

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20089

研究課題名(和文)尿路上皮癌由来エクソソームにおけるmiRNA網羅的探索と新規核酸治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of cancer-specific urinary exosomal miRNA derived from urothelial carcinoma

研究代表者

松崎 恭介 (Matsuzaki, Kyosuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90747081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌患者6例(表在癌3例、浸潤癌3例)と健常者3例の自然尿40mlから超遠心法を用いてエクソソームを抽出し、エクソソーム内のmiRNAに対してマイクロアレイを用いて癌患者で上昇している5つの候補miRNA(miR-155-5p, miR-15a-5p, miR-21-5p, miR-132-3pおよびmiR-31-5p)を選別した。これらの候補miRNAを別の60例で妥当性を検証したところ、いずれのmiRNAも癌患者の尿中エクソソーム内で発現が有意に上昇しており( $P<0.001$ )、特にmiR-21-5pを用いた癌診断では感度75.0%、特異度95.8%であり、尿細胞診よりも良好な結果であった。

研究成果の概要(英文)：Exosomes were extracted from urine of 6 urothelial carcinoma (UC) patients and 3 healthy volunteers by ultracentrifugation, and miRNA from urinary Exosomes was analyzed by miRNA array. We identified 5 miRNAs (miR-155-5p, miR-15a-5p, miR-21-5p, miR-132-3p and miR-31-5p) overexpressed in urinary exosomes of UC patients from miRNA microarray analysis. Five candidate miRNAs were all significantly expressed more highly in urinary exosomes of UC patients compared to those of the control in verification cohort ( $N=60$ , all  $P<0.0001$ ). Of the 5 miRNAs, miR-21-5p in urinary exosomes was the most potent biomarker, having a sensitivity of 75.0%, specificity of 95.8%. This result was better than that of urine cytology in this cohort.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：尿路上皮癌 エクソソーム 尿中 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

(1)膀胱、腎盂尿管の進行した尿路上皮癌に対しては、抗癌剤治療および手術療法による集学的加療を行うが予後は悪く、この10年予後の改善を認めていない。しかし早期に発見された場合は手術による根治が見込まれるため、早期発見早期治療が重要となる。

(2)近年、癌細胞が自らのmiRNAをエクソソームと呼ばれる小胞体に封入して血液、尿中に分泌し、周囲の細胞をより浸潤、増殖しやすい環境に変化させたり、血管などを通して転移部位に到達し、癌細胞が転移、進展しやすい環境へと変化させることが明らかになってきた。癌細胞から分泌されているエクソソームは、癌細胞に由来するいくつかのタンパクやmiRNA、mRNAなどを含んでいることから癌の診断や治療効果判定に用いられるのではないかと期待されている。また癌細胞は分泌するエクソソームによって細胞自身の増殖を促進するのみならず、線維芽細胞の活性化や血管新生の誘導など癌促進的な局所性環境へと変化させる作用をもち、さらに転移に適した微小環境の形成以外にも免疫抑制状態の誘導など全身性環境も癌細胞に有利な方向へと変化をさせる作用などをもつことが報告されており、癌細胞が分泌するエクソソームを検出することは癌の状態を知るためのバイオマーカーになるだけでなく、治療標的にもなり得るものと考えられている。

### 2. 研究の目的

癌特異的エクソソームの存在とその中に含まれるmiRNAに着目し、これを選択的に抽出することによって、より生物学的に意義深いmiRNAの同定が可能になると考えた。尿路上皮癌患者特異的に尿中に分泌されるmiRNAを同定しその検出、定量を行い、予後不良とされている浸潤性尿路上皮癌患者の治療選択、治療効果判定に用いることのできる実用的バイオマーカー開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

