

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10616

研究課題名(和文) miR-106b-25 clusterを中心としたmiRの発現動態解析

研究課題名(英文) Expression analysis of miR based on miR-106b-25 cluster

研究代表者

星野 敢 (Hoshino, Isamu)

千葉県がんセンター(研究所)・消化器外科・主任医長

研究者番号：10400904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA(miR)-106b-25 clusterの血液中での発現解析ならびに新規バイオマーカーとしての有用性の検証を行った。また、その血清中での存在機序の解明についてhost geneであるMCM7との関連性、細胞外小胞エクソソームの関与に着目し検討を行った。食道扁平上皮癌におけるmiR-106b-25 clusterのバイオマーカーとしての有用性が確認された。miR-106b-25 clusterはhost geneであるMCM7とは腫瘍内において異なる挙動を示し、血清中への分泌についてはエクソソームの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-106bは健常者血清中との比較において患者血清中では有意にその発現が低下しており、一方でmiR-93、25については有意な発現変動を認めなかった。また同時に我々のこれまでの報告からも血清中のmiR-1246高発現は食道癌患者の有力なバイオマーカー候補と考えられているが、多検体を用いてmiR-1246/106bのratioを検討した結果、食道癌のスクリーニングにおいてAUC 0.901、感度：80.0%、特異度：80%と極めて良好な結果が得られた。また、miR-106bの血清中の発現には細胞外小胞エクソソームが関与しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the expression levels of microRNA(miR)-106b-25 cluster in serum and verified its usefulness as a novel biomarker. In addition, we investigated the mechanism of its existence in serum by focusing on the relationship with host gene MCM7 and the involvement of extracellular vesicle exosomes. The utility of the miR-106b-25 cluster as a biomarker in esophageal squamous cell carcinoma was confirmed. The miR-106b-25 cluster behaved differently from the host gene MCM7 in the tumor, suggesting the involvement of exosomes in the secretion into the serum.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 microRNA バイオマーカー microRNA-106b エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の診断、治療法開発において新たなイノベーションの出現によりジェネティック、エピジェネティック双方の領域で飛躍的な進歩が得られた。現在それらの技術を応用し、各国において新規の癌の標的特定、創薬開発へのプラットフォーム構築が競争的に行われている。エピジェネティックな領域においては DNA のメチル化、ヒストン修飾、microRNA (以下、miR) の探索・特定が積極的に行われており、それらの研究成果を基盤とした臨床応用も一部達成されている。miR はタンパク質をコードしないが活発に転写後の遺伝子を制御するとされ、各種悪性腫瘍において発現プロファイリングがなされ、さらに個々の miR についても機能解析が精力的に行われている。我々も食道癌患者を対象とし組織、血清中での miR の発現プロファイリングを施行し、個々の miR の発現の意義の検討を行ってきた (Int J Can 2010, Br J Cancer 2013, Br J Cancer 2014, etc.)。結果、食道癌組織中にて発現が低下する miR-133a、145、375 等が腫瘍抑制因子としての機能を有することを報告した。また、癌患者血清中で有意に上昇する miR-1246 に着目し詳細を検討した結果、食道癌の新規腫瘍マーカーとして既存の腫瘍マーカーを感度、特異度ともに上回ること、その分泌動態にエクソソームを介した細胞間輸送が関与することを報告した (Br J Cancer 2013)。

一方で、血清 miR のプロファイリングでは、癌患者で発現が有意に低下する miR も特定された。我々の結果では 5 つの有意に発現が低下する miR が特定されたが、そのうち miR-106b と miR-93 は miR-25 とともに miR-106b-25 cluster を形成する構成要素であることが確認された。miR-106b-25 cluster は、7q22.1 に位置する MCM7 (mini-chromosome maintenance 7) 遺伝子の intron13 にその配列を有する。我々は、この cluster に注目し、エクソソームなどの輸送体を中心にその血清中での発現のメカニズムの解析を行うこととした。

