmiRNAレベルでおこなった。前者では、exosome特異的発現のCD63に対する抗体を用いたウェスタンブロットを、後者では、複数のmiRNAについてリアルタイムPCRをおこなった。なお、がん患者及び対照健常者の血漿サンプルは、岡山大学倫理委員会の承認を受け、既存試料を使用した。

## 2) 血漿 miRNA のマイクロアレイ解析

膀胱がん患者群から、特徴のある3群を選出し、コントロールの健常人1群を加えて、計4群について、miRNAのマイクロアレイ解析をおこなった。

膀胱がん患者について、PaC01:罹患後18ヶ月以内に死亡、PaC02:罹患後10年以上生存、PaC03:膀胱がん腫瘍マーカーCA19-9が基準値(37U/ml)以下、の基準を設定し、各群ごとにプールした血漿サンプルを代表検体として用いた。対照として健常人の血漿サンプルJpool1も同様に準備して、計4サンプルについて、マイクロアレイの委託解析をおこなった(東レ、3D-Gene miRNA Oligo chip)。

## 3) リアルタイム PCR 定量

血漿exosomeから抽出したmiRNAについて、リアルタイムPCRによる定量をおこなった。

まず抽出miRNAからcDNAの逆転写をおこない(Universal cDNA synthesis kit II, Exiqon)、micro RNA LNA PCR primer set (Exiqon)及びExiLent SYBR Green master mix (Exiqon)を用いて、ABI7300 Real-Time PCR SystemでリアルタイムPCRをおこなった。また、血漿DNA定量については、ヒトゲノム特有のAlu配列(short tandem repeat配列)を利用したIntra-Alu-PCR法を用いて、Power SYBR Green PCR master mixの系でおこなった。血漿miRNA抽出の確認は、血漿中で恒常的発現が認められている3種類のmiRNA(miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-423-3p)を定量し、いずれも安定して検出されることを確認した。

## 4. 研究成果

### 1) 血漿からの exosome 単離

血漿からexosomeを抽出し、Western blotでexosome抗原のテトラスパニンファミリー、CD63, CD81, CD9、およびヒートショックタ

ンパク質 HSP70 に対する抗体を用いて、回収を半定量的に確認した。血漿 Exosome 分画には各抗体の強いバンドが出現し、抽出後上清にはほとんどバンドが見られなかった。CD81 のシグナル intensity を計測し、タンパク質の量を揃えて比較したところ、抽出後上清の exosome 含有量は、exosome 分画の約 30 分の 1 であった。すなわち、遠沈分画に exosome が濃縮されていることが確認できた。

同時に肺がん細胞株 HCC15 から抽出した培養上清 exosome の Western バンドはかなり薄く、含有 exosome の量が少ないことを示した。同液量に換算して比較すると、血漿 exosome 量は、培養上清 exosome の約 1000 倍と算出された。この濃度比は、Invitrogen (Life Technology) の HP に記載されている、Hela 細胞培養上清 1ml 中の exosome 量  $4^8 \times 10^9$  個、血清 0.1ml 中の exosome 量  $1.5^3 \times 10^{11}$  個という値と一致し、exosome が順当に抽出されていることの傍証となった。

## 2) 膵がん血漿マーカー候補 miRNA の選定

血漿 miRNA について、東レ 3D-Gene® miRNA Oligo chip マイクロアレイのチップに搭載された約 2000 種類の miRNA のうち 1256 種類について、いずれかのサンプルで発現がみられた。検出された miRNA の種類は、健常者血漿が最少であり (718 種類)、がん患者血漿における miRNA の総体的な発現増加を裏付けるものであった (図 1)。膵がん 3 群のうちで、健常者の 2 倍以上の差を示した miRNA の数は、PaC01 (short-survival) で最も多く、PaC03 (low CA19-9) で最も少なかった (表 1)。また、発現変動の頻度も、他の 2 群と比べて明らかに低かった。

