

令和元年6月19日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08958

研究課題名(和文) 胃癌早期診断マーカーとしての胃液中エクソソーム由来マイクロRNAの解析

研究課題名(英文) The analysis of exosomal microRNA in gastric juice as early diagnostic marker for gastric cancer

研究代表者

荒川 哲男 (Arakawa, Tetsuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60145779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1)胃液中エクソソーム由来マイクロRNA(miRNA)の抽出方法を確立した。(2)早期胃癌内視鏡治療後の異時性胃癌再発の臨床病理像を検討した。ピロリ除菌療法は異時性胃癌再発に対して予防的であった。(3)胃癌細胞株における15種類のmiRNAの発現パターンを解析した。それぞれの細胞株より特徴的なmiRNA発現パターンが認められた。(4)食道胃接合部発癌動物実験モデル確立のための研究過程で、逆流性食道炎と血中miRNA発現パターンを検討した。血中のmiRNAのうちmiR-29a-3pの発現および食道組織におけるmiR-223-3pの発現が健常コントロールラットに比し増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃液からエクソソーム由来マイクロRNAの抽出方法を確立した。胃液中エクソソーム由来マイクロRNAの発現パターンを解析することにより早期胃癌内視鏡治療後の異所性異時性胃癌の再発を内視鏡的に視認可能な時期よりも早期に診断できる可能性が示唆された。胃癌細胞株が発現するマイクロRNAを解析した。噴門部癌のリスクファクターである逆流性食道炎の動物モデルを用いて、マイクロRNAの発現パターンを検討した。今後噴門部癌のリスクファクターとして、マイクロRNAの発現パターンを解析することは診断ツールとして活用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established the method for exosome-derived microRNA (miRNA) in gastric juice. Our retrospective cohort study revealed that successful *H. pylori* eradication may reduce the development of metachronous gastric cancer after endoscopic mucosal dissection of early gastric cancer. We examined the expression pattern of miRNA (miR-619-5p, miR-4481, miR-4294, miR-3918, miR-3654, miR-1273, miR-933, miR-708, miR-658, miR-372, miR-345, miR-203, miR-196a, miR-21a, miR-146b) in gastric cancer cell lines (AGS, MKN45, NUGC3, MKN7). In the research of adenocarcinoma in esophagogastric junction using experimental animal model, we determined the expression pattern of miRNA (upregulation of expression of miR-29a-3b in blood and miR-223-3p in esophageal tissue) in rats with experimental reflux esophagitis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌 マイクロRNA エクソソーム 胃液 早期診断マーカー 噴門部癌 逆流性食道炎 ヘリコバクテラ・ピロリ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌はわが国で最も発生頻度の多い癌の一つである。最近、ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ)菌の除菌療法により、その後の胃癌の発生が減少することが我が国における大規模臨床試験により証明された(Fukase K et al., Lancet 2008 Aug 2;372(9636):392-7)。しかしながら、腸上皮化生などの胃粘膜の変化が高度な症例ではピロリ除菌後も胃癌の発生は減少しなかったという研究報告もあり、除菌による胃癌発生の抑制効果には限界があるものと考えられる。胃癌の発生頻度が高い我が国ではより効果的な胃癌発生の早期診断法の確立が必要である。ピロリ除菌療法による胃癌発症予防策を効果的なものとするためには、ピロリ除菌療法を受けた患者さん全体から、正確に胃癌発症の高危険度群の囲い込みを行い重点的に内視鏡検査による経過観察をする必要があるが、正確に胃癌発症の高危険度群の囲い込みを行うためのバイオマーカーが不明である。また、ピロリ除菌後の胃においては胃癌の内視鏡診断が困難となる可能性も指摘されている。本研究では胃液中の胃癌特異的なエクソソーム由来マイクロ RNA を同定し、胃癌の早期発見の有効なマーカーとして臨床応用することを目標として以下の検討を行った。

## 2. 研究の目的

(研究1)

胃液からのマイクロ RNA 抽出方法の確立: 胃癌の再発マーカーとなるようなエクソソーム由来マイクロ RNA を胃液から抽出可能かどうかを検討した。

(研究2)

早期胃癌内視鏡治療後の異時性胃癌再発の臨床病理像を検討した。

(研究3)

胃癌細胞株におけるマイクロ RNA 発現パターンの解析: 胃癌特異的マイクロ RNA の探索のため、定常培養下における胃癌細胞株(AGS, MNK45, NUGC3, MKN7)のマイクロ RNA の発現パターンを検討した。

(研究4)