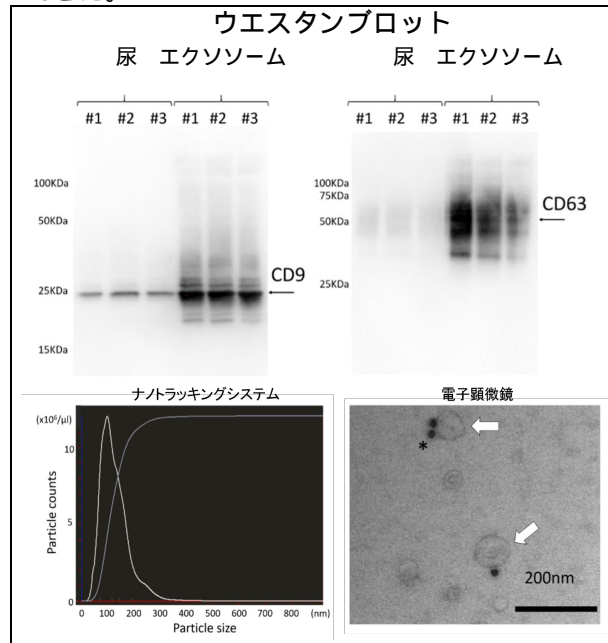
(1)超遠心法を用いて尿からエクソソームを回収する。エクソソーム回収の確認はエクソソーム特異的タンパク(CD9,CD63)のウエスタンブロットやナノトラッキングシステム、電子顕微鏡を用いて行う。

(2)尿路上皮癌患者6名と健常者3名から超遠心法を用いて回収した尿中エクソソームからRNAを抽出し、Affimetrix社のGeneChip miRNA Arrayを用いて網羅的マイクロアレイ解析を行い、癌患者尿中エクソソーム内で上昇しているmiRNAをバイオマーカー候補として同定する。

(3)上記候補のmiRNAに対しては別のコホート(癌患者36名、健常者24名)の尿中エクソソームを用いて、バイオマーカーとしての妥当性を検証する。

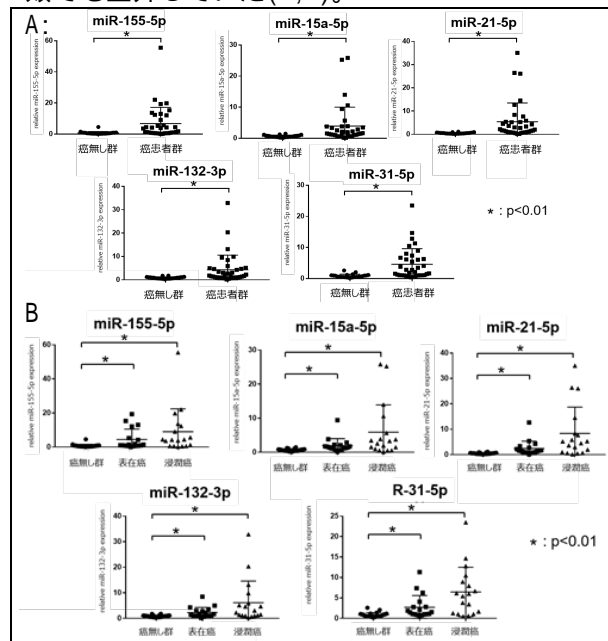
### 4. 研究成果

(1)ウエスタンブロットではエクソソーム特異的タンパク(CD9,CD63)の発現を確認し、またナノトラッキングシステムでは回収した粒子径が200nm以下であることを確認した。また電子顕微鏡で200nm以下の粒子を確認することができ、以上より尿からエクソソームの抽出ができていることを確認することができた。



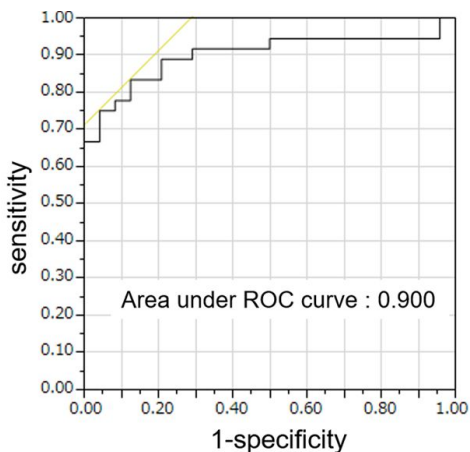
(2)マイクロアレイの結果、癌患者の尿中エクソソーム内で上昇するmiRNAを確認し、その中から5つのmiRNA(miR-155-5p, miR-15a-5p, miR-21-5p, miR-132-3p, miR-31-5p)を候補miRNAとして選別した。