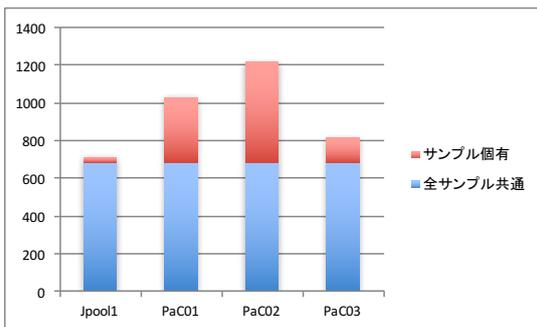


図 1 マイクロアレイによる検出 miRNA 数

表 1 膵がん各群の発現変動  
健常者の 2 倍以上の増減を示した miRNA

Sample name	No.			percentage	
	Total	UP	DOWN	UP	DOWN
PaC01	1034	136	105	13%	10%
PaC02	1222	108	114	9%	9%
PaC03	824	52	28	6%	3%

膵がん血漿のマイクロアレイ解析結果より、健常者血漿との差が大きく、膵がん各

群間での発現パターンが異なり、かつ発現量が比較的高いものを膵がん miRNA マーカー候補として選択した。7 種類の候補 (miR-16-5p、miR-223-3p、miR-451a、miR-619-5p、miR-1246、miR-1290、miR-6778) のうち、4 種類については、膵がん血清あるいは血漿における発現上昇の既報があるものであった (miR-16、miR-223、miR-1246、miR-1290)。

## 3) 発現変動 miRNA のリアルタイム PCR による検証

miRNA のマイクロアレイでの発現変動が、リアルタイム PCR 定量でも再現できるかどうかを検証した。逆転写反応コントロールとして UniSp6 RNA を spike-in し、血漿 miRNA 検出の確認には、血漿で恒常的発現が認められている 3 種類の miRNA (miR-103a-3p、miR-191-5p、miR-423-3p) をポジティブコントロールとした。

これらのポジティブコントロール miRNA を用いて、miRNA が exosome 分画かそれ以外の液性分画に含まれるかを調べたところ、血漿 miRNA はほとんど exosome 分画にあることがわかった。すなわち、血漿 12 サンプルを用いたテストで、exosome 抽出分画には各 miRNA が検出された (Ct=25-29) 一方、抽出後上清分画では、4 サンプルでわずかに検出されたのみで (Ct=34-42)、8 サンプルでは検出不可であった (各分画について等量の血漿分換算で比較)。したがって、血漿 exosome の miRNA についての解析は、全血漿 miRNA を用いた解析により達成されることがわかった。

次に、膵がんマーカー候補 7 種類の血漿 miRNA についてリアルタイム PCR による検証をおこなったが、マイクロアレイで見られた発現変動との一致率が低く、十分な再現性が得られなかった。問題のひとつは、血漿 miRNA については、確立した内部標準が存在しないことで、比較的定常的に発現している上記 miRNA や他の小分子 RNA、external に spike-in した RNA などが使われることが多い。我々も内部標準としてポジティブコントロール miRNA 等を用いて定量の標準化を試みたが、マイクロアレイの評価を裏付ける発現変動は再現されなかった。

マイクロアレイの結果をリアルタイム PCR で検証する手法においてしばしば見られる不一致は、多くの miRNA 研究における障害となっており、近年では比較実験やメタアナリシスを含めていくつかのレビューも出されている。それによると、解析プラットフォーム内での再現性はいずれも非常に高く十分なに対して、プラットフォーム間の差には相当の矛盾や不一致がみられ、その要因は、検出原理 (ハイブリダイゼーション、PCR、シーケンス) や、標準化手法を含む解析アルゴリズムの差にあると結論づけられている。このことは、いずれかの方法に真実があるというのではなく、その中から最も疾患を特徴づける miRNA のセットが得られ、かつ

