

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18759

研究課題名(和文) 血清エクソソームを用いた口腔癌の再発転移マーカーの探索

研究課題名(英文) Serum exosomal biomaker analysis in oral cancer

研究代表者

木下 崇 (Kinoshita, Takashi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00648462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームと呼ばれる細胞外小胞は癌を含む様々な細胞から分泌されており、その中にはマイクロRNAという遺伝子の発現を制御する核酸が含まれており、他の細胞に情報伝達を行っている。今回口腔癌患者さんの手術治療前の血清からエクソソームを抽出し、全てのマイクロRNAに関して網羅的な発現解析を行った。再発をきたした患者さんと再発をきたしていない患者さんで比較した結果、miR-154-3pおよびmiR-764が再発をきたした患者さんの手術前の血清で発現上昇していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌において手術治療後の再発および転移は大きな予後不良因子であり、それを予測するバイオマーカーの発見と分子メカニズムの解明は急務である。今回行われた研究では術前の3mlの採血から再発の予測を行おうとするものであり、より低侵襲な方法で再発・転移を予測できる可能性が示唆された。また血清エクソソームから同定された再発予測マイクロRNAは腫瘍での発現においても予後不良因子となることが示され、層別化医療に向けて意義のある研究成果となったと考える。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small membrane-bound structures that are secreted by various cell types, including tumor cells. Recent studies indicated that microRNAs are packed in exosomes and can be serum biomarkers for cancer. Here, we conducted small RNA sequencing using serum exosome of oral cancer patients to identify relapse marker. When we compared microRNA profiles of five relapsed patients and four non-relapsed patients, miR-154-3p and miR-763 were identified as relapse markers. In TCGA data analysis, patients with higher expression of miR-154-3p and miR-763 had worse prognosis. A pathway analysis using reactome version 80 showed that Rho signaling pathway was enriched in miR-154-3p putative target genes. Because it has been shown that Rho signaling is implicated in cancer invasion and metastasis, miR-154-3p can lead metastasis by inducing Rho signaling.

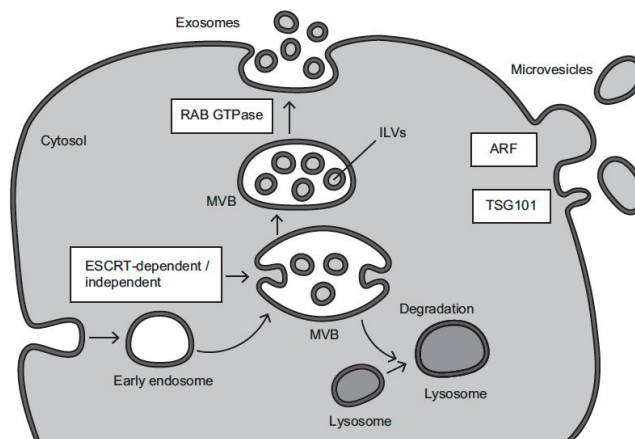
研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：口腔癌 マイクロRNA エクソソーム バイオマーカー 血清 small RNA sequence

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部癌の中で最も頻度が高く、本邦の頭頸部癌のうち 24% を占めている。口腔癌のほとんどの症例では根治治療として手術が選択されており、治療例全体の 5 年生存率は 40～60% と報告されている。病期の早期口腔癌においては 5 年生存率が 70～90% と比較的良好な予後が報告されているが、逆の観点から見ると早期癌であっても 10～30% の症例では不幸な転帰を辿っているわけであり、予後不良因子の探索とそれに併せた層別化医療の提供は急務である。近年、口腔癌の原発腫瘍の深達度が予後に関わることが明らかとなり、2017 年の TNM 悪性腫瘍の分類第 8 版の改定においては臨床病期分類に腫瘍深達度が明記された。また、根治切除後の頸部後発転移は予後規定因子になることが報告されており、早期舌癌における予防的頸部郭清やセンチネルリンパ節生検などにより頸部転移を制御する試みが行われている。しかしながら、後発転移をきたす分子メカニズムは明らかになっておらず、また TNM 分類以外で手術治療前に予後を予測する有効なバイオマーカーは現在のところ確固としたものは存在しない。

