

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2年 5月 14日現在

機関番号：13301
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00380
研究課題名：体液診断における進行性胃癌細胞特異的バイオマーカーmiRNA の探索と簡易検査法の構築
研究代表者 堀池 俊秀 (HORIIKE, Toshihide) 金沢大学・総合技術部・技術職員
交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000 円

研究成果の概要：

In vitro 実験系において、TGF-β1 添加処理によって悪性を誘導した胃癌細胞株 MKN45 から miRNA を抽出し、RNA の包括的な解析法であるマイクロアレイ解析したところ、157 種類の miRNA の発現上昇と 162 種類の発現が減少した miRNA を確認した。発現が上昇した miRNA のうち約 30 種類については、胃癌の悪性を進行するといった報告がなく、これらの miRNA 種が悪性化に関与する新規の胃癌バイオマーカー候補となり得ると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体液中に存在する miRNA をがんのバイオマーカーとして利用することで、早期がんを含むがんの疑いのある人をスクリーニングする一次検診が可能になることが期待されている。本研究により、我々は少なくとも、悪性化に関与すると推測される胃癌の新規バイオマーカーの候補となる複数の miRNA を見出すことができた。現在は、胃癌の新規バイオマーカーの候補 miRNA について、定量的 RT-PCR 法を用いて再度定量解析を行うとともに、これらの候補 miRNA の機能を阻害する実験系を確立している段階である。この実験系を確立することで、より低侵襲で簡便な診断精度の高い検査法の開発に貢献できる可能性がある。

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌、miRNA、バイオマーカー、体液診断

1. 研究の目的

二人に一人が癌になる時代、医学の進歩により、治療が難しいとされてきた進行がんも早期がんであれば治療可能となってきた。早期がんの発見のために、受診者は PET/CT、内視鏡や針を用いた組織生検（バイオプシー）による検査を受ける必要がある。病院の規模によっては全ての対象者に同等の検査を実施することは難しいため体液生検（リキッドバイオプシー）による低侵襲で簡便な診断精度の高い検査法の開発が急務である。

近年、国立がん研究センターは体液中に存在するマイクロ RNA (miRNA) をがんのバイオマーカーとして利用できる可能性を見出し、リキッドバイオプシーの実用化に向けた研究を進めている。この体液診断の実現により、膨大な人の中から、早期がんを含むがんの疑いのある人をスクリーニングする一次検診が可能になることが期待されている。同センターでは、13 種類のがんをターゲットにし、各がんのバイオマーカーとして数種類の miRNA を候補に挙げているが、まだ決して十分とは言えない。本研究では、胃癌の早期診断のための新たなバイオマーカーとしての進行性胃癌特異的な miRNA の候補を提示することを目的とした。

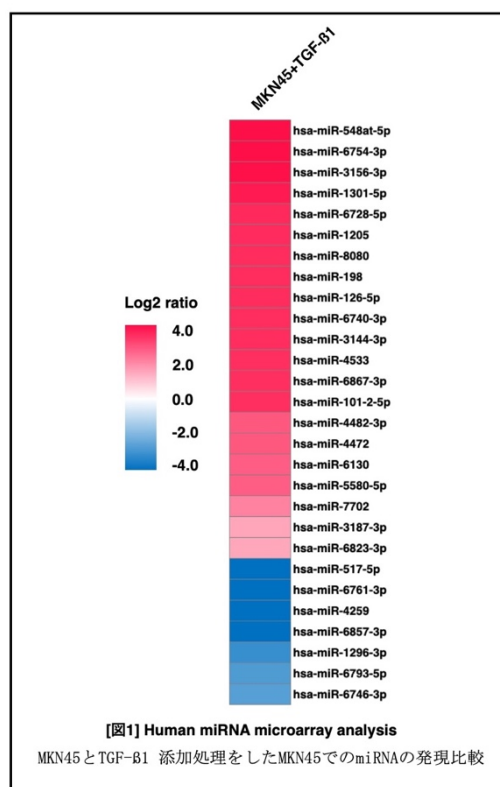
2. 研究成果

悪性化した胃癌細胞から miRNA を抽出するために、まず初めに、胃癌細胞株 MKN45 を TGF-β1 を含む培地で培養して、MKN45 の悪性を誘導した後に miRNA を抽出した。胃癌の悪性が進行することにより、アディポネクチン受容体 (AdipoR2) の遺伝子発現が減少することが報告されている (Otani *et al.*, 2010)。TGF-β1 を含む培地で培養した MKN45 の悪性が適切に誘導されたかどうかを評価するために、TGF-β1 未処理の MKN45 と TGF-β1 添加処理をした MKN45 にお

る AdipoR2 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR (qRT-PCR) によって検討した。その結果、以前の報告と同様に (Otani *et al.*, 2010)、TGF- β 1 添加処理をした MKN45 では AdipoR2 の遺伝子発現は減少していた。

上述した条件下で悪性を誘導した胃癌細胞における miRNA の発現量を網羅的に解析するために、東レ株式会社に受託解析を依頼し、Human miRNA を標的としたマイクロアレイ解析を行った (3D-Gene analysis; Human miRNA Oligo chip)。本マイクロアレイ解析では、TGF- β 1 未処理の MKN45 における miRNA の発現量と TGF- β 1 添加処理により悪性を誘導した MKN45 における miRNA の発現量を比較した。その結果、TGF- β 1 未処理の MKN45 に比べ TGF- β 1 添加処理により悪性を誘導した MKN45 では 157 種類の miRNA の発現上昇と 162 種類の発現が減少した miRNA を確認した。加えて、発現が上昇した miRNA のうちの約 30 種類については、胃癌の悪性を進行するといった報告がないことがわかった (図 1)。そのため、これらの miRNA 種が新規の胃癌バイオマーカー候補となり得ることが示唆される。

現在、胃癌の新規バイオマーカーの候補 miRNA について、定量的 RT-PCR 法を用いて再度定量解析を行うとともに、これらの候補 miRNA の機能を阻害する実験系を確立している段階であり、準備が整い次第、TGF- β 1 の添加処理と併せて候補 miRNA の機能を阻害し、胃癌悪性が抑制されるかについて検討を行う予定である。



【図1】 Human miRNA microarray analysis
MKN45とTGF- β 1 添加処理をしたMKN45でのmiRNAの発現比較

3. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：伏田 幸夫

所属研究機関：金沢大学胃腸外科講座

職名：准教授

研究協力者氏名：原田 真市

所属研究機関：金沢大学医薬保健研究域医学系教育研究支援センター

職名：准教授

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。