

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460698

研究課題名(和文) 肺癌の早期診断を目指した血中miRNA定量に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Study of circulating microRNAs as biomarkers of lung cancer

研究代表者

相磯 聡子(AISO, TOSHIKO)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：40195144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌マーカー候補、miR-20、amiR-21、miR-145、miR-223の血清中の安定性を解析し、miR-145は4℃、24時間の保存中に残存量が約30%に低下すること、細胞外小胞中のmiR-145であっても約57%に低下することを明らかにした。健康人を対象とした解析により、miR-21の血中レベルは受動喫煙者で非喫煙者の約44%に低下することを示した。非小細胞肺癌患者を対象にした解析により、これら4種のマイクロRNAのうち2種の血中レベルがstage Ⅰの患者で有意に低下し、がん切除後には有意に上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed circulating microRNAs miR-20a, miR-21, miR-145 and miR-223 as candidate markers of lung cancer: (1) miR-145 was degraded rapidly in serum samples at 4°C; the level dropped to 29.3% over 24 h. MiR-145 in extracellular vesicles exhibited similar instability; the level was 56.5%; (2) The level of microRNA miR-21 in serum decreased 44% in healthy passive smokers. (3) On two of these four microRNAs, the levels decreased significantly in serum of non-small cell lung cancer patients. Moreover, these levels in serum increased after the excision of the cancer.

研究分野：分子生物学および臨床検査医学

キーワード：マイクロRNA バイオマーカー 肺癌 リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請時(2012)における背景：種々のマイクロ RNA の血中濃度は、がんの発症や悪性化に伴い変化することから、がんの早期発見、予後予測のバイオマーカーとして期待を集めた。肺がんに関しても、患者血中マイクロ RNA のマイクロアレイ解析によるマーカー候補の検索や、それに続くリアルタイム PCR による候補マイクロ RNA の血中濃度の定量が行われ、多種の肺がんマーカー候補が報告された。一方、検体としての血漿、血清の違い、適切な内部コントロールの検索など、定量に影響を及ぼす因子についても多様な報告がなされた。

(2) 動機：肺がん患者血中マイクロ RNA に関する海外の4つの大規模プロジェクトの結果を比較すると、これらすべてにおいて共通するマーカー候補マイクロ RNA は存在しなかった。これは肺がんマーカーマイクロ RNA の確立のために明らかにすべきことが、多数残されていることを意味する。そもそも血中には様々な細胞に由来するマイクロ RNA が含まれるため、がんの発症に関連して分泌量が変化する場合に限らず、内的・外的環境要因にตอบสนองして分泌量を変化させる場合がある。したがって肺がんマーカー候補マイクロ RNA の血中レベルに影響を及ぼす環境要因について、十分な情報を蓄積する必要があると考えた。また血液サンプル中のマイクロ RNA 濃度測定において、再現性に影響を与える要因を把握することも、血中マイクロ RNA をバイオマーカーとして確立するための必須条件と考えた。

2. 研究の目的

(1) 血中マイクロ RNA 量に影響を及ぼす内的・外的要因について解析する；申請時の研究目的は、まず健常人を対象として、性別、年齢、喫煙習慣、服薬、血縁者の肺がん患者の有無などと、肺がんマーカーマイクロ RNA

候補 let-7 (がん抑制マイクロ RNA の一つ) および miR-17-92 (がん遺伝子型マイクロ RNA の一つ) の血中レベルとの相関の有無を明らかにすることである。この結果に基づき適切なコントロール群を設定する。

(2) 血中マイクロ RNA の測定条件を再評価した上で、日本人集団に関してこれらのマイクロ RNA の血中濃度と肺がんの stage、組織型等との相関性を解析する。また抗がん剤によるマイクロ RNA の血中レベルへの直接的な影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 健常人 / 患者情報および検体収集

健常人に対するアンケートの実施：健常人 40 名 (男性 16 名；平均年齢 36.2 歳 女性 24 名；平均年齢 39.2 歳) を対象として、血清の収集、および年齢、性別、喫煙、受動喫煙、飲酒、服薬、血縁者の肺がん患者等についてのアンケートを行った。

肺がん患者血清および患者情報の収集と高齢者コントロール血清の収集：肺がん患者 56 名 (男性 38 名、女性 18 名；平均年齢 66.1 歳) および高齢者コントロール 26 名 (男性 13 名、女性 13 名；平均年齢 65.8 歳) を対象とした。患者血清の採取は、治療前と治療後 (切除後または抗癌剤投与直後および治療効果判定時) に行った。また患者情報として、stage、組織型、喫煙習慣、治療法等に関する情報を得た。