2. 研究の目的

- (1) 食道扁平上皮癌 (ESCC) 患者を対象とし miR-106b の血清中での発現を検討し新規バイオマーカーとしての有用性を明らかとする。
- (2) 癌部、非癌部における MCM7、miR-106b-25 cluster のゲノム配列におけるコピー数多型、個々のプロモーターの検討を中心とした発現解析を行う。
- (3) miR-106b の組織から血中への移行動態を細胞外小胞であるエクソソームによる能動的な分泌機構を中心に解析することで miR のコミュニケーションツールとしての機能解析を行う。

千葉大学先端応用外科での検討において miR-106b のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。今後千葉県がんセンターバイオバンクに集積される患者血清を用いて更に多検体を用いて検証することにより臨床応用に向けた開発につなげることを目的とした。また、これまでに報告を行ってきた、食道癌患者血清中で発現が上昇する miR-1246 等との比を用いることでさらに有用性が増す可能性があるため検証する。

3. 研究の方法

- (1) miR-106b の血清中での発現を検討し新規バイオマーカーとしての有用性の検討

千葉大学大学院医学研究科 (No. H29-0005) もしくは、千葉県がんセンター (No. H29-0005) の倫理委員会の承認を得たのち、患者からの承認を得たサンプルを使用した。2013 年 4 月から 2016 年 4 月までの間に、千葉大学大学院医学研究科で ESCC 患者 55 人と健常者 39 人から静脈血サンプルを採取した (test cohort)。また、2016 年 4 月から 2019 年 4 月までの間に、千葉県がんセンターで、ESCC 患者 101 人と健常者 34 人から静脈血サンプルを採取した (validation cohort)。これらのサンプルは、内視鏡的切除、手術、化学療法、および放射線療法を含むあらゆる治療の前に収集された。静脈血サンプルを 4 で 5 分間 1500 × g で遠心分離して、血清を得た。サンプルは -80 で保存された。miRNeasy Serum / Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して、200 μL の血清、尿、唾液から総 RNA を抽出した。spike-in control として cel-miR-39 を用いた。total RNA は、miScript II RT キット (Qiagen) を使用して cDNA に逆転写された。各反応で、50 ng (12 μL) のテンプレート RNA を、4 μL の 5 × miScript HiSpec バッファー、2 μL の 10 × miScript Nucleics Mix、および 2 μL の miScript Reverse Transcriptase Mix を含むマスターミックスと組み合わせ、37 で 60 分間インキュベーションを行った。反応物を 95 で 5 分間インキュベーションして氷上に移した。7300real-timePCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) で miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を使用して、定量的 RT-PCR を行った。miR-106b および miR-1246 の発現レベルは、miR-39 の発現レベルを参照とした。相対的な miR-1246 または miR-106b の発現は、2- Ct method を使用して計算された (Ct = Ct (miR-1246 または miR-106b) - Ct (cel-miR-39))。

- (2) 癌部、非癌部組織中における host gene、MCM7 および miR-106b-25 cluster の発現レベルの確認、miR-106b-25 cluster のゲノム配列におけるコピー数多型の確認。

2013 年 4 月から 2016 年 4 月までの間に、千葉大学大学院医学研究科で術前未治療にて手術を

行った ESCC 患者 103 人の手術標本より癌部、非癌部を採取した。サンプルは-80 で保存された。miRNeasy® Mini Kit (Qiagen) を使用して総 RNA を抽出した。totalRNA は、miScript II RT キット (Qiagen) を使用して cDNA に逆転写された。7300real-timePCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) で miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を使用して、定量的 RT-PCR を行った。MCM7 gene は primer 3 software を用いて作成した primer にて 7300real-time PCR system (Applied Biosystems) で miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を使用して、定量的 RT-PCR を行った。GAPDH の発現を参照とした。同様に組織 22 検体中の miR-106b-25 cluster の発現を評価した。また、copy number variations (CNVs) について MCM7 遺伝子のゲノム配列上に 4 か所の primer を設定し癌部、非癌部より抽出した DNA を用いて Type-it CNV Probe PCR +qC Kit (Qiagen) にて評価を行った。

