

令和元年6月5日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10521

研究課題名(和文)4型胃癌における癌分泌膜小胞由来の新規バイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Investigation of extracellular vesicles as novel biomarker in 4 type gastric cancer patients

研究代表者

李 相雄 (Lee, Sang-Woong)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：40368080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌患者胃液中の細胞外小胞の抽出と機能解析に取り組んだ。胃液は粘調度が高く、細胞外小胞の抽出が困難であったため、研究課程で様々な独自の処理を加えた後に、超遠心法により抽出を試みた。抽出産物に多面的な解析(形態学的解析や、蛋白マーカー解析、含有microRNA解析など)を実施し、抽出物が細胞外小胞の特徴を有していることを確認した。更に、正常繊維芽細胞に抽出物を曝露し、線維芽細胞が増殖傾向を示すことを同定した。これらの結果から、胃癌患者の胃液中には細胞外小胞が含まれ、周囲の微小環境を癌に有利な状況に調整していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者の血液や尿など様々な体液中の細胞外小胞に対する解析がなされているが、本研究では、粘調度によりこれまで抽出が試みられてこなかった胃液中にも細胞外小胞が含有されることが同定された。また、がん細胞から放出されるであろう胃液中の細胞外小胞が周囲の微小環境に影響を与えることが示唆された。本研究結果により、がんにおける細胞外小胞の役割がより付加されたと考える。また本研究は、胃癌患者の胃液という臨床試料を用いた検討でありより臨床を反映した研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to clarify the existence of GJ-EVs derived from gastric cancer patients. GJ-EVs were isolated by the ultracentrifuge method combined with our own preprocessing from gastric cancer (GC) patients. We verified GJ-EVs by morphological experiments, i. e., nanoparticle tracking system analysis and electron microscopy. In addition, protein and microRNA markers of EVs were examined by Western blotting analysis, Bioanalyzer, or quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. GJ-EVs were found to promote the proliferation of normal fibroblast cells. Our findings suggest that isolates from the GJ of GC patients contain EVs and imply that GJ-EVs partially affect their microenvironments and that analysis using GJ-EVs from GC patients will help to clarify the pathophysiology of GC.

研究分野：Gastrointestinal Oncology

キーワード：胃癌 胃液 細胞外小胞 Extracellular Vesicles Exosome Microvesicles 微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦全悪性疾患の部位別死亡数で第3位であり、早期診断がのぞまれる。近年、新たなバイオマーカーとして細胞外小胞（Extracellular Vesicles: EVs）中の遺伝産物の診断応用が期待されている。EVsとは生体内の細胞および培養細胞から分泌される膜小胞で、miRNA、mRNA、DNA、Protein等の遺伝情報を内包している。大きさや分泌過程によってExosomesとmicrovesicleに分別される。生体内では血液、唾液、尿、羊水、腹水等の体液中で観察されることが知られており、細胞から分泌されて目的の細胞へと運ばれ、細胞や組織間のシグナル伝達の役割を担っている。特に、がん細胞由来EVsはがん由来遺伝子情報を含んでいると報告されている。しかし、胃液は粘液成分が多く比較的、細胞外小胞の抽出に適した試料とされておらず、研究が進んでいない。本研究で、我々は胃癌患者胃液中EVsの存在を同定し機能解析を行うことで、胃癌の診断バイオマーカーへの応用の可能性を検討した。

2. 研究の目的

胃癌患者胃液中にEVsが存在することを同定し、胃癌の病態を胃液中EVsから解析する。また診断バイオマーカーとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

手術前の絶食状態を経た胃癌患者の胃液を採取し、EVsの抽出を試みた。

方法のコントロールとして胃癌細胞株からもEVsを抽出した。

EVsの存在証明として、形態学的実験（電子顕微鏡）、粒度分布解析（NanoSight）を用いた。分子マーカーとしては、既知の表面マーカー（テトラスパニン）やネガティブマーカー（GolgiマーカーやERマーカー）を用いた。

内包遺伝子としてmicroRNA（miRNA）の存在と発現を解析した。

また、EVsを線維芽細胞に曝露し影響を解析した。

4. 研究成果

計18例の胃癌患者胃液中のEVsを解析した（Table1）。

Table 1. Clinical and pathological features of gastric cancer patients.