エクソソームは、癌を含む様々な細胞から血液を含む様々な体液へ分泌される直径 30～150 nm の脂質二重膜に囲まれた小胞である。エクソソーム内には分泌された細胞由来のタンパク、脂質、mRNA および microRNA (miRNA) が含まれており、これらの分子がエクソソームを介して他の細胞内に伝播され、更に機能することが近年明らかになってきた(右図はエクソソームの合成経路、文献 1 より)。癌においては、癌細胞が分泌するエクソソームが正常細胞や他の癌細胞に取り込まれ、癌の進展・転移を助長することが次々と報告されている。エクソソーム内の miRNA は脂質二重膜で覆われているため、生体内に広く存在する RNase に分解されず安定して体液内に存在しており、バイオマーカーとして適していると考えられる。



2. 研究の目的

本研究では、口腔癌患者の予後不良因子となる miRNA シグネチャーを同定することを目的に、口腔癌患者血清中のエクソソーム分画の miRNA プロファイリングを行う。

これまでに口腔癌患者における血漿中のエクソソーム miRNA を網羅的に発現解析した報告はなく、申請者の研究は新たな知見を生む可能性がある。また本研究では、手術検体を RNAlater という組織保存試薬を用いて保存した後に RNA の抽出を行う。同様の解析を行っている過去の論文のほとんどがホルマリン固定パラフィン包埋された生検検体や手術検体を用いているが、申請者の手法では RNA 分解が非常に少なく、より正確なデータの収集が可能である。

3. 研究の方法

千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部外科にて手術加療を行った患者に十分な説明と同意を得た上で、手術前の血清および手術検体の腫瘍組織を採取し -80℃ で凍結保存した。最低 1 年間以上の観察を行い、再発(局所、頸部および遠隔)と生存期間について追跡した。再発例 5 例と非再発例 5 例の手術前血清 1.5ml から MagCapture Exosome Isolation Kit PS を用いてエクソソームを単離し RNA を抽出した。腫瘍組織からの RNA の抽出は TRizol を用いた。得られた RNA を用いて small RNA sequencing を行い網羅的な miRNA 発現解析を行い再発群で有意に発現上昇していた miRNA を同定した。

4. 研究成果

(1) エクソソーム分離方法の検討

まずは当初予定していたポリマー溶液による沈殿にて血清からエクソソーム分離を試みた。得られたエクソソームから得られた RNA の収量は比較的多いものの、エクソソームマーカー以外のタンパク質の夾雑物が多く、純度の観点から本研究に適さないと判断した。そこで、エクソソームの表面に露出しているホスファチジルセリンに結合する T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4 (Tim4) を固相化したビーズを用いたキット (MagCapture Exosome Isolation Kit PS) を使ってエクソソームの分離方法の最適化を行った。予備実験では血清 1.5ml からの抽出で small RNA シークエンスに必要な量の RNA 収量が得られることが明らかとなった。また分離されたエクソソーム分画はエクソソームマーカーである

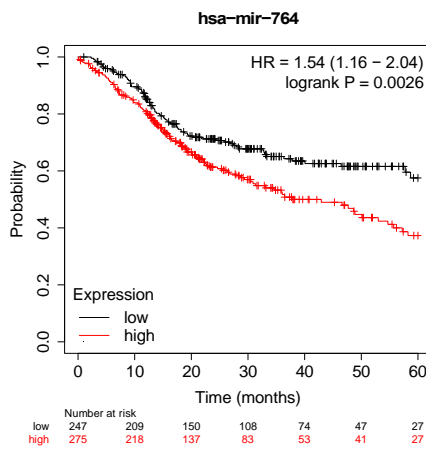
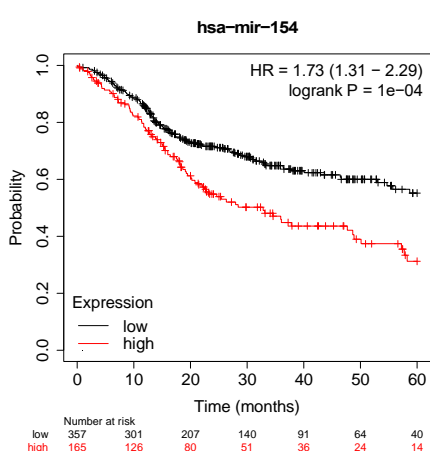
CD9 および CD63 が陽性であることをウェスタンブロット法によって確認した。

