

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15656

研究課題名(和文)エクソソーム含有テロメアRNA定量系による血液中がんバイオマーカー測定法の開発

研究課題名(英文)Utility of cell-free TERRA packaged in extracellular vesicles as circulating cancer biomarker.

研究代表者

小林 千晶 (Kobayashi, Chiaki)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：20747828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではtelomere repeat-containing RNA (TERRA)に着目し、エクソソーム内TERRAの新規定量系を構築し、がん個別化医療に有用なバイオマーカーとして開発を目的とした。骨髓異形成症候群(MDS)患者の臨床サンプルを用いて血漿中エクソソームTERRAの発現について検証した。健常者とMDS患者の血漿中エクソソームTERRAの発現量を比較したところ、low risk患者、high risk患者、post AML/MDS患者ともに有意に発現が上昇していた。MDS患者においては血漿中エクソソームTERRAを定量してバイオマーカーにでき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

本研究の特色は(1)体液診断の一環として、(2)エクソソームを試料とし、(3)テロメア制御分子であるTERRAをバイオマーカーとして臨床応用するための検出系を構築することである。本研究の成果が臨床応用されれば、テロメア動態の非侵襲的モニタリングが可能となる。また、固形腫瘍のみならず、造血器腫瘍においても、末梢血液中に腫瘍細胞が出現していない病態、たとえば骨髓浸潤のない悪性リンパ腫や多発性骨髄腫、そして造血幹細胞移植後などにおいて、がん個別化医療の実現にむけて臨床的意義は大きい。以上、従来のCTC解析と異なり、本手法は造血器腫瘍を含めたがん全体の体液診断への新たなアプローチとなりえる。

研究成果の概要(英文)：Despite the fact that telomere dysfunction is frequently seen in tumor, little is known about telomere repeat-containing RNA (TERRA) that regulates telomere dynamics. Emerging evidences suggest that extracellular vesicles (EVs) in cell-free (cf) fraction act as a mediator of cell-cell interaction in human cancer. The EVs contain long non-coding RNA, including telomere repeat-containing RNA (TERRA). To determine whether cf-TERRA could be a molecular marker for treating myelodysplastic syndrome (MDS) patients, we analyzed both TERRA and cf-TERRA in this study. We evaluated the TERRA localization in BM samples obtained from MDS patients. The TERRA foci were significantly increased in post-MDS AML compared with untreated MDS. Notably, the cf-TERRA in EVs could reflect TERRA expression levels in BM cells. Our results suggest that increased TERRA expression might be Instead of BM cells, cf-TERRA could be a putative molecular marker for treating MDS patients.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：テロメアRNA エクソソーム 骨髓異形成症候群 リキッドバイオプシー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) リキッドバイオプシーの意義とエクソソーム解析手法の進歩

近年、リキッドバイオプシーによる試料を用いる体液診断はがんの非侵襲的診断として注目されている。体液診断としては血液中を循環するごく微量のがん細胞 (CTC: circulating tumor cells) の転移などの腫瘍浸潤度との関係、循環微量 DNA 断片を用いた体細胞変異解析やメチル化異常解析、分泌型 miRNA による診断、そしてエクソソームによる診断などが治療方針を決定するためのコンパニオン診断として精力的に研究されている。その中でもエクソソーム解析手法は飛躍的に進歩し、エクソソーム内には miRNA のみならず、lncRNA も内包されていることが明らかになった。一方で、テロメアの解析は古典的なサザンプロット法による平均テロメア長測定、テロメア FISH 法や 3D テロメア解析、テロメア断片の PCR による定量などいずれも体液診断には適さないものであったが、がんの予後や薬剤感受性と関係していることが報告されているテロメア RNA (Telomeric repeat-containing RNAs: TERRA) も lncRNA の一種であることより、Cell-free 分画よりエクソソームを回収して解析することにより定量系の構築が可能ではないかと本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

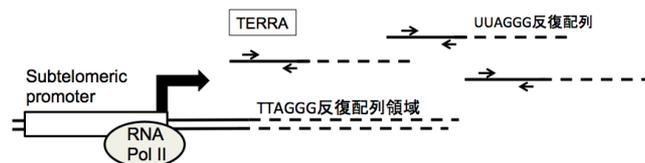
がんや老化と深く関係するテロメア長やテロメラーゼの測定は体液診断には不向きであったが、TERRA は lncRNA の一種であることより、本研究ではがんにおけるテロメア関連因子の診断法の一つとしてエクソソーム内に包括される TERRA の新規定量系を構築し、がん個別化医療に有用なバイオマーカーとして開発することを目的とした。

