

学位論文の関連論文の研究背景及び要旨

Extracellular miR-224 as a
prognostic marker for clear cell renal
cell carcinoma

(細胞外 miRNA-224 は淡明型腎
細胞癌の予後予測マーカーになり
得る)

氏名 藤井 央法

所属 山口大学大学院医学系研究科
情報解析医学系専攻 泌尿器科学分野

平成29年12月

研究の背景：

近年、早期診断や治療効果を予測するためのバイオマーカー検索を目的とした低侵襲なlipid biopsyが注目されている。Exosomeはそのliquid biopsyの1つであり、血液中のみならず、尿中や唾液などからも採取が可能な、直径20-150nmの膜小胞体である。乳癌、膵臓癌や大腸癌などにおいて早期診断のバイオマーカーとしてexosomeが実用化されつつある。

泌尿器科癌分野においても、exosomeが早期診断のバイオマーカーとして注目されており、前立腺癌や膀胱癌においては尿中exosomeが早期診断のバイオマーカーとして有用であると報告されている。

また、exosome内に含有されているmicroRNA(miRNA) が様々な癌種において進行や転移に関連した重要な役割を行っていると報告されている。我々は、淡明型腎細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma; ccRCC) において、腎癌組織内miRNA-224の発現が正常腎組織に比して有意に高く、癌の進展や転移に関連があることをこれまで報告し、今回の研究では、exosome内に含有されている細胞外miR-224に着目し、淡明型腎細胞癌患者においてのexosome-miRNA-224の早期診断マーカーの有用性と機能的役割について検討を行った。

要旨：

当院で腎部分切除術または腎摘術が施行され、病理学的にccRCCと診断された108名の患者を対象とした。対象108症例中20例においてccRCC組織と正常腎組織からRNAを抽出し、quantitative real time RT-PCRを行いmiRNA-224の発現を調べた。ccRCC組織において、正常腎組織に比して、有意にmiRNA-224の発現が高いことがわかった (図表1)。また、腎癌細胞株 (Caki-1, Caki-2, A-498, 786-O, 769-P)と近位尿細管細胞株 (RPTEC) でmiRNA-224の発現も調べ、Caki-1, Caki-2でmiRNA-224の発現が高く、769-PとRPTECではmiRNA-224発現が有意に低かった。以降の機能解析にはmiR-224発現レベルが高い腎癌細胞株のCaki-1とCaki-2, miRNA-224発現レベルの低い腎癌細胞株769-Pと正常腎細胞株RPTECを用いて行うこととした。

769-PとRPTECでmiRNA-224発現を上げると、cell viabilityとinvasionが有意に増加し、一方、apoptotic cellsは有意に減少した(図表2)。逆にmiRNA-224発現が高いCaki-1とCaki-2でmiRNA-224の発現を低下させると、cell viabilityとinvasionは有意

に減少し、apoptotic cellsは有意に増加した(図表3)。これらの機能解析より、miRNA-224はccRCCにおいて、腫瘍増殖や進展に関連し、oncogenicな機能を有するmiRNAであることが示唆された。

次に、exosome内の細胞外miRNAであるmiRNA-224の機能について検討を行った。まず、はじめに、患者の術前に採取した血清や細胞培養の上澄み液からExosomeが適切に抽出出来ているかどうかの確認実験を行った。術前の患者の血清や細胞培養の上澄み液からexosomeを抽出し、透過型電子顕微鏡を用いて形態学的にexosomeを確認し、またwestern blottingで、収集したエクソソームの表面マーカーであるCD9とCD81の発現も確認することで(図表4)、エクソソームが適切に抽出出来ていることを確認した。その後、108症例の術前血清からexosomeを抽出し、exosome中のmiRNA-224発現と予後との関連性を検討したところ、Exosomal miRNA-224が高発現群、低発現群に比して、progression-free survival (PFS), cancer-specific survival (CSS), and overall survival (OS)が有意に短いことがわかった(図表5)。Cox比例ハザードを用いた多変量解析でもexosomal miRNA-224高発現は手術後の患者の予後に関連したrisk factorであった(図表6)。