(2) 口腔癌患者血清エクソソーム miRNA プロファイリング

引き続き口腔癌患者術前血清を用いてエクソソーム中の miRNA プロファイリングを行った。

術後1年以上経過している症例の中で再発をきたした5例と病期をマッチさせた4例の非再発例を選出した(当初5例であったがシーケンス完了後に術後1年8ヶ月で頸部後発転移を生じた症例があり除外した)。これら患者の術前血清 1.5ml から MagCapture Exosome Isolation Kit PS を用いてエクソソームの抽出を行った後に RNA を抽出した。抽出した RNA から QIaseq miRNA Library Kit (QIAGEN) を用いてライブラリーを調整し、NextSeq500 により small RNA シークエンスを行った。シーケンスの結果、平均で 14.9 百万リードが得られ、そのうち miRNA 及び piRNA にマップされた割合は平均 58%であった。これは他癌での過去の報告と同等の結果であった。得られたシーケンス結果を TMM 法にて正規化し、再発群と非再発群の比較を行い、再発群で有意に発現上昇を認められた miRNA を同定した(右上表は再発群で有意に発現上昇していた miRNA 上位 10 種)。これらの miRNA について TCGA のデータを用いて、頭頸部癌における予後の相関を検討した。その結果、miR-154 および miR-763 においては発現が高い群が有意に全生存率が低いことが明らかとなった(下の図)。

miRNA	Fold change	p値(補正)
hsa-miR-3142	17.50	0.0397
hsa-miR-154-3p	10.87	0.0397
hsa-miR-4292	10.86	0.0397
hsa-miR-3129-5p	10.65	0.0170
hsa-miR-6499-5p	10.58	0.0170
hsa-miR-6819-3p	9.86	0.0315
hsa-miR-6878-5p	9.54	0.0539
hsa-miR-764	8.91	0.0170
hsa-miR-4743-3p	8.81	0.0450
hsa-miR-4329	8.61	0.0170

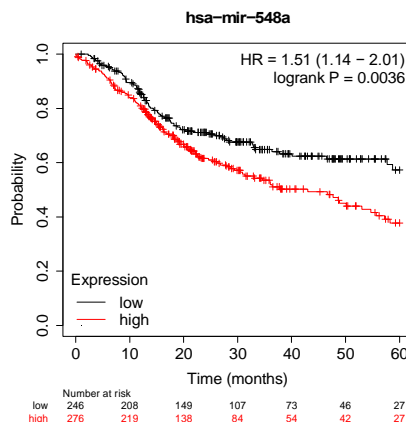
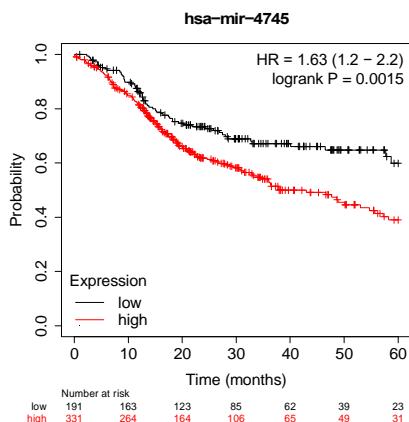


