様　式　Ｃ－４１

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：奨励研究
研究期間：2021～2021
課題番号：２１Ｈ０４１７８

研究課題名　　進行性胃癌由来エクソソームmiRNA(exo-miRNA)の探索と診断への応用

研究代表者
浜辺　俊秀（Hamabe, Toshihide）

金沢大学・総合技術部（医）・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　470,000円

研究成果の概要：　in vitro実験系において、胃癌細胞株MKN45にTGF-β1を添加し、悪性化を誘導した後、細胞からmRNAを抽出、培養上清からExosomeを回収した。その結果、 Exosome-Free FBSを含む培地を使用した場合にもMKN45の悪性化誘導は可能であり、10mLの細胞培養上清からmiRNA発現解析に十分なExosomeが回収可能であることを確認した。現在、悪性化誘導をした胃癌細胞で発現量が増加しているmiRNAに対してmiRNA-mRNA統合解析を行なっており、胃癌細胞由来exo-miRNAが標的としているmRNAの絞り込みを進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　体液中に存在するmiRNAをがんのバイオマーカーとして利用することで、早期がんを含むがんの疑いのある人をスクリーニングする一次検診が可能になることが期待されている。本研究により、胃癌の新規バイオマーカーの候補miRNAがエクソソームを媒介して体液中に分泌される可能性を検討することができる。現在は、胃癌の新規バイオマーカーの候補miRNAが標的とするmRNAの絞り込みをするめている。本解析により、胃癌の進行を抑制するmRNAを標的とする候補miRNAを見出すことができれば、より低侵襲で簡便な診断精度の高い検査法の開発に貢献できる可能性がある。

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌　miRNA　エクソソーム　体液診断

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究の目的

二人に一人が癌になる時代、医学の進歩により、治療が難しいとされてきた進行がんも早期がんであれば治療可能となってきた。早期がんの発見のために、受診者は PET/CT、内視鏡や組織生検(バイオプシー)による診断を受ける必要がある。病院の規模によっては全ての対象者に同等の検査を実施することは難しいため、体液生検(リキッドバイオプシー)による低侵襲で簡便な診断精度の高い検査法の開発が急務である。中でも体液中に存在するエクソソーム内には疾患に関する情報が含まれており、診断への応用が期待されている。

近年、国立がん研究センターは体液中に存在するマイクロ RNA（miRNA）をがんのバイオマーカーとして利用した体液診断の実用化に向けた研究を進めている。同センターでは、13 種類のがんをターゲットにし、各がんのバイオマーカーとしての数種類の miRNA を候補に挙げているが、まだ決して十分な数とは言えない。そこで本研究では、胃癌の早期診断のための新たなバイオマーカーとしての胃癌細胞特異的なエクソソーム内の miRNA(exo-miRNA)を探索することを目的とした。

２．研究成果

これまでに我々は悪性化した胃癌細胞株 MKN45 内から抽出した miRNA を用いたマイクロアレイ解析を行い、発現が上昇する miRNA の中に胃癌細胞の悪性化を惹起するといった報告がない新規の miRNA を見出してきた(課題番号:19H00380)。本研究では、これらの miRNA 胃癌細胞から分泌されるエクソソームに含まれるかを検討することを第一課題とした。

血清中に含まれるエクソソームを回収しないことを目的に、我々は Exosome-Free FBS を使用した培養条件を設定した。そこでまず、Exosome-Free FBS をしようした培養条件でも胃癌細胞の悪性化をこれまでと同様に誘導できるかを検討した。胃癌細胞株 MKN45 を TGF-β1 と 1% Exosome-Free FBS を含む培地で培養して、MKN45 の悪性化を誘導した後に mRNA を抽出した。胃癌の悪性化が進行することにより、アディポネクチン受容体(AdipoR2)の遺伝子発現が減少することが報告されている(Otani et al., 2010)。そのため、TGF-β1 未処理の MKN45 と TGF-β1 添加処理をした MKN45 における AdipoR2 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR(qRT-PCR)によって検討した。その結果、これまでと同様に TGF-β1 と Exosome-Free FBS を含む培地で培養した MKN45 では AdipoR2 の遺伝子発現は減少していた(図 1)。

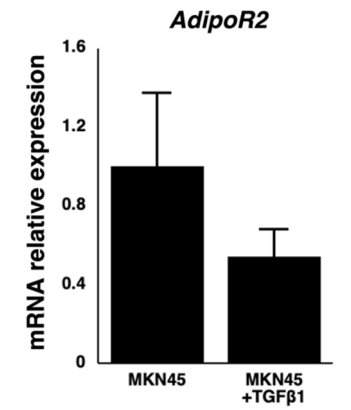

図 1. Exosome 回収の培養条件においても胃癌細胞の悪性化を誘導した

TGFβ1 と Exosome-Free FBS を含む培地を用いた場合にも *AdipoR2* の遺伝子発現は減少した

次に、遺伝子発現解析に十分量の miRNA が抽出可能なエクソソームの回収条件を検討した。10 cm ディッシュを用いて培地量 10 mL で培養した後に培養上清を回収し、遠心濃縮チューブ VIVASPIN20 による限外濾過を行った後に、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2 を用いて培養上清からエクソソームを回収した。エクソソームの回収量を定量するために、FUJIFILM 社にエクソソームナノサイト解析を依頼した結果、miRNA の発現解析に十分なエクソソームを回収できていること判断した(図 2)。

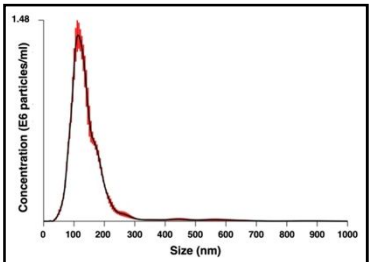

図 2. エクソソームナノサイト解析

miRNA の発現解析に十分なエクソソームが回収できた(1.21 +/- 0.10 E8 粒子/ml)
Red;Error bars

現在、悪性化を誘導した胃癌細胞株の培養上清から回収したエクソソーム内に上述した新規の miRNA が含まれているかについて、exo-miRNA の発現解析を進めている。この結果に基づき、細胞内での発現変化とオーバーラップする exo-miRNA について機能解析を行う。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
原田　真市	(Harada Shin-ichi)
木下　淳	(Kinoshita Jun)