

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462716

研究課題名(和文) 神経芽腫の新たなバイオマーカーとしてのエクソソーム含有microRNAの有用性

研究課題名(英文) Identification of Micro RNAs in exosomes derived from neuroblastoma

## 研究代表者

吉澤 穰治 (Yoshizawa, Jyoji)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80261220

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)： 神経芽腫の新たなバイオマーカーとして、血中exosome中のmicroRNAが役に立つかを検討するために、マウス神経芽腫担癌マウスを用いて、microRNAの種類と増減を検討した。Hsa-miR-143, -145, -210, Leg-7g, -15b, -155, -328では増加したが、あるものは減少した。さらに詳細な検討が必要であるが、microRNAが新たなバイオマーカーとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Background/Purpose：There was a report that microRNA (miRNA) controls multiple genes. As a step toward identifying the role of miRNA in blood exosome, the present study was designed to determine which exosome miRNAs have increased expression and which have decreased expression in mice with neuroblastoma. Methods：For this study, we used mice neuroblastoma cell line. Neuroblastoma cells were injected in mice. The expression levels of miRNA in blood exosome were quantified by gene array. Results：We found that the expression of some of miRNA was increased. Hsa-miR-143, -145, -210, Leg-7g, -15b, -155 and -328. In addition, some kinds of miRNA were decreased. Conclusion：Micro RNA is a one of biomarker in neuroblastoma.

研究分野：小児外科

キーワード：micro RNA バイオマーカー 神経芽腫 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

細胞から分泌される膜小胞である「エクソソーム」が新たな細胞間コミュニケーション方法として注目されている。脂質の二重膜で形成されているエクソソームは、蛋白質・mRNA や microRNA をその中に梱包して、細胞間を移動する。最近、このエクソソームによる疾患発生メカニズムや悪性化機構が解明されつつある。

われわれは神経芽腫の転移に関係する miRNA を見出すために、マイクロアレイを用いて網羅的に検討してきた。この結果、神経芽腫に特異的に増加または減少する miRNA の種類が判明した。最近、miRNA は血中 exosome 中に circulating miRNA として血液中に存在していることが前立腺癌患者血液を用いた研究で解明され、miR-141 が優位に高値であることを Mitchell PS らが報告した。Mitchell PS. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10513-8. Epub 2008 Jul 28. と Tsujiura M, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. Br J Cancer. 2010 Mar 30;102(7):1174-9. Epub 2010 Mar 16.

2. 研究の目的

これまでおこなってきた神経芽腫細胞における miRNA の発現に関する研究を応用して、血液のエクソソーム中 miRNA の測定が神経芽腫の新たな診断の指標として有用であるかをマウスで検討する。さらに臨床検体を用いて検討する。また、 $\alpha$ -fetoprotein のように成長過程で血中エクソソーム中 miRNA の正常値に違いがあるか否かについても検討する。

3. 研究の方法

平成 26 年度研究

血液中のエクソソームの測定：マウスを用いて正常マウスと神経芽腫担癌マウスとで血液中のエクソソームを日齢毎に測定する。

マウス静脈血におけるエクソソーム中の microRNA の定量：miRNA は発生過程にも大きく関与することを考えると、正常な出生後の発達過程（日齢・月齢・年齢）での正常値の違いの有無について、まず検討する必要がある。そこで、マウスを用いて、神経芽腫転移に関与することが予想されるエクソソーム中 miRNA 濃度の正常値を日齢・月齢毎に測定して、正常値の変化曲線を作成する。

担癌マウスにおけるエクソソーム中の microRNA の定量：神経芽腫担癌状態のマウス血液を採取して、エクソソーム中 miRNA 濃度と腫瘍径や転移巣重量との相関関係を検討する。この際に使用する神経芽腫肝転移モデルマウスには、これまでわれわれが行ってきた新たな血管新生抑制薬や hybrid liposome による治療効果判定に用いてきたモデルを用いることが可能である

臨床検体を用いて小児および成人における正常値と日齢・月齢・年齢による変化パターンを検討する。さらに、この結果を参考にしながら、臨床検体を用いて血液のエクソソーム中 miRNA を測定する。ヒトにおいて日齢・月齢ごとのエクソソーム中 miRNA 濃度の正常値を決定して、正常値の変化曲線を作成する。

神経芽腫患者血液を用いて血液のエクソソーム中 miRNA を測定する。さらに神経芽腫患者血液を用いて、血液のエクソソーム中 miRNA を測定して、臨床でのバイオマーカーとしての有用性を検討する

臨床検体を用いて小児および成人における正常値と日齢・月齢・年齢による変化パターンを検討する。さらに、この結果を参考にしながら、臨床検体を用いて血液のエクソソーム中 miRNA を測定する。ヒトにおいて日齢・月齢ごとのエクソソーム中 miRNA 濃度の正常値を決定して、正常値の変化曲線を作成する。

