

平成30年 5月22日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15612

研究課題名(和文) 癌特異的エクソソーム包埋遺伝子情報をもとにした大腸癌診断ならびに治療戦略の確立

研究課題名(英文) Development of novel screening method using exosomal miRNAs in CRC.

研究代表者

楠 正人 (Kusunoki, Masato)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50192026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、癌特異的に分泌されるGlypican-1陽性エクソソームに包埋された遺伝子情報を解析することで、非侵襲的なLiquid biopsyによる大腸癌患者の診断から治療にわたる戦略が構築可能か検証することである。今回の研究の経過の中でLiquid biopsyを臨床応用するには大腸癌特異的エクソソームを分離することが重要であることを報告した。さらに大腸癌細胞株分泌エクソソームを網羅的蛋白解析を施行し、公共データベースを用いて解析を行うと、AUC0.9以上で癌組織特異的に発現を示す蛋白群の同定に成功した。現在、それらを用いて、非侵襲的診断マーカーとしての有用性の確認作業をおこなっている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on exosome-expressed protein, including Glypican-1, to develop novel screening method using exosomal miRNAs in CRC patients. During the series of this project, we successfully find several novel findings. As first, we directly compared between exosomal and serum-derived miRNAs in adenoma patients, and showed that diagnostic potential of serum-derived miRNAs are superior to exosomal miRNAs in these patients. Second, we performed comprehensive protein profiling using exosomal protein from CRC cells and normal cells, and identified candidate proteins to specifically expressed in CRC tissues. Finally, we demonstrated that serum miR-1290 could be used as a diagnostic and prognostic biomarker in CRC patients.

研究分野：Colorectal cancer

キーワード：大腸癌 エクソソーム microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### <研究の学術的背景>

平成25年度の国民医療費は初めて40兆円を超え、前年度の39兆2,117億円に比べ8,493億円、2.2%の増加となっている。国民医療費を年齢階級別でみると、高齢化に伴い65歳以上の男性は10兆5,785億円(55.0%)、女性は12兆5,327億円(60.2%)であり、国民医療費の約58%を占めている。さらに医科診療医療費を主傷病による傷病分類別にみると、「循環器系の疾患」5兆8,817億円(20.5%)が最も多く、次いで「悪性新生物」3兆8,850億円(13.5%)であり、いわゆる癌に対する早期診断、治療戦略に対する再検討も急務の対策である。

本邦における大腸癌患者数は他の癌種と同様に高齢化や生活様式の欧米化などと相まって着実に増加している。厚生労働省の人口動態調査によると、大腸癌による死亡数は男女合わせて平成25年は47,654人で、平成23年の45,744人からさらに増加し、悪性新生物の中では肺癌、胃癌に次いで3番目に多く、女性では2003年以降最も死亡数が多い。大腸癌の死亡数を減らすため、ひいては大腸癌治療に関わる全ての医療費(手術、抗癌剤など)の削減のためには、内視鏡切除可能な早期の段階(腺腫、早期大腸癌)で診断し、根治することで大腸癌患者を抜本的に減らすことが極めて重要である。

大腸癌検診では便潜血反応検査(FOBT)にその死亡率減少効果を示す十分な証拠が認められる。しかしながら癌診断の特異度、感受性はともに満足できるものではなく、とりわけ前癌病変の大腸腺腫に対する診断能はきわめて低いのが現状である。また便潜血検診受診率が極めて低い(コンプライアンスが低い)ことに加え、偽陽性率が極めて高いことである。さらに、陽性と判断された方の精密検診率(侵襲的な大腸内視鏡、注腸検査)の低さが挙げられる。大腸癌検診の目的が大腸癌の早期発見にあるとすれば、便潜血検査はその目的に適ってはいるが、注意を要することは、一般に便潜血検診陽性群の3分の1は進行癌であり、このことは「早期発見=早期癌の発見」ではないことを如実に表している。