(3) miR-106b-25 cluster の血清中での存在メカニズムの解析

miR-106b-25 cluster の血清中での存在が能動的である可能性が考えられ、その機序として細胞外小胞エクソソームによる腫瘍からの放出が可能性として挙げられた。そのため、患者並びに健常者血清サンプルを用いて、血清 total での miR-106b-25 cluster と、エクソソーム画分での miR-106b-25 cluster の発現量を比較することとした。エクソソーム抽出には exoEasy Maxi Kit (Qiagen) を用いた。ESCC 患者 3 人と健常者 3 人から静脈血サンプルを採取し用いた。miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を使用して、定量的 RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) miR-106b の血清中での発現を検討し新規バイオマーカーとしての有用性の検討

計 156 人の ESCC 患者からの検体が収集され、55 人が test cohort、101 人が validation cohort とした。双方で、miR-1246 の発現は ESCC 患者の方が健常対照よりも有意に高いことが確認された (図 1A、1B、1D、1E)。一方、ESCC 患者では miR-106b の発現が健常者よりも有意に低いことが確認された (図 2A、2B、2D、2E)。ROC 曲線分析により、各体液中の ESCC の診断指標としての miR-1246 の感度を明らかにした (図 1C、1F)。AUC (Area Under Curve) は、test cohort で 0.816 (感度 72.7%、特異度 69.2%) validation cohort で 0.779 (感度 71.3%、特異度 70.6%) であった。また、ROC 曲線分析により、同様に miR-106b の感度が明らかとなった (図 2C、2F)。AUC は、test cohort で 0.716 (感度 65.5%、特異度 61.6%) validation cohort で 0.815 (感度 74.3%、特異度 73.5%) であった。結果は、miR-1246 が以前のレポートとほぼ同じ感度と特異性を示し、miR-106b も軽度から中程度の感度と特異性を示した。

Figure 1. Serum miR-1246 expression in ESCC patients

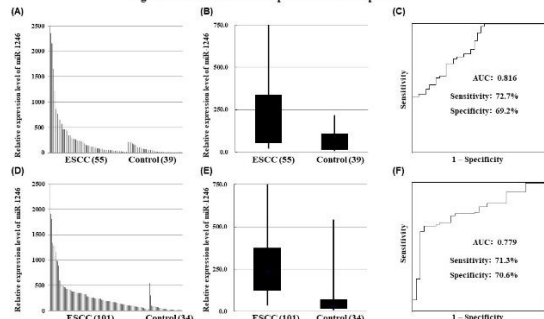
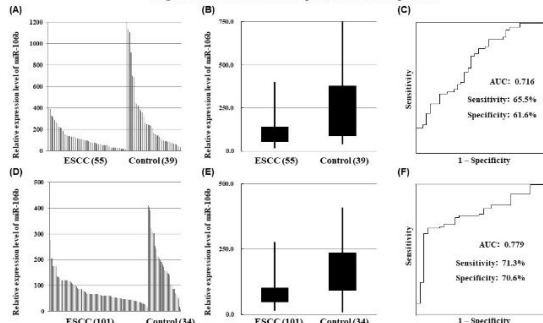
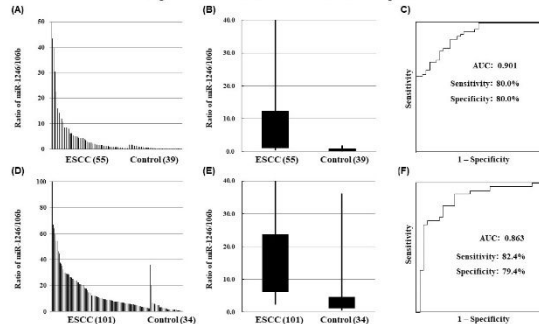