本研究の遂行に際しては以下の二段階で検討した。まず、各種がん細胞株の Cell-free 分画 (培養上清) のエクソソームから抽出した RNA を材料として細胞における TERRA の発現を反映しているかどうか、正常細胞との差を検証した。次に、定量系に発展させてヒト試料で実用可能かどうかを判定するために、患者試料を用いた解析を行なった。エクソソーム解析については学内の倫理委員会の承認を得ている骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS) および多発性骨髄腫 (Multiple myeloma: MM) 患者を対象として臨床スタッフの協力を得て、研究を遂行した。そして、エクソソーム内の TERRA 発現による早期診断、再発予知、予後診断などについて検証し、体液診断としての有用性を総括した。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム PCR を用いた細胞内 TERRA および cell free-TERRA の検出系の確立

染色体末端のテロメアはヒトでは TTAGGG の反復配列を有し、UUAGGG 反復配列をもつ 100b~9kb の非翻訳 RNA として転写されることが知られている (右図)。TERRA は、サブテロメア領域から



テロメアに分布し、テロメア DNA と G-quadruplex 構造を形成し、さらにテロメラーゼ中の RNA (TERC) とも結合してテロメア伸長の阻害を引き起こす。このようにがんにおいてもテロメア維持機構に関与し、その分子病態の鍵を握っていることが推定される。TERRA は図に示したように染色体末端のサブテロメア領域に転写開始点を有しており、サブテロメア領域の一部を含んだ UUAGGG 反復配列の一本鎖 RNA となる。そこで、TERRA-PCR ではこのサブテロメア領域をターゲットとしたプライマーを用いて、定量リアルタイム PCR を行なった。

白血病細胞株 (U937, HL-60, K562)、悪性リンパ腫細胞株 (SUDHL4, Raji)、多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226, KMS-11)、肺癌細胞株 (SCT-1, RERF-LC-AI)、卵巣癌細胞株 (Kuramochi) など現有の細胞株を用いて解析し、対照としては健康人由来の骨髄間質細胞 (LONZA 社より購入)、EBV transformed B cell line 等を用いた。さらに、これらの細胞株の培養上清より ExoQuick-TC (System Biosciences) を用いてエクソソーム分画を分離し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) にて RNA を抽出後、qRT-PCR にて細胞内 TERRA と cf-TERRA の発現を比較した。

(2) 患者試料を用いた解析

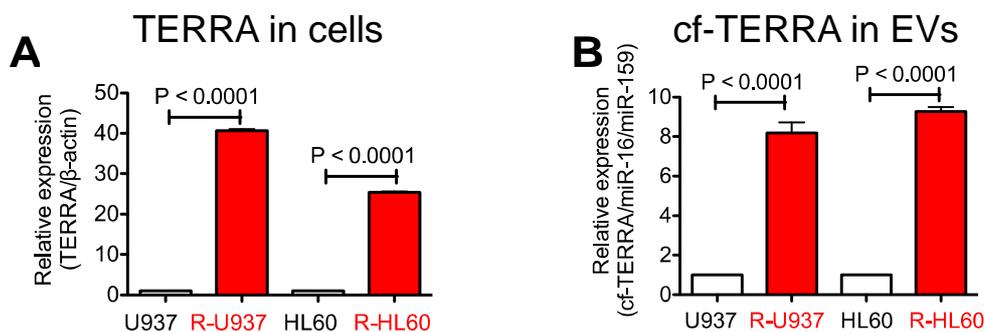
血液内科学分野スタッフの協力を得てバイオバンクに保存してある試料および新規症例についても解析を行なった。体液診断としての対照は健康人血漿を用いた。未治療の MDS 患者 18 名および post-MDS AML 患者 6 名、MM 患者 33 名の血漿より ExoQuick を用いてエクソソーム分画を分離した。回収されたエクソソームから RNeasy Mini Kit (Qiagen) にて total RNA を抽出し、細胞株で構築した qRT-PCR の系を用いて cell free-TERRA を定量し、エクソソーム由来 TERRA の MDS 患者と健康人との比較を行なった。