再現性が高く、ハイスループットな、リキッドバイオプシーの系を確立することが肝要であることを示している。

#### 4) 血漿 miRNA 定量の標準化の試み

膵がんマーカー候補の血漿 miRNA の発現変動の検証には、効率およびコストの面からも、リアルタイム PCR 法が適していると考えられる。実際、qPCR ベースのヒト miRNA パネルを使用して発現変動のスクリーニングをおこない、その後、同じ系で検証すれば、プラットフォーム間の不一致は生じない。ただし、この系においても、miR 定量の標準化を確立することは、解析の核心となる必須要素である。

血漿には、miRNA のみならず cell-free DNA の存在も知られており、がんや炎症による増加や腫瘍部の変異反映などが注目をあつめ、リキッドバイオプシーとして様々な活用が検討されている。この circulating DNA と血漿 miRNA が同時に評価される例は少なく、それぞれの由来や消長についてはどちらも不明なところが多い。しかし、これらは互いにまったく無関係の制御下にあるとも考えにくく、ある程度の相関をもって体内を循環しているのではないかという仮定の下に、DNA を miRNA の内部標準に使用できないかどうかを提案し、小規模な実験を試みた。

まず、血漿と exosome の DNA に差があるかどうかを、それぞれから DNA を精製し定量して比較した。どちらも血漿 1ul あたり数 pg の微量であったが高い相関が見られたので ( $r=0.88$ )、以降は血漿 DNA を用いて実験を進め、血漿 DNA による血漿 miRNA の標準化を試みた。図 2 に 3 種類の miRNA、7 つのサンプルでおこなったリアルタイム PCR の結果の一例を示す：各 miRNA の標準化前の Ct 値、および血漿 DNA による標準化後の Ct 値をプロットした。この場合、DNA による標準化によって、Ct 値が増大したものが 3 サンプル（左から 3、4、7 番目）、減少したものが 1 サンプル（1 番目）、ほぼ不変が 3 サンプル（2、5、6 番目）となり、5 サンプルに関しては相対的な位置関係は変わらず、2 サンプルについてののみ（1、6 番目）順位の変化がみられた。これらの結果からすぐに DNA による標準化の妥当性を検証することはできないが、以下の知見が得られた。

1) 血漿中の miRNA と DNA 量の間にはやや強い相関が見られ ( $r=0.6\sim 0.7$ )、互いにその由来や status を解析するためのソースとなり得ると考えられる。なお、血漿 DNA の方が exosome DNA よりも高い相関を示し、より高い有用性が示唆された。

2) 調べた血漿 DNA 量は比較的正規分布に近い分布を示したが、まれに非常に高い値（血漿 1ul あたり数 ng）を示すものがあつた。このとき血漿 miRNA は、ある程度の高値を示すが、せいぜい数十倍であり、DNA 高値（数

百倍から千倍）の原因や意義は不明である。仮にこれがプレアナリティカル（採血時における溶血や細胞損傷等）な要因のためとすると、逆に血漿 DNA 計測を品質管理の手軽なモニターとして利用することも可能と考えられる。

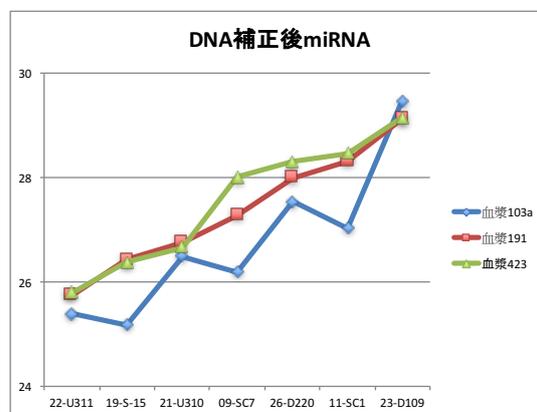
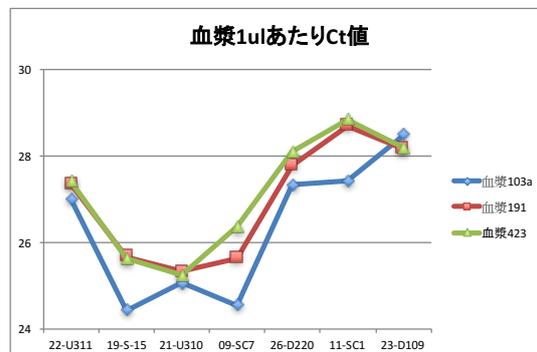