逆流性食道炎と血中マイクロ RNA 発現パターン: 近年の本邦における逆流性食道炎罹患患者の増加に伴い、これまでは本邦での罹患率が比較的低い噴門部癌や食道胃接合部癌が今後増加する可能性が考えられる。本疾患モデル動物の作成のため、逆流性食道炎疾患モデルラットを作成し、本疾患特異的なマイクロ RNA を検討した。

## 3. 研究の方法

(研究1)

下記方法によりエクソソーム由来マイクロ RNA を抽出することを試みた。

胃液からの Exosome 回収

- (1) 胃液からゴミを除去 遠心 3000xg
- (2) 上清 10 ml に ExoQuick TC 2 ml の割合で混ぜる。  
(ボルテックス等)量は変更可
- (3) 遠心 1500xg
- (4) 上清を除去。(白~黄色の沈殿が Exosome 画分)
- (5) もう一度 1 min くらい遠心して上清を除去する。
- (6) PBS を 200 ul 加え振盪させて exosome をばらす。

\*完全にばらばらにするのが重要。

miRNA 抽出 (miRNeasy mini kit: QIAGEN)

- (1) exosome 溶液に Qiazol Reagent を 1 ml 加えて振盪。
- (2) クロロホルム 200 ul 加えて振盪。
- (3) 遠心 12000xg  
\*量が多いので 4-5 の作業は tube を二つに分ける。  
遠心が終わったら、7 のために遠心機の温度を室温にする。
- (4) 1.5ml tube に 100%エタノール 577.5 ul x 2 本用意。
- (5) 3 の上清(無色透明層)を 385 ul ずつ 4 のエタノールに混合。  
(転倒混和でもピペティングでも)
- (6) フィルターユニットに 700 ul 入れる。  
\* 4-5 で分けた溶液はここで同じフィルターに通してまとめる。
- (7). 遠心 8000xg
- (8) 濾液を捨てる。
- (9) tube 二本分の溶液で 6-8 を繰り返す。
- (10) RWT バッファー 700 ul
- (11) 遠心 8000xg
- (12) 濾液を捨てる。
- (13) RPE バッファー 500 ul
- (14) 遠心 8000xg

- (15) 濾液を捨てる。
- (16) RPE バッファー 500 ul
- (17) 遠心 8000xg
- (18) 濾液を捨てる。
- (19) フィルターユニットのチューブを新しいのに取り替える。
- (20) 遠心 13000xg
- (21) 抽出用のチューブに取り替えて DW 30 ul で RNA 溶出。
- (22) 遠心 8000xg

(研究2)

対象は 2007 年 10 月から 2015 年 10 月に、当科で初発の早期胃癌に対して内視鏡治療を施行し治癒切除あるいは適応拡大治癒切除が得られたピロリ陽性症例 378 例とした。このうち切除胃癌例、遺伝性ポリポーシスの症例、内視鏡治療から 1 年以上観察できなかった症例を除外し、最終的に 367 症例を、内視鏡治療から 1 年以内に除菌した群(除菌群)128 例と未除菌群、除菌失敗群(未除菌群)を比較し、評価項目を異時性胃癌の再発率とした。さらに両群の背景を IPTW 法で調整後、同様に解析し比較した。

(研究3)

胃癌細胞株 (AGS, MKN7, NUGC3, MKN45)を培養した後細胞を回収してマイクロ RNA を抽出し、下記のマイクロ RNA についてリアルタイム RT-PCR を用いて発現パターンを解析した。

miR619-5p, miR4481, miR4294, miR3918, miR3654, miR1273, miR933, miR708, miR658, miR372, miR345, miR203, miR196a, miR21a, miR146b

(研究4)

Wistar ラットに前胃結紮および幽門部半結紮を行い、逆流性食道炎モデルを作製し、術後 3 日目(急性期)、7 日目(亜急性期)、21 日目(慢性期)に屠殺した。慢性期における血中及び食道組織におけるマイクロ RNA の発現について網羅的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(研究1)

方法 1 に示した実験手技により、安定してクオリティの高いエクソソーム由来マイクロ RNA を胃液から抽出することができた。

(研究2)

(結果)平均追跡期間は除菌群で 1359+/-724 日、未除菌群で 423+/-846 日であった。患者背景は除菌群で年齢が若く、体重が重く、腫瘍径は小さかった。異時性再発は除菌群で 128 例中 5 例(3.9%)、非除菌群 220 例中 22 例(10.0%)で、累積異時性再発率は 3 年で 2.5% vs 9.6%, 5 年で 3.8% vs 11.3%となった(p=0.059, log rank test)。Cox 解析では、除菌治療による異時性再発は有意差を認めなかった(HR=0.38, p=0.057)。一方、IPTW 法で背景因子を調整後の Cox 解析では、除菌治療は異時性再発を有意に減少させた(HR=0.34, p=0.037)。今後、これらの異所性異時性再発症例のパライフィン包埋ホルマリン固定病理組織標本からマイクロ RNA を抽出し、初発癌と異時性再発癌のマイクロ RNA の発現パターンの類似性あるいは差異を検討する予定である。