Figure 2. Serum miR-106b expression in ESCC patients

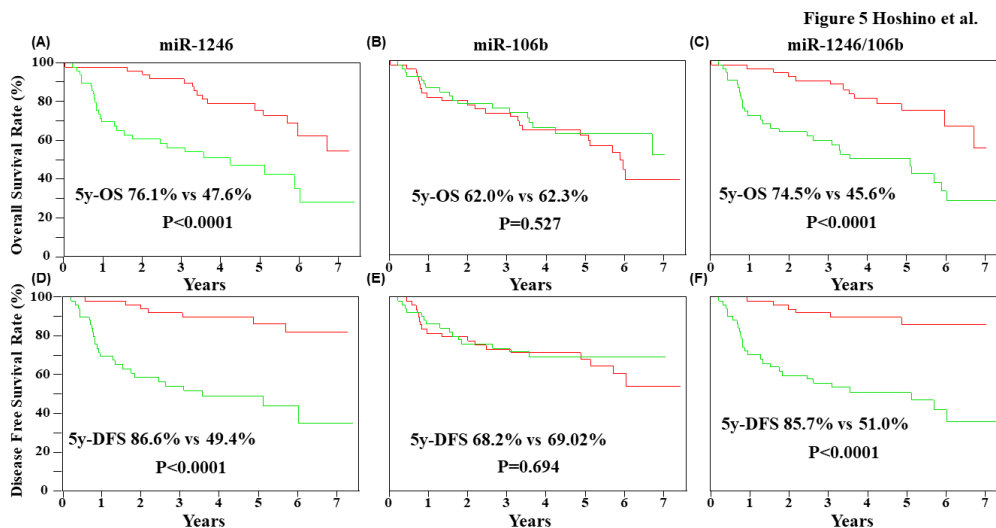


ESCC 患者の血清中の miR-1246 および miR-106b は、軽度から中程度の診断能力があることが確認された。そのため、miR-1246 と miR-106b の比率の方が診断能力が高い可能性が示唆された。実際、miR-1246 / miR-106b の比では、test cohort で 0.901 (感度 80.0%、特異度 80.0%) validation cohort で 0.903 (感度 82.1%、特異度 82.3%) と単独の結果より良好であった (図 3)。統計分析を実施して、miR-1246 / miR-106b レベルと ESCC の臨床病理学的因子との間に関連性が存在するかどうかを解析した。患者サンプルを中央値の miR-1246 / 106b 発現レベルで分け、高および低グループとした。高い血清 miR-1246 / 106b 比は、腫瘍の深さ、リンパ節転移陽性、ステージ、およ