(3) 口腔癌腫

瘍組織を用いた miRNA プロファイリング

次に血清 miRNA プロファイリングを行った症例と同一の口腔癌症例の腫瘍組織を用いて同様に small RNA シークエンスを行った。シーケンスの結果、平均で 12.1 百万リードが得られ、そのうち miRNA 及び piRNA にマップされた割合は平均 21%であった。再発群と非再発群の比較を行うと、再発群で有意に発現上昇を認められたのは miR-4745-3p と miR-548a のみであった(右表)。これら miRNA について TCGA のデータを用いて、頭頸部癌における予後を検討すると、いずれの miRNA においても発現が高い群が有意に全生存率が低いことが明らかとなった(下図)。

miRNA	FC	p値(補正)
hsa-miR-4745-3p	8.55	0.0257
hsa-miR-548a	9.67	0.0144



また血清エクソソーム miRNA の発現と腫瘍組織の miRNA 発現を比較すると、一定の傾向は認められなかった。近年の報告で（文献2）エクソソームに内包して放出されやすい miRNA のモチーフが存在することが発見され、宿主細胞の miRNA のプロファイルとエクソソーム中の miRNA のプロファイルは同一ではないことが明らかになっており、口腔癌バイオマーカーの解析においても血清エクソソームと腫瘍組織の発現は別のものであると考えられた。

（4）miR-154-3p の制御するパスウェイの解析

再発群の血清エクソソームで発現が上昇していた miR-154-3 の制御する遺伝子群について in silico の解析を行った。TargetScan 8.0 を用いて miR-154-3p と結合する可能性のある遺伝子 174 遺伝子を抽出し、reactome version 80 にてパスウェイ解析を行った（右表は最も関連があると考えられた上位5パスウェイ）。この解析から Rho シグナルに関わる遺伝子群（RhoA、ROCK1、VAPB、FAM13A、ARHGAP20 および ARHGAP26）を miR-154-3p は制御している可能性が示唆された。Rho シグナルは癌の転移・浸潤に関わっていることが知られており、今後は miR-154-3p が実際に Rho シグナルを制御しているかについて、細胞株およびマウスを用いて検証していく予定である。

Pathway name	#Entities found	#Entities total
Synthesis of PE	3	33
RHOA GTPase cycle	6	154
APC truncation mutants are not K63 polyubiquitinated	1	1
RHOC GTPase cycle	4	79
RAC1 GTPase cycle	6	191

文献1：Kinoshita T, Yip KW, Spence T, Liu F. MicroRNAs in extracellular vesicles: potential cancer biomarkers. J Hum Genet. 62(1):67-74. 2017

文献2：Garcia-Martin R, Wang G, Brandão BB, Zanotto TM, Shah S, Kumar Patel S, Schilling B, Kahn CR. Nature. 601(7893):446-451. 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okada Reona, Koshizuka Keiichi, Yamada Yasutaka, Moriya Shogo, Kikkawa Naoko, Kinoshita Takashi, Hanazawa Toyoyuki, Seki Naohiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Regulation of Oncogenic Targets by miR-99a-3p (Passenger Strand of miR-99a-Duplex) in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1535 ~ 1535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8121535	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 Asai Shunichi, Koma Ayaka, Nohata Nijiro, Kinoshita Takashi, Kikkawa Naoko, Kato Mayuko, Minemura Chikashi, Uzawa Katsuhiko, Hanazawa Toyoyuki, Seki Naohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of miR-1/miR-133 Clustered miRNAs: PFN2 Facilitates Malignant Phenotypes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 663 ~ 663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10030663	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 Tanaka Nozomi, Minemura Chikashi, Asai Shunichi, Kikkawa Naoko, Kinoshita Takashi, Oshima Sachi, Koma Ayaka, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiko, Seki Naohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of miR-199-5p and miR-199-3p Target Genes: Paxillin Facilitates Cancer Cell Aggressiveness in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12121910	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 Koma Ayaka, Asai Shunichi, Minemura Chikashi, Oshima Sachi, Kinoshita Takashi, Kikkawa Naoko, Koshizuka Keiichi, Moriya Shogo, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiko, Seki Naohiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Impact of Oncogenic Targets by Tumor-Suppressive miR-139-5p and miR-139-3p Regulation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9947 ~ 9947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189947	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 Oshima Sachi, Asai Shunichi, Seki Naohiko, Minemura Chikashi, Kinoshita Takashi, Goto Yusuke, Kikkawa Naoko, Moriya Shogo, Kasamatsu Atsushi, Hanazawa Toyoyuki, Uzawa Katsuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of Tumor Suppressive Genes Regulated by miR-31-5p and miR-31-3p in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6199 ~ 6199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22126199	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------