(研究3)

各胃癌細胞株で特徴的なマイクロ RNA の発現パターンが確認された。

miR-4294, -3918, -3654, -1273, -933, -658 については、今回用いた胃癌細胞株全てにおいて発現をほぼ認めなかった。

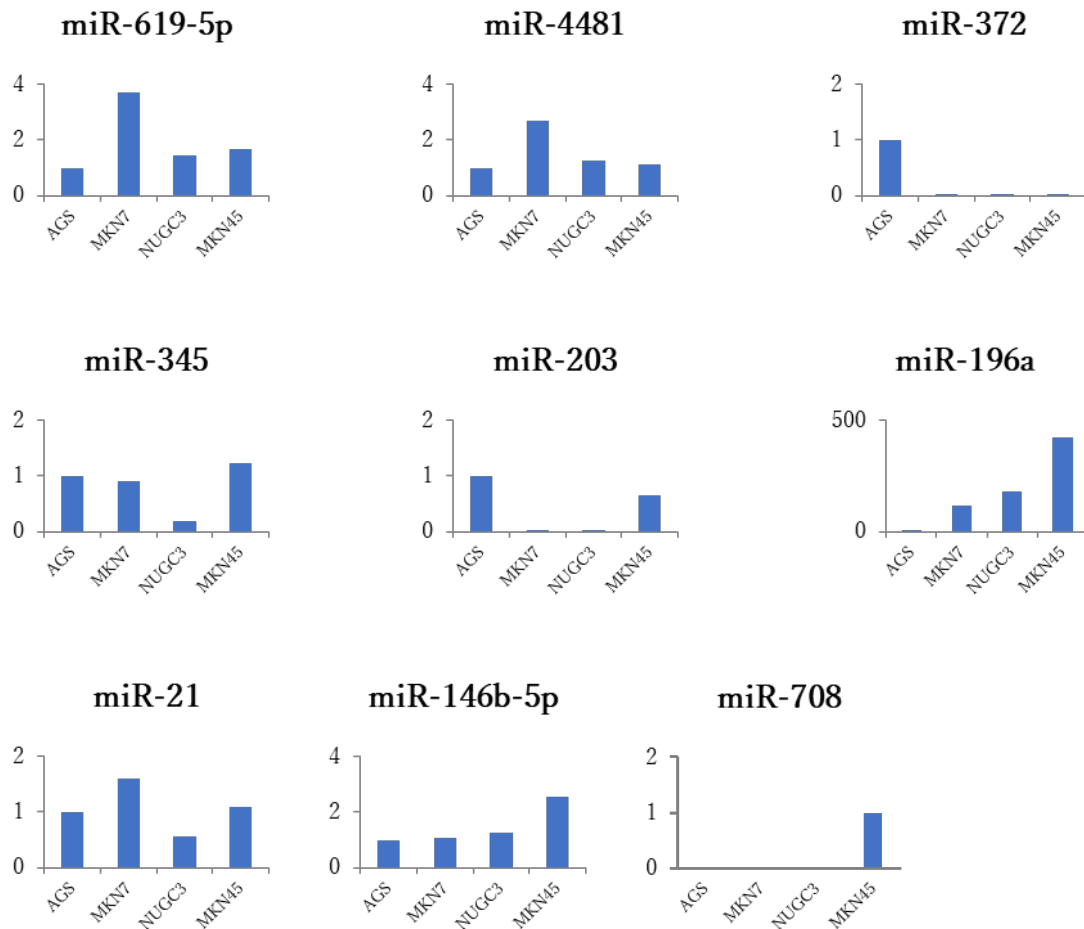
miR-708 は MKN45 にのみ高発現していた。

miR-372 は AGS にのみ高発現していた。

miR-203 は AGS と MKN45 において高発現していた。

miR-196a は AGS では低発現であった。

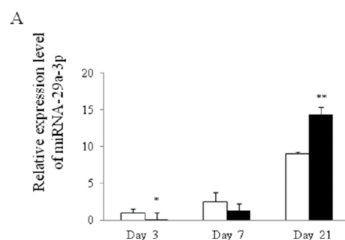
図：胃癌細胞株におけるマイクロ RNA の発現



(縦軸はすべて relative gene expression (fold of the mean value in AGS cells, ただし、miR-708 についてのみ、MKN45 の値を 1 として計算)