## 2. 研究の目的

本研究は、癌特異的に分泌されるGlypican-1陽性エクソソームに包埋された遺伝子情報を解析することで、非侵襲的なLiquid biopsyによる大腸癌患者の診断から治療にわたる戦略が構築可能か検証することである。まず、癌特異的に分泌するGlypican-1陽性エクソソーム内のmicroRNAsプロファイリングを行い、癌種識別パネルを作成することで、すべての固形癌種の正確な診断が可能であるが、本研究は消化器癌の中で大腸癌診断特異的パネルを作成することを目的とする。さらに、血清Glypican-1陽性エクソソームDNA

変異情報がそのまま、癌原発組織巣、転移組織巣のDNA変異情報として使用可能かを検証することである。

## 3. 研究の方法

### ・エクソソーム抽出

大腸癌細胞株(CaCO2, DLD-1, HT29, LoVo, SW480)と大腸正常粘膜由来細胞株の培養上清からMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS(Wako)を利用してエクソソームを抽出した。またその抽出した粒子径はNanosight(日本カンタムデザイン)を用いて測定した。

### ・エクソソーム蛋白の網羅的解析

2ug蛋白量のエクソソームを抽出し、Protein profilingは、MS BioworksにIP profilingで受託解析を依頼した。

### ・Glypican-1 western blotting

ヒト大腸癌・胃癌細胞株より抽出した蛋白を用いて、Glypican-1一次抗体(Thermo)を1000倍希釈でwestern blottingを施行した。

### ・エクソソーム包埋RNA抽出

ExoQuick™ kit(System Biosciences, EXOQ20A-1)を用いて抽出したエクソソームを用いて、miRNeasy RNA extraction kit(Qiagen)でRNAを抽出した。またspike in controlとしてcel-miR-39を併用した。

### ・血清中RNA抽出

200ulの血清よりmiRNeasy RNA extraction kit(Qiagen)を用いて、RNA抽出を行った。またspike in controlとしてcel-miR-39を併用した。

### ・大腸組織FFPEよりRNA抽出

大腸癌・大腸腺腫・正常大腸粘膜組織のFFPE切片を使用し、macrodissectionを施行した。miRNeasy FFPE RNA extraction kit(Qiagen)を使用してRNAを抽出した。

### ・定量的PCR

miRNAの定量解析は、Taqman primerとTaqman microRNA RT kitを利用してmicroRNA-specificな逆転写を施行したうえで、Step-One PlusリアルタイムPCRシステム(Thermo scientific)でqPCRを施行した。またnormalizerにはmiR-16もしくはU6、cel-miR-39を使用した。

### In vitro 解析:

大腸癌細胞株を使用し、候補遺伝子(miRNAやその他のncRNA含む)をsiRNA transfectionで遺伝子発現抑制を行ったうえで、MTT assay、Invasion assay、migration assayなどをおこない、遺伝子発現調節によるphenotypeの変化を評価した。また発現上昇にはncRNAの全長シーケンスを挿入したplasmidを作成し、レンチウイルスを用いたtransduction