Case	Age	Sex ^a	Type ^b	Size ^c	Pathology ^d	T ^e	N ^f	M ^g	Stage ^h
1	68	M	1	45 × 28	tub1, tub2 > pap	T2	N1	M0	pStageIIA
2	78	M	3	47 × 42	por2 > tub2	T3	N3a	M0	pStageIIIB
3	78	M	3	40 × 50	tub1, tub2, por	T3	N2	M0	pStageIIIA
4	66	M	0-IIc	5 × 5	tub2, por > sig	T1a	N0	M0	pStageIA
5	72	F	3	40 × 30	por2, por1	T3	N1	M0	ypStageIIB
6	36	F	4	49 × 38	por2, sig > tub2	T1b	N1	M0	ypStageIB
7	84	M	4	34 × 33	por2 >> tub2	T3	N1	M0	ypStageIIB
8	71	M	3	52 × 42	por1 > sig	T3	N0	M0	ypStageIIA
9	56	F	3	20 × 20	por2 > sig	T3	N0	M0	ypStageIIA
10	75	M	0-IIc	66 × 46	tub2, por2 > tub1	T3	N3a	M0	pStageIIIB
11	43	F	3	35 × 34	sig	T3	N1	M0	ypStageIIB
12	37	F	4	-	por, sig	T3	N0	M1	sStageIV
13	77	F	3	122 × 92	tub1, pap, tub2, por2	T4a	N3b	M0	pStageIIIC
14	54	F	4	49 × 46	por2 > sig	T4a	N0	M0	pStageIIB
15	50	M	4	-	por, sig	T4a	N2	M1	sStageIV
16	76	M	0-IIa + IIc	1.2 × 1.2	por2 > tub2 > tub1	T1b	N0	M0	pStageIA
17	78	M	0-I + Iia	53 × 35	tub1, pap > tub2	T1a	N0	M0	pStageIA
18	77	F	3	-	tub2, por	T4a	N1	M1	pStageIV

まず初めに、胃液中にEVsが存在することを、透過電子顕微鏡で確認した（図1A）。また観察された、小胞は免疫蛍光顕微鏡でCD63陽性であった（図1B）。

そこで一般的に確立されている方法でEVsを抽出し、EVsのマーカー発現などを解析したが、想定した結果を得ることが出来ず、実験に難渋した。様々な検証結果を元に粘液に埋没されているEVsを抽出してこることが重要であると判断し、前処置を加えることを考案した（図2）。

図1

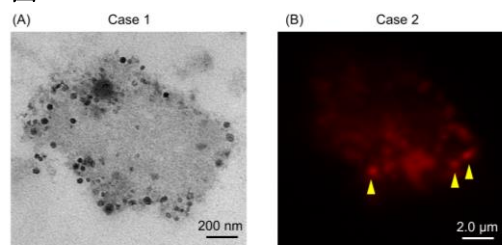
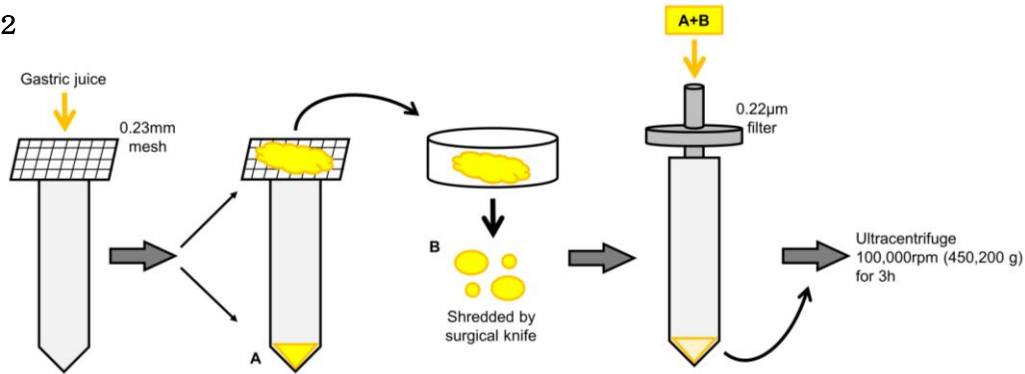