(研究 4)

我々は噴門部癌のリスクファクターである逆流性食道炎の実験動物モデルにおけるマイクロ RNA の発現動態について検討した。逆流性食道炎誘発ラットモデルにおいて血中のエクソソーム由来マイクロ RNA のうち miR-29a-3p の発現、および食道組織における miR-223-3p の発現が健常コントロールラットに比し増加していた。これらのマイクロ RNA は逆流性食道炎および噴門部癌の病態に何らかの役割を有し、早期診断や病態の解明への研究につながる可能性が示唆された。



図：逆流性食道炎誘発ラットモデルにおける血中のエクソソーム由来マイクロ RNA: miR-29a-3p の発現。White bar: 健常コントロール、Closed bar: 逆流性食道炎モデルラット

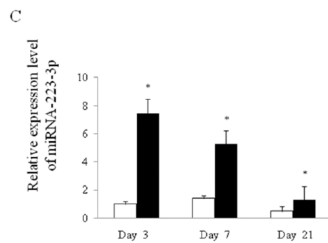


図:逆流性食道炎誘発ラットモデルにおける食道組織中マイクロRNA: miR-223-3pの発現。  
White bar: 健常コントロール、Closed bar: 逆流性食道炎モデルラット

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Uemura R, Murakami Y, Hashimoto A, Sawada A, Otani K, Taira K, Hosomi S, Nagami Y, Tanaka F, Kamata N, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe T, Taguchi YH, Fujiwara Y.

**Expression of Serum Exosomal and Esophageal MicroRNA in Rat Reflux Esophagitis. Int J Mol Sci. 2017 Jul 25;18(8). pii: E1611. doi: 10.3390/ijms18081611. 査読有り。**

〔学会発表〕(計4件)

(1) 酸分泌抑制薬抵抗性「胸やけ」への対策 GERD の新たなバイオマーカーの探索  
上村 理沙, 村上 善基, 藤原 靖弘

第60回日本消化器病学会大会(2018年)

(2) 早期胃癌 ESD 後ヘリコバクター・ピロリ除菌治療の有用性の検討

中田 理恵子, 永見 康明, 坂井 大志, 灘谷 祐二, 福永 周生, 湯川 知洋, 杉森 聖司, 大谷 恒史, 細見 周平, 田中 史生, 鎌田 紀子, 平良 高一, 山上 博一, 谷川 徹也, 斯波 将次, 渡辺 俊雄, 藤原 靖弘

第104回日本消化器病学会総会(2018年)

(3) *H.pylori* 未感染・除菌後胃がんの内視鏡診断 *H.pylori* 除菌後の異時性再発胃癌の特徴についての検討

中田 理恵子, 永見 康明, 藤原 靖弘

第96回日本消化器内視鏡学会総会(2018年)

(4) **SUCCESSFUL ERADICATION OF *HELICOBACTER PYLORI* REDUCES THE DEVELOPMENT OF METACHRONOUS GASTRIC CANCER AFTER ENDOSCOPIC SUBMUCOSAL DISSECTION FOR EARLY GASTRIC CANCER: A PROPENSITY MATCHING ANALYSIS**

Rieko Nakata, Yasuaki Nagami, Atsushi Hashimoto, Taishi Sakai, Masaki Ominami, Shusei Fukunaga, Koji Otani, Shuhei Hosomi, Fumio Tanaka, Mizuki Ohira, Noriko Kamata, Koichi Taira, Hirokazu Yamagami, Tetsuya Tanigawa, Masatsugu Shiba, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara

**Digestive Disease Week 2018**

〔その他〕

ホームページ: <https://ocu-gastro.jp/>

## 6. 研究組織

(研究分担者)

研究分担者氏名: 藤原 靖弘

ローマ字氏名: Fujiwara Yasuhiro

所属研究機関名: 大阪市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40285292

研究分担者氏名: 渡邊 俊雄

ローマ字氏名: Watanabe Toshio

所属研究機関名: 大阪市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50336773

研究分担者氏名：谷川 徹也  
ローマ字氏名：Tanigawa Tetsuya  
所属研究機関名：大阪市立大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：70423879

研究分担者氏名：富永 和作  
ローマ字氏名：Tominaga Kazunari  
所属研究機関名：大阪医科大学  
部局名：医学部  
職名：特別任命教員教授  
研究者番号（8桁）：80336768

研究分担者氏名：田中 史生  
ローマ字氏名：Tanaka Fumio  
所属研究機関名：大阪市立大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：20623292