(3)60例の別コホートにおいて、5つの候補miRNAはいずれも癌患者の尿中エクソソーム内で上昇していた。また癌の深達度毎での分類でも上昇していた(A,B)。



ROC での解析では尿中エクソソーム内 miR-21-5p が最も高い癌診断能 (AUC=0.900) という結果を得た(C)。また多変量解析により尿中エクソソーム内 miR-21-5p は独立した癌診断因子であることが示された(D)。

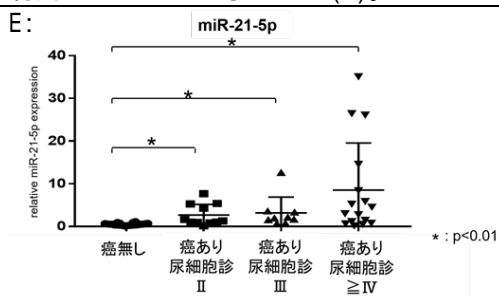
C: 尿中エクソソーム内 miR-21-5p を用いた ROC 曲線



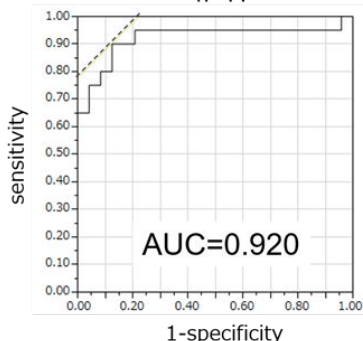
D: ロジスティック回帰分析

	単変量解析			多変量解析		
	Odds ratio	95% CI	p-value	Odds ratio	95% CI	p-value
年齢	1.10	1.05-1.18	<0.0001	1.04	0.96-1.15	0.27
性別 (男/女)	1.70	0.50-5.81	0.38	5.45	0.51-118	0.16
尿細胞診 (Positive vs Negative)	1.20×10 <sup>9</sup>	—	<0.0001	2.33×10 <sup>9</sup>	—	0.003
尿中エクソソーム						
miR-155-5p	2.12	1.30-4.92	<0.0001			
miR-15a-5p	8.97	2.76-44.1	<0.0001			
miR-21-5p	27.3	4.52-360	<0.0001	65.6	4.92-3820	<0.0001
miR-132-3p	5.64	2.01-26.0	<0.0001			
miR-31-5p	3.95	1.72-14.4	<0.0001			

また尿中エクソソーム内 miR-21-5p は尿細胞診陰性の癌患者群でも上昇していることが示され(E)、尿細胞診陰性群での癌診断にも有用であることが示された(F)。



F: 尿細胞診 陰性群 n=44



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 1 件)  
Kyosuke Matsuzaki, Kazutoshi Fujita, Norio Nonomura, MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. Oncotarget, 査読有, 2017 Apr 11;8(15):24668-24678. doi:10.18632/oncotarget.14969.

〔学会発表〕(計 4 件)  
松崎 恭介、尿中エクソソーム内 miR-21-5p は尿路上皮癌のバイオマーカーになりうる、第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017 年 4 月 25 日、城山観光ホテル  
松崎 恭介、尿路上皮癌由来の尿中エクソソーム miRNA 解析および新規バイオマーカーの探索、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜  
松崎 恭介、The detection of cancer specific urinary exosomal miRNA derived from urothelial carcinoma、第 104 回日本泌尿器科学会総会、2015 年 4 月 23 日、仙台国際センター  
松崎 恭介、尿路上皮癌由来の尿中エクソソーム内包 miRNA 解析および新規バイオマーカーの探索、第 25 回泌尿器科分子・細胞研究会、2016 年 2 月 27 日、ATC コンベンションルーム

〔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

松崎 恭介 (MATSUZAKI Kyosuke)

大阪大学大学院医学系研究科 器官制御  
外科学講座(泌尿器科) 医員

研究者番号：90747081

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者