Figure 3. Serum miR-1246/106b ratio in ESCC patients



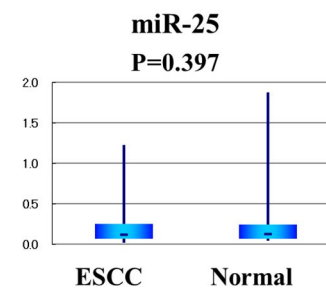
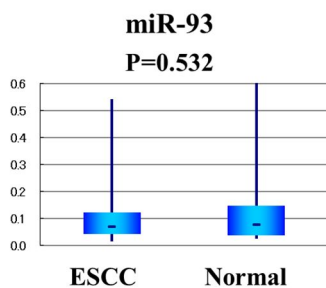
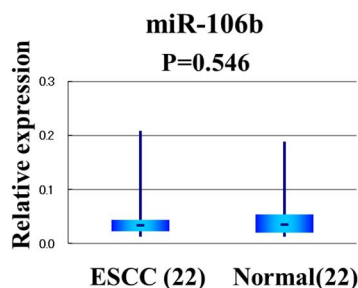
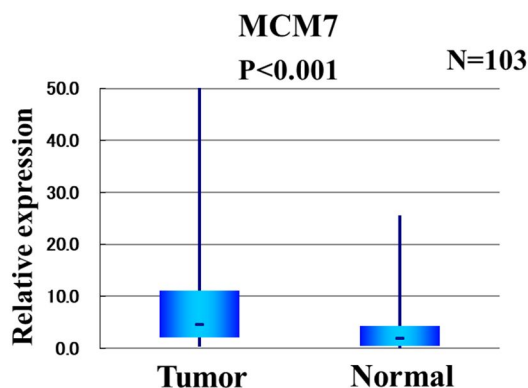
び患者の生存と有意な相関を示した。生存分析は Kaplan-Meier 法を使用して検討した。統計分析はログランク検定を使用した。上記の患者グループを使用して、miR-1246、miR-106b、および miR-1246 / miR-106b の発現と予後の関係を確認した。血清 miR-1246 の発現が高いグループの予後は、血清 miR-1246 の発現が低いグループの予後よりもはるかに悪かった ($p < 0.001$)。5年生存率は、miR-1246 の発現が高いグループと低いグループでそれぞれ 76.1% と 47.6% であった (図 5A)。一方、血清中の miR-106b 発現レベルと予後との間には相関関係を認めなかった (図 5B)。さらに、miR-1246 / 106b の比は、miR-1246 と同様に予後との相関を示した。5年全生存率は、miR-1246 / miR-106b 比が高いグループと低いグループでそれぞれ 74.5% と 45.6% でした (図 5C)。5年無病生存率は、miR-1246 の発現が高いグループと低いグループでそれぞれ 86.6% と 49.4% であった (図 5D)。一方、血清中の miR-106b 発現レベルと予後との間には相関関係は認めなかった (図 5E)。さらに、5年間の無病生存率は、miR-1246 / miR-106b 比が高いグループと低いグループでそれぞれ 85.7% と 51.0% であった (図 5F)。



(2) 癌組織中における host gene、MCM7 および miR-106b-25 cluster の発現レベルおよび miR-106b-25 cluster のゲノム配列におけるコピー数多型

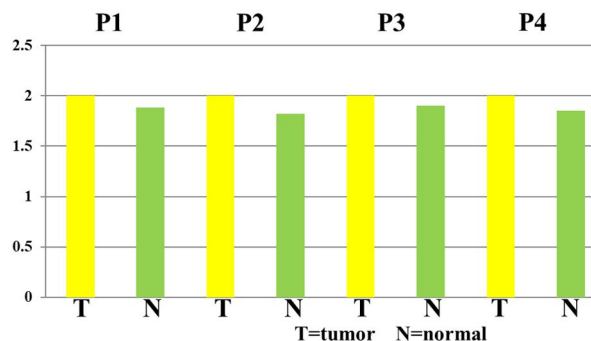
PCR をもちいて host gene である MCM7 の発現を検討した結果、癌部において高い発現が確認された。臨床病理学的因子との関連性について検討したところ、癌の深達度とのみ相関が確認された。

次いで組織中での miR-106b-25 cluster の発現を同様に PCR で検討したところ host gene である MCM7 の発現が癌部で高かったのに対し、いずれの miR-106b-25 cluster の miR も癌部と非癌部で組織中での発現には差を認めなかった。



またゲノム配列を用いて MCM7 遺伝子およびその intron 上に存在する、miR-106b-25 cluster の各々の発現を反映する配列部位にプライマーを設定し CNV の有無を確認したが、右図に示される通り、いずれの配列においても、癌部と非癌部におけるコピー数の多型は確認されなかった。

	P1		P2		P3		P4	
A	2	1.94	2	1.80	2	1.91	2	1.71
B	2	1.67	2	1.83	2	1.68	2	1.64
C	2	2.04	2	1.83	2	2.11	2	2.21
Ave.	2	1.88	2	1.82	2	1.90	2	1.85



(3) miR-106b-25 cluster の血清中での存在メカニズムの解析
血清中のエクソソームを抽出し RT-PCR にて miR-106b-25 cluster の発現を確認しトータル