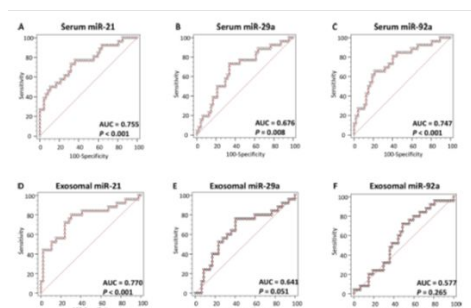
を行い、遺伝子過剰発現株を作成した。

#### 4. 研究成果

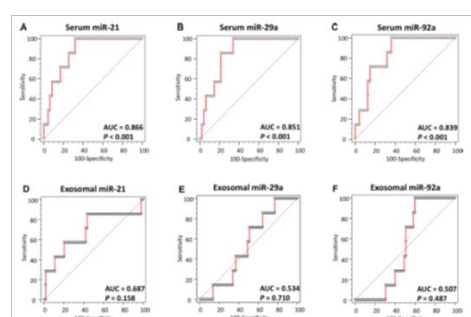
本研究を行う上で、まずはエクソソーム包埋 RNA 情報と、血清中 RNA とどちらが大腸癌早期診断マーカーとして有用化を検討するために、エクソソーム抽出 RNA と血清中 RNA を大腸腺腫ならびに健常人の同一患者より採取した血清より抽出し、代表的な非侵襲早期診断マーカーとして報告されている miR-21, -29a, -92a の大腸腺腫とくに、長径 10mm 以上の進行大腸腺腫における診断能を評価した。興味深いことに血清 miR においては、miR-21, -29a, -92a, エクソソーム包埋 miR に関しては miR-21 のみの発現が大腸腺腫患者に対して有意な診断能が認めることがあきらかとなった(下図, Uratani R, Kusunoki M et al. Plos One 2016;11(10):e0160722)。

以上より、トータルエクソソームの遺伝情報をを用いるのみでは、診断能はすぐれずまた疾

Exosomal miRとSerum miRの直接比較  
(大腸腺腫症例の診断能)



Exosomal miRとSerum miRの直接比較  
(進行大腸腺腫症例の診断能)

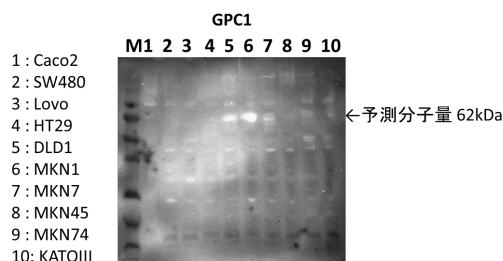


患特異性を持たせることは困難であることが考慮されたことから、ある特定のエクソソーム分画に包埋された遺伝情報を持ちいる方法がより、臓器特異性のある早期診断マーカーの確立を可能となりうる仮説が考えられた。

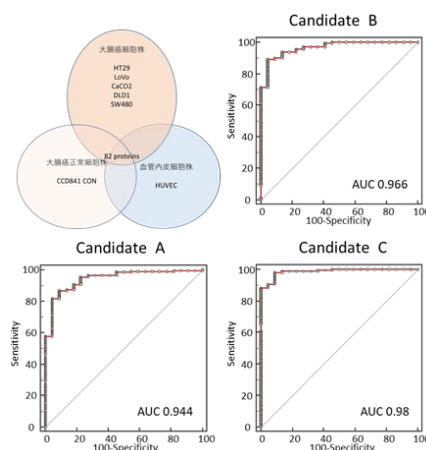
また miRNA そのものにもエクソソームにより分布が組織と異なる可能性が指摘されたことから、特定の miRNA を同定することにより、より臓器特異性をもたせる可能性が考慮された。

つづいて、既存の報告から Glypican-1 (GPC-1)に着目し、診断マーカーとして癌分泌エクソソームに恒常的に GPC-1 が発現する

ためには、癌細胞そのものにおいても同様であることが必要となるため、大腸癌ならびに胃癌細胞株より抽出した蛋白を用いて、GPC-1 蛋白発現を western blotting で確認した。しかし、今回の我々の結果では、GPC-1 は胃癌細胞株のみならず大腸癌細胞株においても、発現を認めないものが多いことから、GPC-1 を標的としたエクソソーム分画でのスクリーニングを目的とした診断マーカーの開発には現実的に困難な印象だった。