(2) 血清マイクロ RNA 測定および統計解析等

血清マイクロ RNA 測定：miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を用い、血清 200 μ l よりマイクロ RNA を含む RNA 分画を得た。この際、spike-in control として 0.93 fmol の cel-miR-39 を血清に添加した。逆転写反応およびリアルタイム PCR は、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI)、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG

(ABI) TaqMan MicroRNA Assays、および解析機器として 7500 Fast (ABI) を用いて行った。リアルタイム PCR による血中のマイクロ RNA の定量には、目的に応じ $2^{-\Delta Ct}$ 法または $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いた。

統計解析：スチューデントの t 検定またはマン・ホイットニーの U 検定により有意差を評価した。

4. 研究成果

(1) spike-in control RNA (cel-miR-39) の水中における安定性

血清マイクロ RNA のリアルタイム PCR による定量を行う場合、ハウスキーピング遺伝子に代わる適切なマイクロ RNA を内部コントロールとすることが望ましい。この候補として様々なマイクロ RNA が挙げられたが、一方でこれらの血中レベルが変動する可能性があるとの報告が相次いだ。そのため我々は化学合成した線虫マイクロ RNA、cel-miR-39 を spike-in control として用いる方法を選択した。そこで cel-miR-39 RNA mimic (QIAGEN) の使用に先立ち、この分子の水中における安定性を調べたところ、少なくとも 6 時間は有意な分解は見られないことが示された。

(2) 血清マイクロ RNA の安定性

解析対象とするマイクロ RNA 種の再検討
研究開始当初までの国内外の報告に基づき、マイクロ RNA の定量において最も分子認識能が高く、広く用いられている定量法として、上記研究の方法(2) で述べた方法を用いることとした。これに伴いこの定量法を用い肺がん患者血清マイクロ RNA の解析を行ったケースを中心に、再度文献調査を行った。この結果に基づき、解析対象を let-7 および miR-17-92 から、Chen-X らが肺がんマーカー候補として挙げた miR-20a (miR-17 family)、miR-21、miR-145、miR-223 に変更した。

4 における血清マイクロ RNA の安定性

当初より血中マイクロ RNA は、mRNA 等と比較し非常に安定性が高い分子として広く認識されていた。しかし Koberle ら (2013) や Yamada ら (2014) は、血中マイクロ RNA の安定性は分子種により多様である可能性を示した。そこで今回解析する 4 種のマイクロ RNA について、4 における安定性を調べた (相磯ら 2015、Aiso et al. 2017)。4 で 24 時間保存後の血清では、miR-145 および miR-223 の濃度が有意に低下し、残存量はそれぞれ 29.3% ($P<0.0001$) および 48.5% ($P<0.01$) だった。肝細胞傷害のマーカーとされる miR-122 の不安定性については Koberle らが報告しているが、miR-145 もこれに並び非常に安定性が低いことが示された (図 1A)。また細胞外小胞中の miR-145 についても同様に安定性を調べたところ、24 時間後の残存量は 56.5% ($P<0.01$) であった (図 1C)。この結果は、細胞外小胞中のマイクロ RNA は極めて安定に保持されるというこれまでの認識に反し、細胞外小胞中における安定性も分子種により多様である可能性を示唆した。

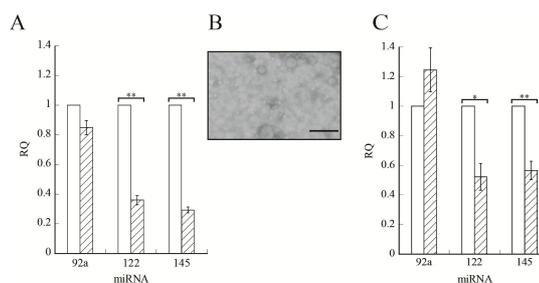


図 1. 血清マイクロ RNA の安定性

(3) 受動喫煙者群でみられる血中 miR-21 濃度の低下

上記 3 (1) の健常者に対するアンケートと血清マイクロ RNA レベルの測定結果から、血中 miR-21 の濃度は、受動喫煙者群で非喫煙者群の 44% ($P<0.01$) に低下 (すなわち ΔCt 値の上昇) することが示された (図 2) (臨床検査医学会学術集会 2015)。喫煙者群では血中 miR-21 濃度の有意な変動は見られず、