図 2 血漿 miRNA の Ct 値  
標準化前（上図）後（下図）

#### 5) 膵がん exosome miRNA とがん発症との関連について

今回、膵がんマーカー候補とした miRNA について、がん発症への関与を具体的な機序で解明するには至らなかったが、異なる病態間での変動を示した miRNA 7 種類のうち 4 種類（miR-16、miR-223、miR-1246、miR-1290）については膵がんでの発現上昇の報告があるものであつた。さらに、miR-223-3p と miR-451a は、低異型度に比べ高異型度のがんで、miR-1276 は予後の悪いがんで、より高い発現を示すという報告もある。これらの miRNA の機能については、より詳細な動態解析をおこなうことが分子的病因解明につながると考えられる。その他の 3 種類については、miR-451a は肺がんや甲状腺がんで、miR-619-5p は大腸がんでの発現低下の報告があり、miR-6778 については特に情報がなかった。dbDEMC 2.0（がんの発現変動データベース）での解析によると、膵がん血液でみられた発現変動は、発現上昇が、miR-619-5p、miR-1246、miR-1290、発現低下が、miR-16-5p、miR-223-3p、miR-451a となっており、これらのデータについても一部で conflict がみら

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

れる。

miRNet (miRNA のネットワーク解析サイト) で候補 miRNA と標的遺伝子との相関を解析・可視化したところ、miR-16 の標的が非常に多く、共通ターゲットとしては、miR-16 と miR-619、miR-1246 と miR-1290 の組合せが多かった。3 種類以上の miRNA の標的となっている遺伝子は 7 つ存在した (TAOK1、KIAA0895、SLC7A5、TTF2、USP48、ZNF460、CTC1)。

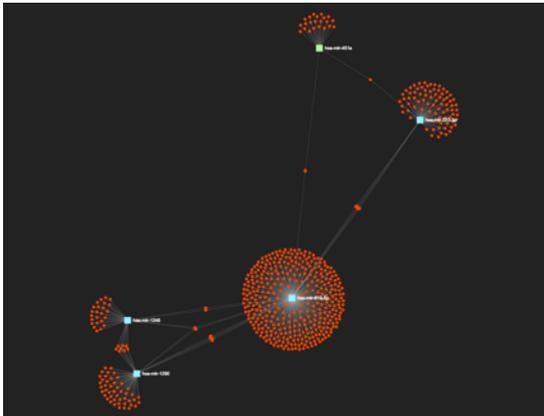


図3 miRNet による 5 つの miRNA 相関図  
(miR-16 は標的過多のためこの図では省略)

#### まとめ

今回は候補 miRNA について膵がんとの関連を検証したが、具体的な分化度や悪性度への反映などの機能解明までに至らず、exosome のコミュニケーターとしての役割を実証することはできなかった。しかし、以下の成果を得ることができた。

- ・膵がん血漿 miRNA マーカー候補としてマイクロアレイで選択した 7 種類について分析し、共通の標的遺伝子候補 7 つを選定することができた。

- ・血漿 miRNA のマジョリティは exosome 分画に存在することが判明した。したがって、circulating miR を直接解析することで、主な exosome miR の動態が把握できると考えられ、リキッドバイオプシーとして早期診断や治療フォローに利用する際に、exosome 分離のステップが不要となるため、作業の効率化に寄与すると考えられる。

- ・現在確立した基準のない miRNA 定量時の内部標準として、血漿 cell-free DNA の利用を検討し、miRNA との相関性および標準化への可能性を確認することができた。なお、miRNA 解析は、スクリーニングから検証までを一貫したプラットフォームでおこなうことが望ましいと考える。

#### 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 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堺 明子 (SAKAI, Akiko)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60205698