神経芽腫患者血液を用いて血液のエクソソーム中 miRNA を測定する。さらに神経芽腫患者血液を用いて、血液のエクソソーム中 miRNA を測定して、臨床でのバイオマーカーとしての有用性を検討する

4. 研究成果

神経芽腫担癌マウスの血中エクソソーム中の microRNA の特異性について検討することが本研究の目的である。

多種類の microRNA の中でどの microRNA が神経芽腫の血液診断とするのが有効であるのかが、これまでには明らかでなかったが、血中エクソソーム中の microRNA をがんの診断に用いる研究が大腸がんにおいて報告が多いため、ラット大腸がんを用いた研究を並行しておこなうことで、研究方法の正確性を確認しながら、目的である神経芽腫の血中エクソソーム中の microRNA の解析を行うこととした。そこで、ラットの大腸がん細胞である RCN - 9 細胞を用いて、大腸がん肝転移モデルと担がんモデルを作製して、血液を採取して、エクソソームの抽出と microRNA の抽出をおこなった。

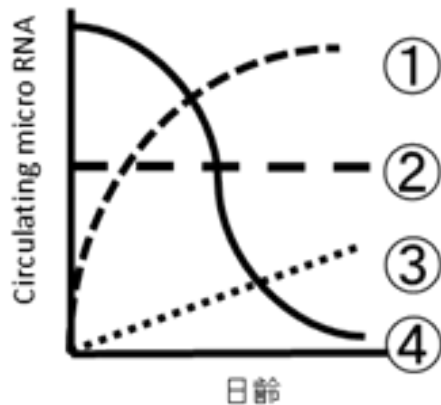
神経芽腫転移で増加する miRNA	神経芽腫転移で減少する miRNA
hsa-abi-13232	hsa-abi-7510
hsamiR-187	hsa-miR-518a
hsa-miR-491	hsa-miR520d
mmu-miR-468	hsa-miR520h
rno-miR-346	rnp-miR-20a
hsa-miR-143	
hsa-miR-145	
hsa-miR-210	

培養神経芽腫細胞の分析結果から、microRNAは sa-miR-143, -145, -210, Leg-7g, -15b, -155, -328 などでは発現レベルが担癌状態で増加し、-20a, 20h 520d 518, abi-7510などは減少した。

また、正常マウス中の血中エクソソーム中microRNAの種類と値のデータはなく、また、成長発達によって血液中のエクソソームの正常値に変化があるか否かも不明であった。すなわち日齢・週齢・月齢・年齢による変化があるか否かをまず、把握する必要がある。特に、ヒト神経芽腫の後発年齢は1歳以下であるために、日齢・週齢による正常値の変化の有無を確認する必要がある。そこで、A/Jマウスの日齢3、7日、週齢2、3、4週、月齢2、3か月のマウスの血液を採取して、エクソソームを抽出することをおこなった。

発達段階の幼少マウスにおけるmicroRNAの変化は、継続して測定していく予定である。

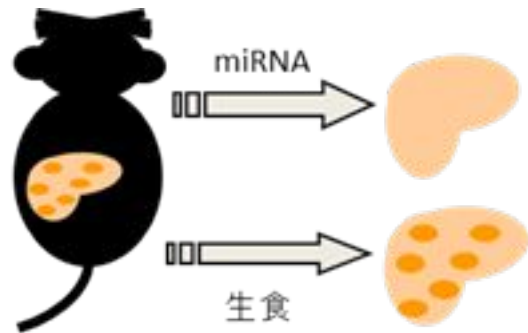
成長過程におけるcirculating miRNAの変化パターンを検討する(加齢とともに指数関数的増加・一定・加齢に正比例増加・加齢とともに減少)。さらに、加齢とともに著しい変化があるときには、臨床検体を用いてcirculating miRNAを測定して、miRNAの臨床応用への基準値の作成をおこなう。以下のような変化があるかを今後明らかにする。



これらの研究結果が出た後には、microRNAを用いた治療法を検討する。

「microRNAの発現異常を正常にもどす。」ということである。すなわち、発現が低下しているmicroRNAそのものを補充して、過剰に発現しているmicroRNAは抑制するということである。microRNAの発現を抑制する方法は、標的microRNAの相補配列を作用させるアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を形成して、これを投与する方法である。microRNAを目的部位への効率よく投与する方法として、アテロコラーゲンやコレステロールを用いたデリバリー法を用いる予定である。また、血中や細胞内に含まれるヌクレアーゼに対する耐性向上のため、2'-F, 2'

-O-methyl(2'-O-Me), 2'-O-methoxyethyl(2'-MOE)などの化学修飾体、locked nucleic acid(LNA), peptide nucleic acid(PNA)などの核酸類縁体に置き換えた分子も作成する。



#### 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)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉澤 穰治(YOSHIZAWA Jyoji)

(東京慈恵会医科大学・医学部・講師)

研究者番号：80261220

(2)研究分担者

桑島 成央 (KUWASHIMA Naruo)

(東京慈恵会医科大学・医学部・助教)

研究者番号：40301527