図 2



この方法を用いて EVs のマーカー蛋白の発現を解析したところ、陽性マーカーである TSG101、CD9、CD81 が発現し、陰性マーカーである GOLGA2、CANX は発現しないことが判明した。また ACTB も陰性マーカーに近い発現傾向を示した (図 3A、3B)。この結果から上記の前処置を加えた方法で胃癌患者胃液中の EVs の抽出を更に行った。

粒度分布解析では、140~200 nm の大きさの小胞が確認された (図 4A)。また走査電子顕微鏡でも、同様の小胞の集塊が確認された (図 4B)。

次に EVs 中の RNA を抽出し、EVs 中の代表的遺伝子産物である miRNA の発現の有無を確認した。バイオアナライザーでは、25 ~ 200 ヌクレオチドの RNA で構成されていることが判明した。また、18S、28S ribosomal RNA ピークは観察されなかった (図 5)。興味深いことに RNA の収量は 4 型胃癌症例で顕著であった。そこで、血液や尿など様々な体液で発現が確認されている universal miRNA の発現を RT-PCR で確認した。対象となる miRNA として、MIRLET7A1-5p、MIR16-5p、MIR103a-3p、MIR191-5p、MIR423-5p と small nuclear RNA である、RNU6-6P を選択した。MIR16-5p と MIR191-5p の発現が比較的安定しており、胃液中 EVs のマーカーとなる可能性が示唆された (Table2)。また miRNA の発現も 4 型胃癌における発現 (Case15) で高い結果となった。

図 3

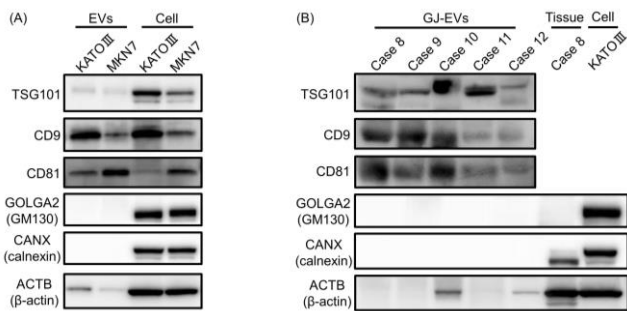


図 4

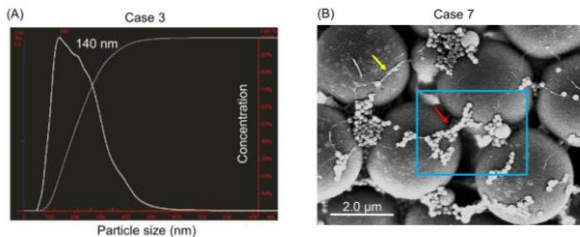


図 5

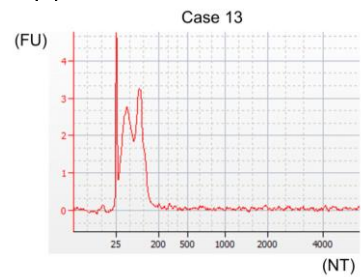
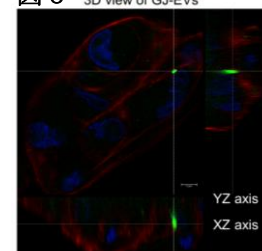


Table 2. CT value of each miRNA and snoRNA in EVs extracted from GJ of GC patients.