また他の3種のマイクロRNAについても喫煙および受動喫煙による血中miR-21レベルへの影響は認められなかった。

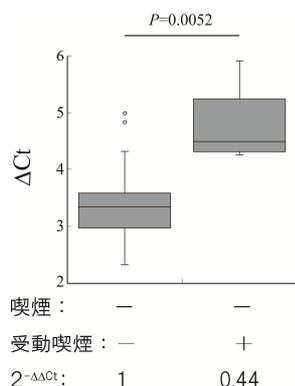


図2. 受動喫煙の血中miR-21レベルへの影響

(4) 初期の非小細胞がんにおける血清マイクロRNAレベルの変動

上記3(1)の解析により、以下の結果が明らかになった。

stage および において血清マイクロRNAレベルの低下

初期の非小細胞肺癌患者 (stage 1-2) の血中濃度をコントロール群と比較したところ、4種のマイクロRNAのうち2種で有意に低下していた (何れも $P < 0.001$)。さらにこれらに関するROC曲線から、これらの血中マイクロRNAはいずれも、初期の肺癌を高い感度および特異性で識別することが示された (AUC = 0.877 および 0.849)。この他の2種については有意差が見られなかった。

切除前後の血清マイクロRNAレベルの変動
がん切除前と切除1年後の血中濃度を比較したところ、上記2種のマイクロRNAで、切除後に健常者の濃度に近い値 ($P = 0.12$ および $P = 0.077$) まで上昇 (したがって ΔCt 値の低下) していた (図3)。この他の2種については有意差が見られなかった。

上記の結果は、日本人集団において、初期の肺癌細胞の有無とこれら2種のマイクロRNAの血中レベルが深く関連していることを示す。さらに、がん切除3ヶ月後の時期には、全体的に血中のマイクロRNA濃度が上

がる傾向が見られたため、切除による影響を評価する場合、切除後一定期間 (7週~12ヶ月) 経過後に血中マイクロRNAの測定を行うことが重要であること考える。

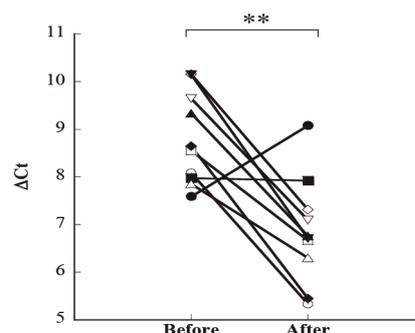


図3. 肺癌切除前後の血中マイクロRNAレベルの変化

(5) stageの進行と血清マイクロRNAレベルの変動

4種のマイクロRNAすべてで、stageが進むに従い、血中濃度が有意に上昇した (stage 1-2 vs 4: $P = 0.0011, 0.011, 0.020, 0.00031$)。

(6) 抗癌剤投与による血清マイクロRNAレベルへの影響および治療効果との関係

種々の抗がん剤による血中マイクロRNA濃度への影響を、4種のマイクロRNAについて調べたが、化学療法開始約1週間後および効果判定時のいずれにおいても、治療開始前との有意差を示す結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計2件)

1. Aiso T, Takigami S, Yamaki A, Ohnishi H: Degradation of serum microRNAs during transient storage of serum samples at 4 °C. Ann Clin Biochem 2017. doi: 10.1177/0004563217704233. [Epub ahead of print]. 査読あり.

2. Aiso T, Sekine N, Takagi Y, Ohnishi H: Study on the Sample Preservation Temperature and Period in Circulating MicroRNA Quantification Using Spike-In

Control. Rinsho Byori. 2015. 63(6):688-93.

査読あり.

〔学会発表〕(計2件)

1. 相磯聡子(発表者), 八巻明子, 星野諒太, 坂下恵吾, 佐藤嘉見, 西澤裕太, 大西宏明: 血清マイクロ RNA の多様な安定性. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日.

2. 相磯聡子(発表者), 関根名里子, 高城靖志, 大西宏明, 渡邊卓: 喫煙が健常人血中 miR-21 レベルに及ぼす影響. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会, 岐阜, 2015 年 11 月 19 日-22 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相磯 聡子 (AISO TOSHIKO)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号: 40195144

(2) 研究分担者

大西 宏明 (OHNISHI HIROAKI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 80291326

(3) 連携研究者

蒲生 忍 (GAMOU SHINOBU)

杏林大学・CCRC 研究所・教授

研究者番号: 90122308

東 克己 (HIGASHI KATSUMI)

杏林大学・保健学部・特任教授

研究者番号: 50159109