の血清での値との比較を行った。その結果、それらの値は極めて近似しており、血清中の miR-106b、25、93 の存在はエクソソームによる能動的な輸送が関与している可能性が強く示唆された。miR-106b については健常者血清を用いて同様の検討を行った。その結果、ESCC 患者血清と同様にトータル血清とエクソソーム画分での発現は近似していた。

以上より、食道扁平上皮癌における miR-106b-25 cluster のバイオマーカーとしての有用性が確認された。miR-106b-25 cluster は host gene である MCM7 とは腫瘍内において異なる挙動を示し、血清中への分泌についてはエクソソームの関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hoshino I, Takahashi M, Akutsu Y, Murakami K, Matsumoto Y, Suito H, Sekino N, Komatsu A, Iida K, Suzuki T, Inoue I, Ishige F, Iwatate Y, Matsubara H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Genome-wide ChIP-seq data with a transcriptome analysis reveals the groups of genes regulated by histone demethylase LSD1 inhibition in esophageal squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 872-881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.10350.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino I, Yokota H, Ishige F, Iwatate Y, Takeshita N, Nagase H, Uno T, Matsubara H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Radiogenomics predicts the expression of microRNA-1246 in the serum of esophageal cancer patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59500-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishige F, Hoshino I, Iwatate Y, Chiba S, Arimitsu H, Yanagibashi H, Nagase H, Takayama W	4. 巻 10
2. 論文標題 MIR1246 in Body Fluids as a Biomarker for Pancreatic Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65695-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 星野 敢、横田 元、岩立 陽祐、石毛 文隆、鍋谷 圭宏、筆宝 義隆、永瀬 浩喜
2. 発表標題 食道癌における、Radiogenomics理論による、治療予測、予後予測の試み
3. 学会等名 日本癌学会学術総会（第77回）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 星野 敢, 石毛 文隆, 岩立 陽祐, 滝口 伸浩, 池田 篤, 早田 浩明, 外岡 亨, 佐藤 菜実, 永瀬 浩喜, 鍋谷 圭宏
2. 発表標題 クリニカルバイオバンクを活用したトランスレーショナルリサーチの取り組み
3. 学会等名 日本食道学会 (第72回)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 星野 敢, 横田 元, 石毛 文隆, 岩立 陽祐, 滝口 伸浩, 高山 亘, 池田 篤, 早田 浩明, 千葉 聡, 外岡 亨, 柳橋 浩男, 坂本 俊哉, 鍋谷 圭宏
2. 発表標題 食道癌治療効果予測、予後予測のためのRadioepigenomics理論の創出
3. 学会等名 日本外科学会 (第119回)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Isamu Hoshino, Fumitaka Ishige, Yosuke Iwadate, Nobuhiro Takiguchi, Atsushi Ikeda, Hiroaki Soda, Toru Tonooka, Nami Sato, Yoshihiro Nabeya
2. 発表標題 Evaluation of Prediction System in Treatment Effect and Prognosis of Esophageal Cancer Based on Radioepigenomics Theory
3. 学会等名 The International Society for Diseases of the Esophagus 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 星野 敢, 村上 健太郎, 加野 将之, 大塚 亮太, 関野 伸史, 横山 将也, 鍋谷 圭宏, 永瀬 浩喜, 松原 久裕
2. 発表標題 miR-106b-25 clusterを中心としたmiRの発現動態解析
3. 学会等名 日本癌学会学術総会 (第76回)
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

1. 発表者名 星野 敢, 竹下 修由, 鍋谷 圭宏, 滝口 伸浩, 池田 篤, 早田 浩明, 外岡 亨, 坂本 俊哉, 松原 久裕
2. 発表標題 血清microRNAは食道癌のバイオマーカーとして有用か?
3. 学会等名 日本臨床外科学会総会 (第79回)
4. 発表年 2017年~2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考