次に細胞内miRNA-224と細胞外exosomal miRNA-224の関係について検討を行った。細胞内miRNA-224の発現が高かったCaki-1とCaki-2では、細胞外exosomal miRNA-224の発現も高く、逆に細胞内miRNA-224の発現が低かった769-PとRPTECでは、細胞外exosomal miRNA-224の発現レベルも低かった(図表7A)。

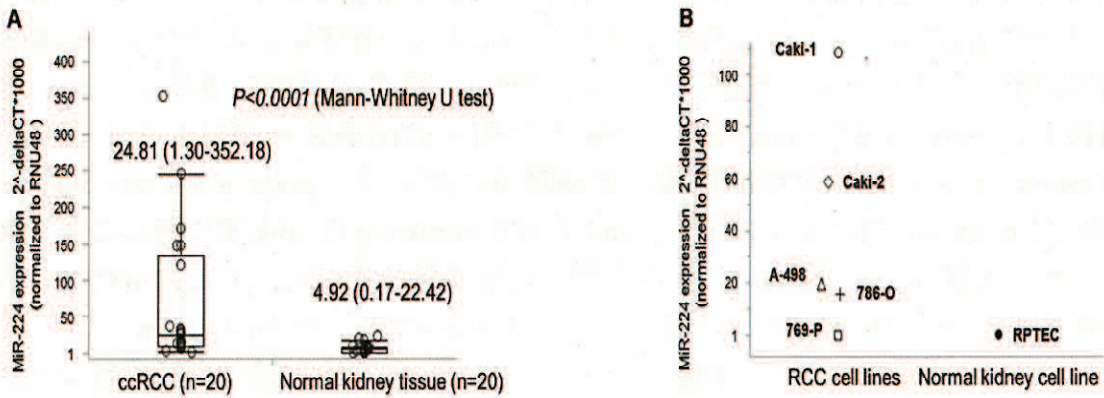
細胞内miRNA-224が高発現であったCaki-1とCaki-2において、細胞内miRNA-224発現をknock-downさせると、細胞外miRNA-224の発現レベルの低下が認められた。細胞内miRNA-224発現の低い769-PとRPTECでmiRNA-224をup-regulationさせると、細胞外miRNA-224の発現レベルの上昇が認められた(図表7B,C)。細胞内と細胞外のmiRNA発現はparallelな関係性がある可能性が示唆された。

更に、exosomeの細胞間相互作用についても検討を行った。腎癌細胞Caki-1の細胞培養の上澄み液よりexosomeを抽出し、Exo-GLOW Exosome Labeling kitを用いて、exosomeに蛍光染色を行い、蛍光染色されたexosomeを別の腎癌細胞である769-Pの上澄み液に加え、染色されたCaki-1由来のexosomeが769-P細胞内に取り込まれてことを蛍光顕微鏡で確認した(図表8)。次にCaki-1から採取したexosome内のmiRNAをXMIRとAXMIR RNA Oligo Kitsを用い、RNAに蛍光タグをつけ、先ほどと同様に769-Pの細胞内へ取り込まれることを蛍光顕微鏡で確認した(図表9)。この条件下で、Caki-1から採取したexosomeを769-Pの上澄み液に添加すると、有意にcell viabilityとinvasionが促進され、apoptotic cellの減少が認められた(図表10)。これらの実験結果から、exosomeは細胞間相互作用を有しており、標的細胞や標的組織に情報伝達を行っている可能性が示唆された。

以上のことより、exosomeは細胞間相互作用に関連し、癌細胞は転移の準備とし

て、前もって遺伝子情報をexosomeで伝達している可能性が示唆された。また、miRNA-224はccRCCにおいてoncogenicな機能を有するmiRNAであり、細胞外exosomal miRNA-224は有用な予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。

図表 1. intracellular miR-224 expression in ccRCC, matched normal kidney tissues, and cell lines