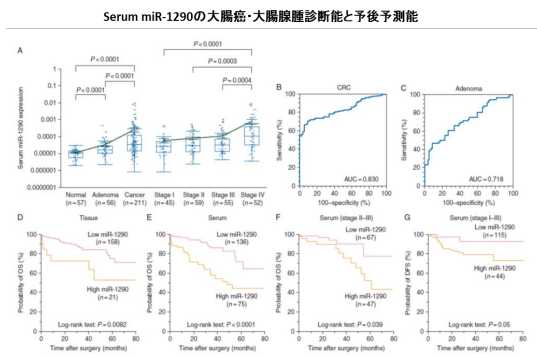


以上の背景から、GPC-1 ではなくあらたな膜表出型癌分泌型エクソソーム特異的蛋白を同定する必要がでてきたため、大腸がん細胞株 5 種類 (CCO2, DLD-1, HT-29, LoVo, SW480) ならびに大腸正常粘膜細胞株、血管内皮細胞株の上清からエクソソームを抽出し、そのエクソソーム蛋白で、網羅的蛋白解析 (IP profiling) を施行した。その結果 82 種類の蛋白を同定し(下図) さらにそのなかのいくつかは、TCGA データベースで大腸癌組織ならびに正常粘膜における発現解析を行うと、癌特異的にこう発現を呈しているものが同定された。



これらの標的蛋白を用いて、現在その測定方法の開発と validation 解析を継続中である。

また本研究に付随して、大腸がん患者特異的に発現増加を示す血清中 miR-1290 が、大腸腺腫 (AUC 0.72) ならびに大腸癌症例 (AUC 83) の非侵襲的診断マーカーとなり、また病期進行に伴いその血中発現は増加し、有用な再発予測・予後予測マーカーとなる可能性を明らかにした(下図, Imaoka H, Kusunoki M et al. 2016 Oct;27(10):1879-86)。



## 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 12 件)

1. Novel evidence for a PIWI-interacting RNA (piRNA) as an oncogenic mediator of disease progression, and a potential prognostic biomarker in colorectal cancer.

Weng W, Liu N, Toiyama Y, Kusunoki M, Nagasaka T, Fujiwara T, Wei Q, Qin H, Lin H, Ma Y, Goel A.

Mol Cancer. 2018 Jan 30;17(1):16

査読有

2. A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer.

Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Araki T, Uchida K, Hishida A, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. Gastroenterology. 2017 Dec;153(6):1634-1646. e8.

査読有

3. Successful identification of a predictive biomarker for lymph node metastasis in colorectal cancer using a proteomic approach.

Mori K, Toiyama Y, Otake K, Ide S, Imaoka H, Okigami M, Okugawa Y, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Kobayashi Y, Mohri Y, Kobayashi I, Goel A, Kusunoki M.

Oncotarget. 2017 Oct 30;8(63):106935-106947

査読有

4. CCAT1 and CCAT2 long noncoding RNAs, located within the 8q.24.21 'gene desert', serve as important prognostic biomarkers in colorectal cancer.

Ozawa T, Matsuyama T, Toiyama Y, Takahashi N, Ishikawa T, Uetake H, Yamada Y, Kusunoki M, Calin G, Goel A.

Ann Oncol. 2017 Aug 1;28(8):1882-1888.

査読有

5. Proteomics analysis of differential protein expression identifies heat shock protein 47 as a predictive marker for lymph node metastasis in patients with colorectal cancer.

Mori K, Toiyama Y, Otake K, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Kobayashi Y, Kobayashi I, Mohri Y, Goel A, Kusunoki M.

Int J Cancer. 2017 Mar 15;140(6):1425-143

査読有

6. MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer.

Miyoshi J, Toden S, Yoshida K, Toiyama Y, Alberts SR, Kusunoki M, Sinicrope FA, Goel A.

Sci Rep. 2017 Mar 6;7:43393.

査読有

7. Clinical significance of SNORA42 as an oncogene and a prognostic biomarker in colorectal cancer.

Okugawa Y, Toiyama Y, Toden S, Mitoma H, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A.

Gut. 2017 Jan;66(1):107-117.

査読有

8. Circulating microRNA-1290 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in human colorectal cancer.

Imaoka H, Toiyama Y, Fujikawa H, Hiro J, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Mori T, Kato T, Toden S, Goel A, Kusunoki M.

Ann Oncol. 2016 Oct;27(10):1879-86

査読有

9. Diagnostic Potential of Cell-Free and Exosomal MicroRNAs in the Identification of Patients with High-Risk Colorectal Adenomas.