4. 研究成果

(1) 細胞内 TERRA および cell free-TERRA の検出系の確立

各腫瘍由来細胞株を用いて、安定したアッセイ系の確立を行なった。各種がん細胞株の細胞から、または Cell-free 分画（培養上清）のエクソソームから抽出した RNA を材料としてリアルタイム PCR を用いて TERRA の定量を実施し、細胞内での TERRA の発現を反映しているかどうか、正常細胞における発現とどのように異なるかを検証した。細胞内 TERRA は β -actin で、エクソソーム内の cell free-TERRA はスパイクコントロールとして用いた miR-159a でノーマライズを行った。その結果、がんの種類によって TERRA の発現パターンは様々であったが、例えば白血球由来細胞株では、細胞内 TERRA は低発現なのに対し、エクソソーム内 TERRA は高発現していた。正常細胞（骨髄間質細胞、EBV transformed B cell line）と比較して、多発性骨髄腫由来細胞株では細胞内 TERRA も cell free-TERRA も高発現であった。

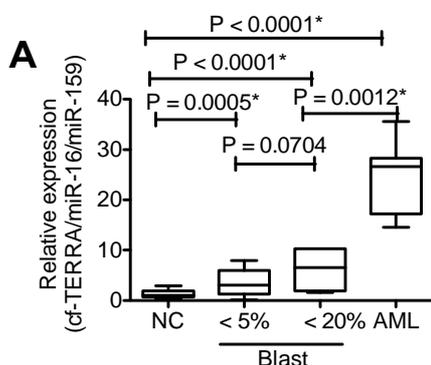
さらに、細胞内 TERRA の発現が低かった白血球由来細胞株 U937 および HL-60 において、DNA 脱メチル化剤である 5-azacytidine (AZA) を投与し続けて作成した AZA 耐性株との比較を行なった結果、親株（U937, HL60）に比べて耐性株（R-U937, R-HL60）で細胞内 TERRA の発現が著増していた（下図 A 参照）。また、耐性株における細胞内 TERRA の発現上昇は、耐性株由来エクソソーム内での TERRA の発現にも影響しており、R-U937 および R-HL60 由来の cell free-TERRA の発現は親株と比較して増加していた（下図 B 参照）。



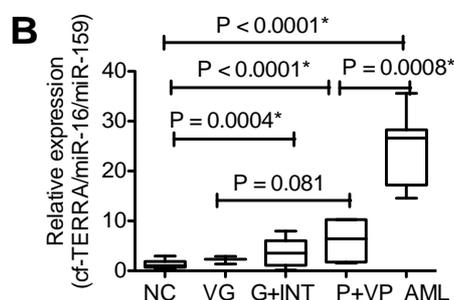
(2) 患者血漿内の cell free-TERRA の発現解析

上記の解析系を用いて、学内の倫理委員会の承認を得てバイオバンク内で保有している MDS および MM 患者の臨床サンプルを用いて血漿中エクソソーム TERRA の発現について検証した。血液内科学分野スタッフの協力を得てバイオバンクに保存してある MDS 患者および MM 患者由来の血漿サンプルに加え、新規症例についても血漿を回収した。体液診断としての対照は健康者血液の血漿を用いた。健康者 25 名におけるエクソソーム TERRA の発現量を 1 として、MDS 患者 22 名 (low risk 患者: 6 名, high risk 患者: 8 名, post AML/MDS 患者: 8 名) の血漿中エクソソーム TERRA の発現量を比較したところ、low risk 患者 ($p=0.007$)、high risk 患者 ($p=0.003$)、post AML/MDS 患者 ($p<0.0001$) とともに有意に発現が上昇していた。特に post AML/MDS 患者では平均値にして 30 倍に著増していることが明らかとなった。下図は、MDS 患者の芽球率および細胞遺伝学的診断と cell free-TERRA の関係を解析した結果である。芽球率が 20% 以上の MDS 患者において cf-TERRA の発現が健康者と比較して上昇する傾向にあり、特に post-MDS AML 患者では cf-TERRA の発現が著増していた（下図 A）。これらのことから、IPSS-R のスコアリングシステムに必要な MDS 患者の芽球率や染色体異常が cell free-TERRA の発現変化と関係性があることが示唆された。

【cf-TERRA and % of blast】



【cf-TERRA and cytogenetics】



NC: normal control, VG, very good, G, good, INT, intermediate, P, poor, VP, very poor separated by Cytogenetic scoring system for IPSS-R.

また、MM の前がん病態とされる MGUS 患者 11 名および MM 患者 36 名での比較では、MM 患者

血清中のエクソソーム TERRA が健常者と比較して顕著に上昇していた(p=0.0015)。一方で、MGUS 患者 では健常者と有意な差は見られなかった。以上のことより、MDS 患者および MM 患者においては血漿中エクソソーム TERRA を定量してバイオマーカーとして用いることができる可能性が示された。

臨床材料における TERRA の検出には腫瘍組織における RNA-FISH 法が一般的には用いられてきたが、腫瘍組織を用いた RNA-FISH という手法は早期診断や再発予知を目的としたリキッドバイオプシーのような非侵襲的診断法には不向きであることが最大の問題であったが、エクソソーム内に包括される TERRA を用いて、がん個別化のための非侵襲性バイオマーカーとして有用であると考えられる。今後は、固形腫瘍における本法の体液診断としての実用化の可能性についても考慮していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ito Y, Umezu T, Tadokoro K, Saito Y, Katagiri S, Suguro , Asano M, Yoshizawa S, Akahane D, Tanaka Y, Fujimoto H, Okabe S, Gotoh M, Tauchi T, Kawana C, Ohyashiki JH, Nakamura N, Ohyashiki K. BIM deletion polymorphism accounts for lack of favorable outcome in Japanese females with follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2019; 60(5): 1283-1288. 査読有

DOI: 10.1080/10428194.2018.1529310.

Imanishi S, Umezu T, Kobayashi C, Ohta T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Chromatin Regulation by HP1 Contributes to Survival of 5-Azacytidine-Resistant Cells. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 1166. 査読有

DOI: 10.3389/fphar.2018.01166.

Yoshizawa S, Umezu T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Exosomal miRNA Signatures for Late-Onset Acute Graft-Versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(9): E2493. 査読有

DOI: 10.3390/ijms19092493.

Umezu T, Imanishi S, Azuma K, Kobayashi C, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki K, Ohyashiki JH Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells with miR-340 inhibits myeloma-related angiogenesis. *Blood Adv*. 2017; 1(13): 812-823. 査読有

DOI: 10.1182/bloodadvances.2016003251.

Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Kobayashi C, Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via activation of pyrimidine salvage in 5-azacytidine-resistant leukemia cells. *Oncotarget*. 2017; 8(41): 69906-69915. 査読有

DOI: 10.18632/oncotarget.19436.

Asano M, Umezu T, Katagiri S, Kobayashi C, Tauchi T, Gotoh M, Ando K, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Up-regulated exosomal miRNA-140-3p in CML patients with musculoskeletal pain associated with discontinuation of tyrosine kinase inhibitors *Int J Hematol*. 2017; 105(4): 419-422. 査読有

DOI: 10.1007/s12185-017-2199-z.

〔学会発表〕(計 7 件)

Imanishi S, Azuma K, Umezu T, Kawana C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. 5-azacytidine targets chromatin regulation through piRNA pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年

Ohyashiki K, Saitoh Y, Imanishi S, Umezu T, Yoshizawa S, Asano M, Fujimoto H, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH. Extracellular vesicles (EVs) released by bone marrow stromal cells show a distinct miRNA profile in high-risk MDS patients. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes(国際学会) 2017 年

Ohyashiki JH, Umezu T, Kobayashi C, Imanishi S, Asano M, Ohyashiki K. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) in MDS: Utility of cell-free TERRA packaged in extracellular vesicles. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes(国際学会) 2017 年

Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Umezu T, Yoshizawa S, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via activation of pyrimidine salvage in 5-azacytidine-resistant leukemia cells. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes(国際学会) 2017 年

Ohyashiki K, Asano M, Umezu T, Katagiri S, Kobayashi C, Tauchi T, Gotoh M, Ando K, Okabe S, Ohyashiki JH. miRNA profiling of circulating extracellular vesicles in CML patients with musculoskeletal pain associated with discontinuation of tyrosine kinase inhibitors. 22nd Congress of European Hematology Association(国際学会) 2017

年

Yoshizawa S, Umezu T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Altered exosomal miRNA expression of late onset acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The 79th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology (JSH2017) 2017 年

Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Umezu T, Kobayashi C, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Teriflunomide, a de novo pyrimidine synthesis inhibitor, prevents 5-azacytidine resistance. The 79th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology (JSH2017) 2017 年

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：大屋敷 純子

ローマ字氏名：(OHYASHIKI, junko)

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。