図表 2. Effect of miR-224 upregulation on 769-P cells and RPTEC cells

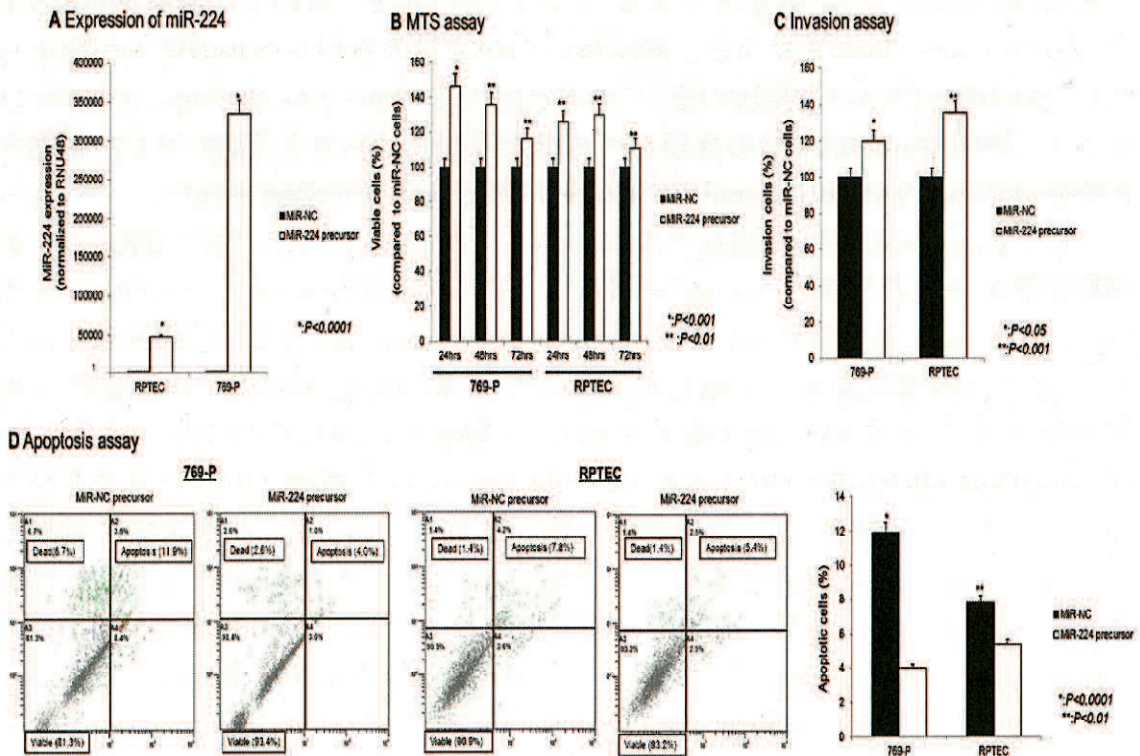
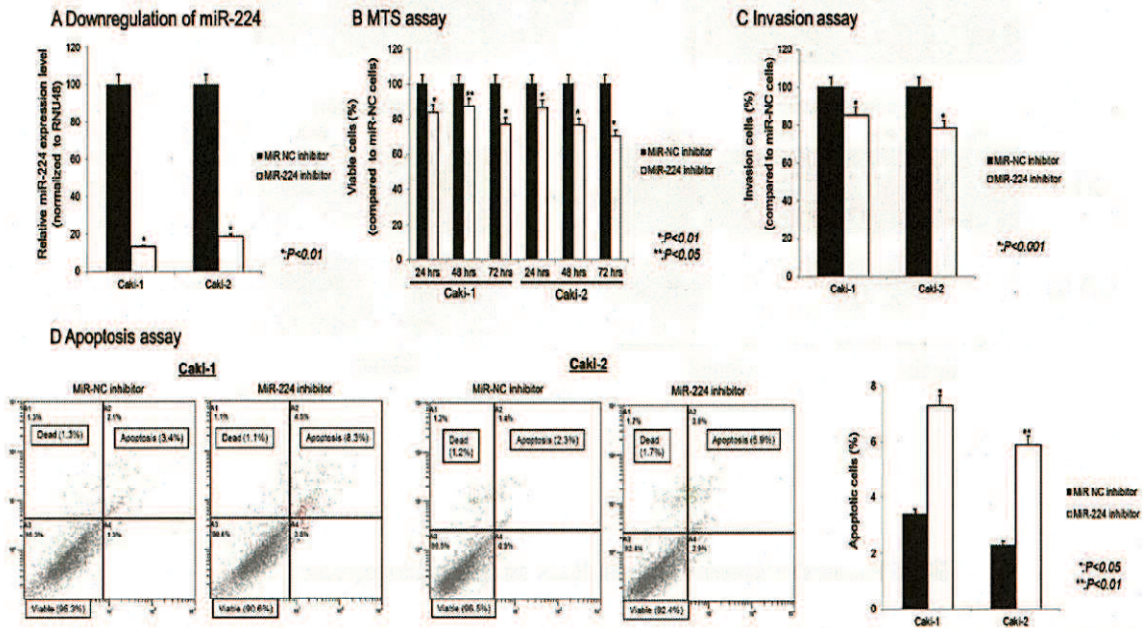
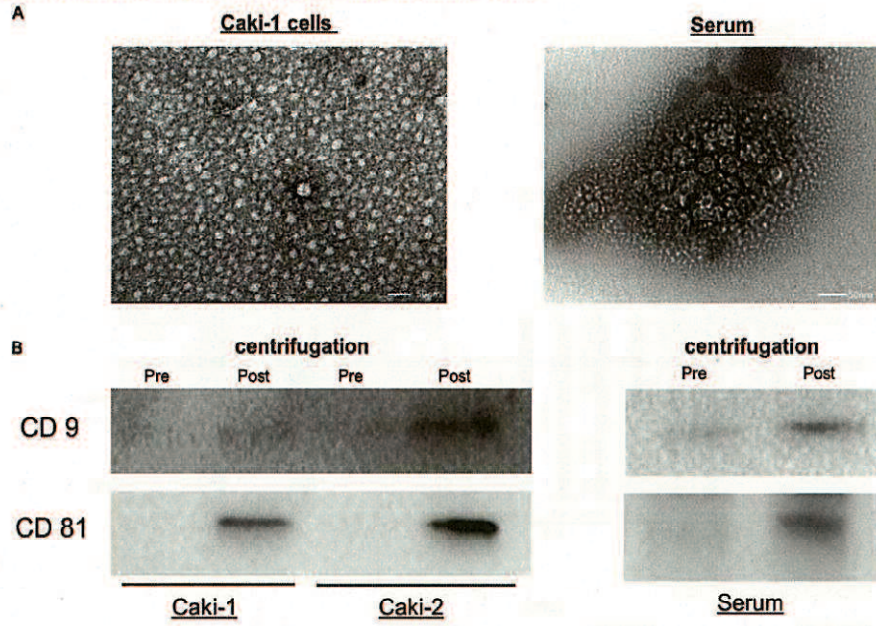


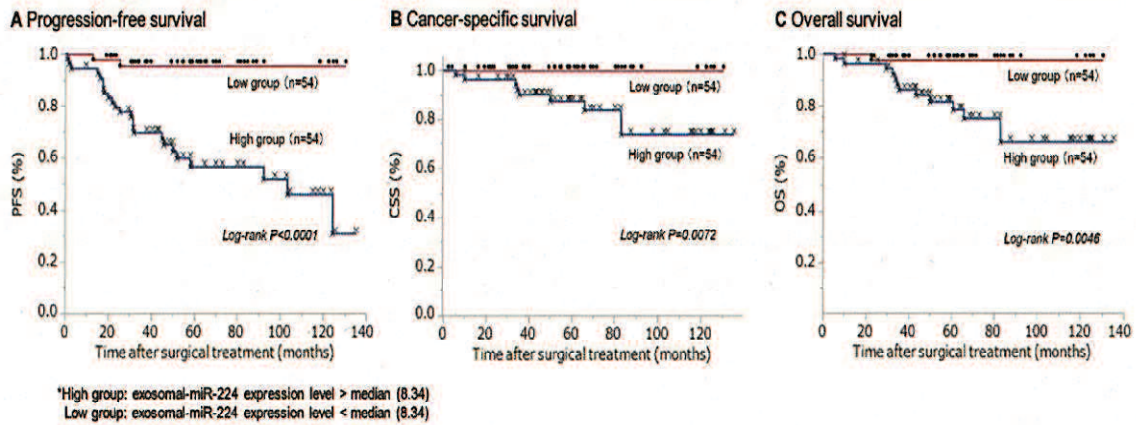
图 3. Effect of downregulation miR-224 on Caki-1 and Caki-2 cells



图表 4. Exosomes from human serum and cell culture media



图表 5. Relationship between exosome-miR-224 expression and prognosis.