Uratani R, Toiyama Y, Kitajima T, Kawamura M, Hiro J, Kobayashi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Mori T, Kato T, Goel A, Kusunoki M.

PLoS One. 2016 Oct 19;11(10):e0160722.

査読有

10. FOXM1 and FOXQ1 Are Promising Prognostic Biomarkers and Novel Targets of Tumor-Suppressive miR-342 in Human Colorectal Cancer.

Weng W, Okugawa Y, Toden S, Toiyama Y, Kusunoki M, Goel A.

Clin Cancer Res. 2016 Oct 1;22(19):4947-4957.

査読有

11. Elevated serum concentration of monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4) as a novel non-invasive prognostic and predictive biomarker for detection of metastasis in colorectal cancer. Okugawa Y, Toiyama Y, Mohri Y, Tanaka K, Kawamura M, Hiro J, Araki T, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. J Surg Oncol. 2016 Sep;114(4):483-9  
査読有

12. Serum Angiopoietin-like Protein 2 Improves Preoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer. Toiyama Y, Inoue Y, Shimura T, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M. Anticancer Res. 2015 May;35(5):2849-56  
査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 北嶋貴仁、問山裕二、志村匡信、今岡裕基、沖上正人、安田裕美、奥川喜永、大北喜基、吉山繁幸、廣純一郎、三枝晋、井上幹大、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、田中光司、井上靖浩、内田恵一、毛利靖彦、楠 正人：大腸腺腫患者における非侵襲的診断マーカーとしての血清およびエクソソーム micro RNA の比較検討. 第 87 回大腸癌研究会、四日市、2017.7.7

2. 奥川喜永、問山裕二、川村幹雄、廣 純一郎、三枝 晋、森本雄貴、西川隆太郎、濱口哲也、田中光司、浦田久志、田中基幹、井上靖浩、毛利靖彦、三木誓雄、楠 正人：網羅的解析を用いた大腸癌遠隔転移の血清診断マーカーの有用性とその生物学的意義. 第 54 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2016.10.22

3. 奥川喜永、問山裕二、三苫裕喜、長坂岳司、田中光司、井上靖浩、楠 正人：snoRNA 発現の臨床的意義と大腸癌進展メカニズムへの機能的意義の検討. 第 116 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2016.4.14

4. 今岡裕基、問山裕二、浦谷 亮、沖 哲、森浩一郎、志村匡信、藤川裕之、三枝 晋、廣 純一郎、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、井上靖浩、田中光司、毛利靖彦、内田恵一、楠 正人：大腸癌バイオマーカーとしての circulating microRNAs. 第 84 回大腸癌研究会、熊本、2016.1.15

5. 今岡裕基、問山裕二、長野由佳、浦谷 亮、森浩一郎、沖 哲、藤川裕之、三枝 晋、廣 純一郎、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、田中光司、井上靖浩、毛利靖彦、楠 正人：大腸癌における microRNA-1290 発現の機能的ならびに臨床病理学的意義. 第 116 回日本外

科学会定期学術集会、大阪、2016.4.16

6. 森 浩一郎、問山裕二、大竹耕平、長野由佳、浦谷 亮、沖 哲、今岡裕基、藤川裕之、三枝 晋、廣 純一郎、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、井上靖浩、田中光司、毛利靖彦、楠 正人：大腸癌における heat shock protein47 発現の臨床病理学的因子及び予後との関連. 第 116 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2016.4.16

〔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;特に該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠 正人 (KUSUNOKI Masato )  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50192026

### (2) 研究分担者

問山 裕二 (TOIYAMA Yuji )  
三重大学・医学部付属病院・講師  
研究者番号：00422824  
田中 光司 (TANAKA Koji )  
三重大学・医学系研究科・客員准教授  
研究者番号：10345986  
井上 靖浩 (INOUE Yasuhiro )  
三重大学・医学系研究科・客員准教授  
研究者番号：20324535

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )