

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09688

研究課題名(和文) 前立腺癌由来尿中・組織エクソソーム網羅的miRNA解析および新規核酸治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of miRNA in urinary and tissue-exudative exosomes of prostate cancer

研究代表者

松崎 恭介 (Kyosuke, Matsuzaki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90747081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：尿中のエクソソーム内miRNA(miR-30b-3p、miR-126-3p)は、生検陰性患者と比較して、前立腺癌患者の尿中エクソソームで有意に上昇($p < 0.05$)していることが示された。この2個のmiRNAを用いた前立腺癌の診断能は、miR-30b-3pが感度・特異度 = 46.4%・88.0%で、miR-126-3pが感度・特異度 = 60.7%・80.0%であり、血清PSA値の感度・特異度 = 53.5%・64.0%よりも良好という結果であった。以上より、尿中エクソソーム内のmiR-30b-3pとmiR-126-3pは、新規の前立腺癌の診断バイオマーカーになりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在前立腺癌診断のバイオマーカーとしてはPSAが挙げられるが偽陽性も多い。確定診断には生検を必要とするが侵襲性の高い検査であり、より低侵襲の検査が望ましい。我々は採取するのに侵襲のない尿に着目し、尿中のバイオマーカーを探索した。エクソソームと呼ばれる人間の体液中に放出される小胞に着目し、前立腺癌患者の尿中エクソソーム内で有意に増加するmiRNAを同定した。これはPSAよりも鋭敏なマーカーであることが示され、非侵襲的な前立腺癌の新規バイオマーカーとしての有用性が期待される。またこのエクソソーム内miRNAを阻害することで癌の増殖などを抑制できる可能性もあり、研究の応用性も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We isolated EVs from urine obtained following digital rectal examination (DRE) of 14 men with elevated levels of serum prostate-specific antigen (PSA) [negative biopsy ($n=4$) and PCa ($n=10$)]. MicroRNAs extracted from EVs were analyzed by microRNA microarray. MicroRNAs miR-30b-3p and miR-126-3p were identified as being overexpressed in urinary EVs of the PCa patients versus the biopsy-negative men. In the independent cohort, these two microRNAs were overexpressed in urinary EVs from the PCa patients versus the negative-biopsy men. Logistic regression analysis adjusted by age and PSA showed that these two microRNAs were significantly associated with the prediction of PCa in biopsy specimens. Sensitivity and specificity of miR-30b-3p and miR-126-3p for the prediction of PCa were 46.4% and 88.0% and 60.7% and 80.0%, respectively, which were better than those of serum PSA (53.5% and 64.0%, respectively). These miRNAs in urinary EVs could be potential biomarkers of PCa.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：エクソソーム 前立腺癌 miRNA 尿中バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌においては腫瘍マーカーである PSA 検査により早期発見例が増えつつあるが偽陽性も多い。そのため癌の確定診断には侵襲性の高い前立腺生検を要するため、より簡便で低侵襲なバイオマーカーが望まれている。

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、進展し易い環境へと変化させることが明らかになってきている。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 miRNA、mRNA、タンパク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ることができると期待されている。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持ち、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持つことが報告されている。そのため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。

解剖学的に、直腸診後の尿には前立腺癌由来のエクソソームが豊富に含まれており、申請者らはこれまでに、直腸診後の尿中エクソソーム内に含まれる特定のタンパクに着目し、これを選択的に抽出することによって high risk 前立腺癌を診断できることを報告してきた (Sci Rep. 2017 Feb 17;7:42961)。前立腺マッサージ後の尿中エクソソームを用いることで、癌特異的でありかつ非侵襲的なバイオマーカーを探索できると考えられた。

2. 研究の目的

前立腺癌患者の尿中に含まれる miRNA を同定、単離し癌患者特異的であったとする報告は散見されるが、実臨床に応用されているものは極めて少ない。尿中には健常時でも存在するバックグラウンドによって通常の検出法では癌特異的 miRNA の同定は困難であると考えられるためである。しかしエクソソームに着目し、これを濃縮することでより癌特異性をもつ miRNA を探索することが可能となってきた。また解剖学的に、血中のエクソソームと比べ直腸診後の尿中には前立腺癌由来のエクソソームが直接排出されるため、他臓器由来のエクソソームの混入が少ないと考えられる。今回我々は前立腺癌患者の尿中に特異的に内包されている miRNA を探索し、前立腺癌の新規診断バイオマーカーとしての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

PSA 高値で前立腺生検を行った 14 名の患者(生検結果が陰性の患者 6 名、前立腺癌の患者 8 名 [うち Gleason score 3+3 が 3 名、Gleason score 4+3 が 3 名、Gleason score 4+4 以上が 4 名])の前立腺マッサージ後の尿 37.5ml を用いた。超遠心法を用いて尿中のエクソソームを回収し、エクソソーム内部の miRNA を抽出した。尿中エクソソームの回収はウェスタンブロットによるエクソソーム特異的タンパク(CD9、CD63)の検出、ナノ粒子トラッキングシステムおよび電子顕微鏡を用いて確認した。抽出した尿中 miRNA をマイクロアレイにて解析し、癌患者の尿中エクソソーム内で有意に上昇している miRNA を同定し、バイオマーカー候補とした。同定した miRNA 候補に対しては、別のコホートの尿中エクソソームを用いて発現量を RT-PCR 法で測定し、バイオマーカーとしての有用性を検証した。

4. 研究成果

14 名の尿中エクソソーム内 miRNA を用いたマイクロアレイの結果から、前立腺癌患者の尿中エクソソーム内で上昇している 19 個の miRNA を同定し、その中から 2 個の miRNA(miR-30b-3p、miR-126-3p)をバイオマーカー候補 miRNA として選別した。PSA 高値で前立腺生検を行った 53 例(生検陰性患者 25 名、Gleason score 3+3 が 6 名、Gleason score 3+4 が 12 名、Gleason score 4+3 が 6 名、Gleason score 4+4 が 4 名)の患者群を別のコホートとして検証した。このコホートでもこの 2 個の miRNA は、生検陰性患者と比較して癌患者の尿中エクソソームで有意に上昇($p < 0.05$)していることが示された。Low risk group (Gleason score 3+3 および 3+4)、High risk group (Gleason score 4+3 および 4+4)と分類した際の risk group との関連は、どちらの miRNA でも認めなかった。多変量解析を用いると、年齢や PSA 値で調整したとしても、これらの尿中 miRNA は生検陰性患者と前立腺癌患者の間で有意差を持っていた。これらの尿

中エクソソーム内 miRNA を用いた前立腺癌の診断能は、miR-30b-3p が感度・特異度 = 46.4%・88.0%で、miR-126-3p が感度・特異度 = 60.7%・80.0%であり、血清 PSA 値の感度・特異度 = 53.5%・64.0%よりも良好という結果であった。以上より、尿中エクソソーム内の miR-30b-3p と miR-126-3p は、新規の前立腺癌の診断バイオマーカーになりうることを示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kyosuke Matsuzaki, Kazutoshi Fujita et al.	4. 巻 Apr;10(4)
2. 論文標題 MiR-30b-3p and miR-126-3p of urinary extracellular vesicles could be new biomarkers for prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Andrology and Urology	6. 最初と最後の頁 1918-1927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tau-20-421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	藤田 和利 (Kazutoshi Fujita) (50636181)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------