图表 6. Univariate and Cox proportional hazards regression analysis of factors related to progression, cancer-specific mortality, and overall survival

Parameters	Progression			Cancer-specific mortality			Overall survival			
	Univariate		P-value	Univariate		P-value	Univariate		P-value	
	HR (95%CI)	P-value		HR (95%CI)	P-value		HR (95%CI)	P-value		
Gender										
Male	1			1			1			
Female	1.0 (0.8-1.2)	0.8177		1.0 (0.9-1.1)	1.0000		0.9 (0.8-1.1)	0.5608		
Age										
<65 y.o	1			1			1			
≥65 y.o	1.0 (0.8-1.2)	1.0000		1.0 (0.9-1.1)	1.0000		1.0 (0.9-1.2)	0.7755		
Stage										
I	1			1			1			
≥ II	1.3 (1.0-1.8)	0.0164	3.0 (1.3-7.1)	0.0123	1.2 (1.0-1.4)	0.0267	1.8 (1.1-2.8)	0.0114	1.2 (1.0-1.4)	0.0428
Fuhrman grade										
G1/2	1			1			1			
G3/4	1.4 (1.0-1.9)	0.0134	1.8 (0.8-4.3)	0.1481	1.1 (1.0-1.3)	0.0752	1.2 (0.9-1.4)	0.1134		
LVI										
Yes	1			1			1			
No	1.7 (1.0-2.7)	0.0568		1.9 (1.1-3.2)	0.0856		1.4 (0.7-2.5)	0.3855		
Exosomal-miR-224										
Low	1			1			1			
High	1.7 (1.4-2.2)	<0.0001	11 (3.3-68.7)	<0.0001	1.2 (1.1-1.4)	0.0027	1.6 (1.1-2.5)	0.0140	1.3 (1.1-1.5)	0.0009

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; LVI, lymphovascular invasion