Gene	Case 13	Case 14	Case 15	Case 16
RNU6-6P	34.47±0.21	35.60±0.26	35.82±0.34	34.54±0.17
MIRLET7A1-5p	28.11±0.06	29.23±0.12	26.07±0.28	29.11±0.16
MIR16-5p	24.79±0.01	25.46±0.04	14.14±0.17	26.27±0.11
MIR103a-3p	34.50±0.18	32.80±0.24	24.73±0.15	31.90±0.14
MIR191-5p	27.07±0.02	27.22±0.06	21.23±0.27	29.46±0.22
MIR423-5p	30.84±0.47	34.46±0.29	27.82±0.08	34.56±0.45

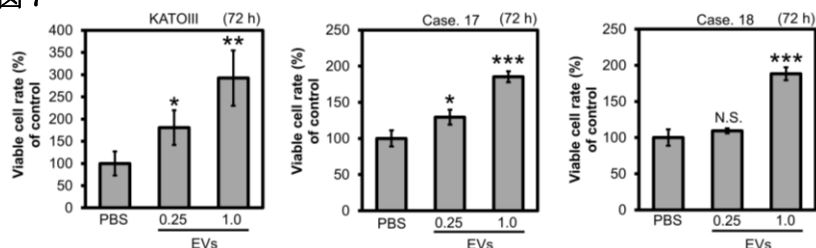
4 型胃癌では線維化の亢進が指摘されていることなどから、胃癌患者胃液中 EVs の機能を解析するため、正常繊維芽細胞 ASF-4 に抽出した EVs を曝露し細胞増殖能の変化を解析した。まず、曝露した EVs が ASF-4 に取り込まれていることを確認した (図 6)。また、予想通り EVs の曝露により ASF-4 の細胞増殖が確認された (図 7)。以上より、胃癌患者胃液中 EVs は癌微小環境を修飾する可能性があることが示唆された。しかし、本研究では健常者の胃液を用いた検討が施行できなかった。理由として、当初、胃液中 EVs の抽出にかなり

図 6 3D view of GJ-EVs



難航したことと、様々な患者背景を考慮する必要があることなどが挙げられる。いくつかの課題も残ったが、本研究では胃癌患者の胃液中に確かに EVs が存在することが証明された。

図 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1: Kagota S, Taniguchi K, Lee SW, Ito Y, Kuranaga Y, Hashiguchi Y, Inomata Y, Imai Y, Tanaka R, Tashiro K, Kawai M, Akao Y, Uchiyama K.
Analysis of Extracellular Vesicles in Gastric Juice from Gastric Cancer Patients.
Int J Mol Sci. 2019 Feb 22;20(4). 査読有
doi: 10.3390/ijms20040953.

〔学会発表〕 (計 4 件)

1: 駕田修史、谷口高平、倉永祐希、伊藤裕子、橋口康之、李相雄、赤尾幸博、内山和久
胃液由来分泌膜小胞の抽出と機能解析
第 51 回 制癌剤適応研究会
2018 年

2: 駕田修史、谷口高平、猪俣陽介、倉永祐希、伊藤裕子、赤尾幸博、内山和久
胃液由来細胞外小胞の抽出と機能解析
第 77 回 日本癌学会学術総会
2018 年

3: 駕田修史、谷口高平、倉永祐希、伊藤裕子、李相雄、赤尾幸博、内山和久
胃液由来分泌膜小胞の抽出と機能解析
第 21 回 日本がん免疫学会総会
2017 年

4: 駕田修史、谷口高平、倉永祐希、伊藤裕子、赤尾幸博、内山和久
胃液由来分泌小胞の抽出と機能解析
第 76 回 日本癌学会学術総会
2017 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/~sur000/html/laboratory.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：赤尾 幸博

ローマ字氏名：AKAO, yukihiro

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：大学院連合創薬医療情報研究科

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：00222505

研究分担者氏名：田代 圭太郎

ローマ字氏名：TASHIRO, keitaro

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：20645527

研究分担者氏名：河合 英

ローマ字氏名：KAWAI, masaru

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40465604

研究分担者氏名：内山 和久

ローマ字氏名：UCHIYAMA, kazuhisa

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：80232867

※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。