3.0 (1.1-9.2) 0.0424

9.1 (1.8-166.1) 0.0043

图 7. Relationship between intracellular and extracellular miR-224 in cell lines

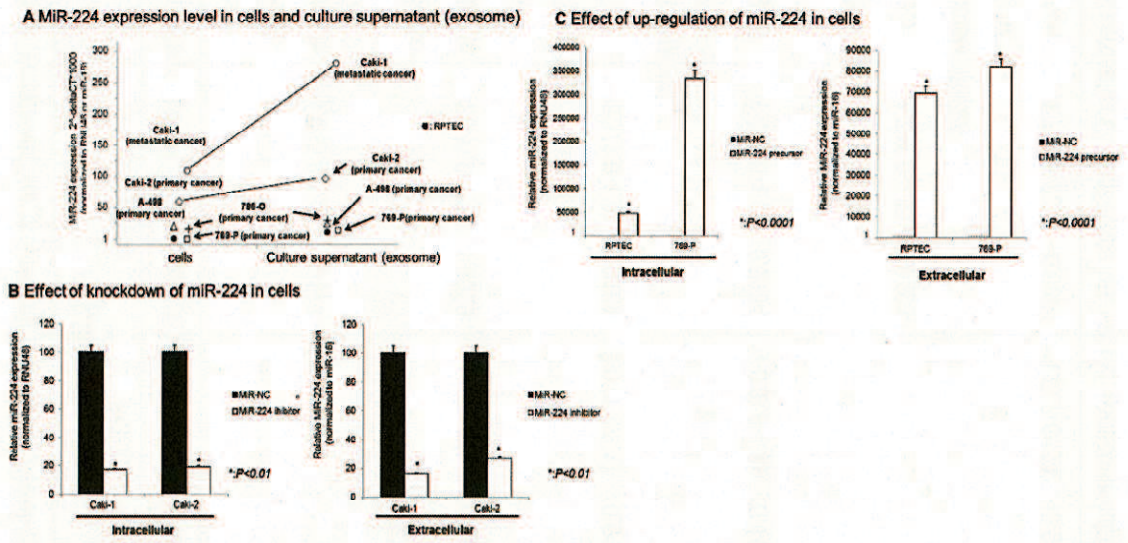


图 8. Cell to cell interaction of exosome

769-P added with labeled exosomes of Caki1

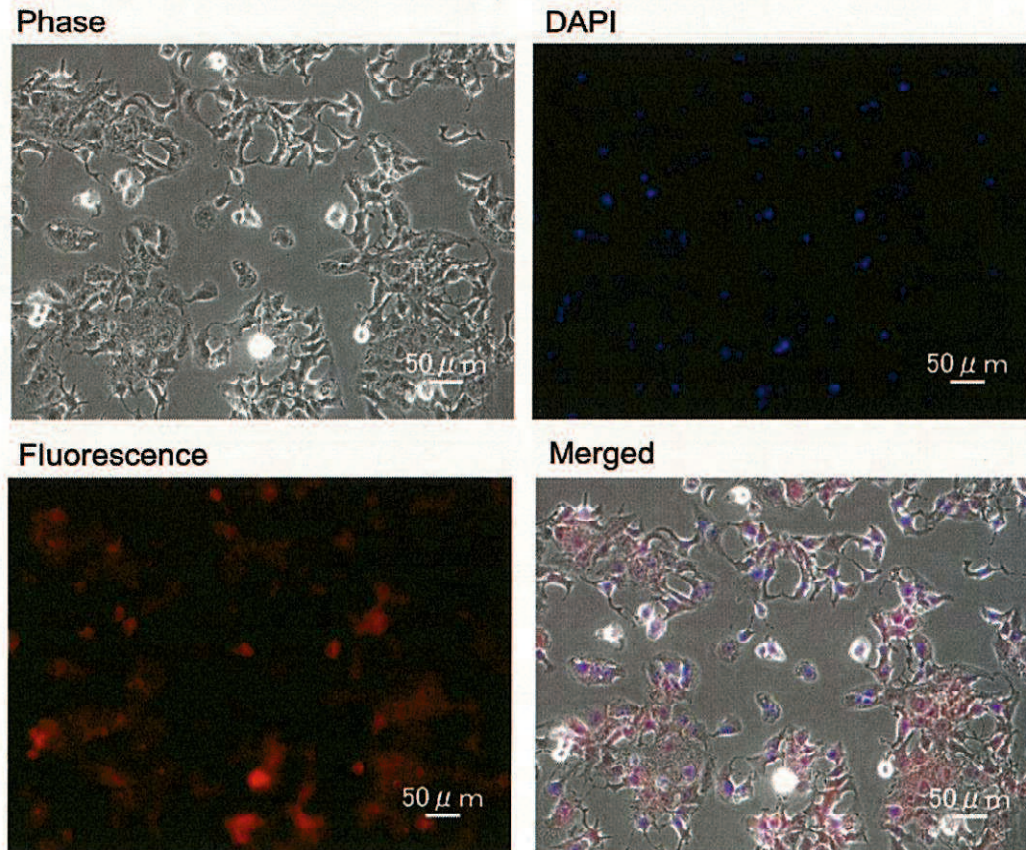
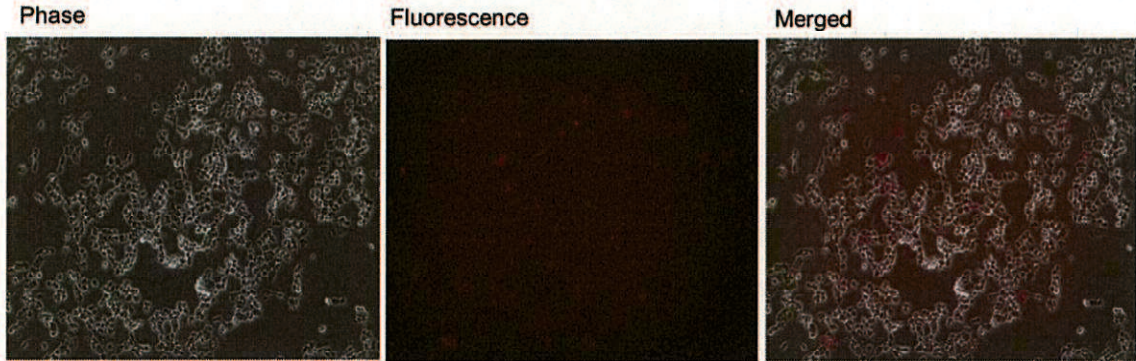


图 9. Labeling miR-224 interior exosomes

769-P added with labeled miR-224 exosomes of Caki1



RPTEC added with labeled miR-224 exosomes of Caki1



图 10. Effect of added exosome on target cells.

