HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血漿エクソソーム由来microRNA を用いたグリオブラストーマ診断バイオマーカーの探索
Author(s)	山口, 響子; 森口, 徹生; 山下, 大介; 大西, 丘倫; 金子, 貞男; 的場, 亮; 鄭, 漢忠; 近藤, 亨
Citation	北海道歯学雑誌, 39(2), 94-103
Issue Date	2019-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/73622
Type	article
File Information	39_02_02 Yamaguchi.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　39：94−103，2019.

原　著

血漿エクソソーム由来 microRNA を用いた グリオブラストーマ診断バイオマーカーの探索

山口　響子[1, 2)]　森口　徹生[2)]　山下　大介[3)]　大西　丘倫[3)]　金子　貞男[4)]
的場　亮[5)]　鄭　漢忠[1)]　近藤　亨[2)]

抄　録：最も悪性度の高い脳腫瘍の１つであるグリオブラストーマ（GBM）は，標準治療（外科手術および化学放射線療法）を施しても平均生存期間中間値（約15か月）が極めて短い難治性疾患である．この難治性の原因の１つは，腫瘍細胞の強い組織浸潤能と増殖能により神経症状発症時には摘出不可能な範囲に腫瘍細胞が拡散しているためである．つまり，簡便かつ検出感度の高いGBM診断用バイオマーカーがあれば，早期腫瘍摘出が可能となり，予後の改善が期待できる．分泌小胞体エクソソームは，その産生細胞が発現しているmRNA，microRNA (miR)，タンパクなどを含み，様々な体液中に安定に存在することから，新たなバイオマーカー探索の標的としてその解析と利用が注目されている．今回，私たちはGBM患者と健常人の血漿中のエクソソームに含まれるmiRを比較分析することで，診断マーカーとなりうるmiRの同定を目的として解析を行った．GBM患者６人の凍結血漿８検体（同一患者の再発術前１検体と術後１検体を含む）と健常人２人の凍結血漿を用いて解析を行った．凍結血漿から調整したエクソソーム内miRについて，RNA-seqを用いた網羅的な解析を行い，GBM患者血漿エクソソームに多く含まれる34種のmiRと健常人血漿エクソソームに多く含まれる47種のmiRを同定した．GBM患者血漿エクソソームに多く含まれていたmiRの中で，エクソソームバイオマーカーとして報告のないmiR-186とmiR-20aについて，定量PCRを用いてGBM患者と健常人血漿エクソソーム内miR量を検討した．その結果，miR-20aはGBM患者と健常人間で有意な差は認められなかったが，GBM患者５人中４人の血漿エクソソームにmiR-186が豊富に含まれていることを確認した．加えて，術後患者ではmiR-186量が健常人レベルまで減少していることを発見した．さらに，標準治療を行った再発例においても，術前血漿エクソソーム内miR-186の上昇を認めた．これらの結果は，血漿エクソソーム内miR-186がGBMの病状に即した新規バイオマーカーである可能性を示唆している．

キーワード：グリオブラストーマ（GBM），エクソソーム，microRNA（miR），バイオマーカー

諸　　言

グリオブラストーマ（GBM）は，外科的切除・放射線療法・化学療法を組み合わせた標準治療を施しても，平均生存期間中間値（約15か月）が極めて短い悪性脳腫瘍の一つである．GBMを含む悪性脳腫瘍細胞の特徴の一つは高い組織浸潤能と増殖能であり，脳機能温存を考慮した外科的切除では浸潤した全てのGBM細胞を取り除くことは不可能であることから高頻度に再発がみられる．このため，早期病変の診断が可能な検出感度の高いバイオマーカーの発見は術後患者のQOLに多大な影響を及ぼす．実際に，他臓器がんでは，PSA（前立腺がん），CA19-9（すい臓がん），AFPやPIVKA-II（肝臓がん）が簡便で低侵襲の血清中バイオマーカーとして用いられ，罹患患者の予後因子のひとつとして利用されている[1, 2)]．しかし，GBMを含む悪性脳腫瘍に対する有用な診断バイオマーカーは未だ報告さ

[1)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔病態学講座　口腔顎顔面外科学教室（主任：鄭　漢忠 教授）
[2)] 〒060-0815 札幌市北区北15条西７丁目
北海道大学　遺伝子病制御研究所　幹細胞生物学分野（主任：近藤　亨 教授）
[3)] 〒791-0295 愛媛県東温市志津川
愛媛大学大学院医学系研究科　脳神経外科学
[4)] 〒062-8513 札幌市豊平区月寒東１条15丁目7-20
柏葉脳神経外科病院
[5)] 〒105-0022 東京都港区海岸1-15-1スズエベイディアム5階
株式会社DNAチップ研究所

れていない．

エクソソームは，細胞が分泌する顆粒径が50－150 nmの膜小胞体を指し，mRNAやmicroRNA（miR）などの核酸，タンパク質などを内包すると共に，膜表面にCD9，CD63などの膜タンパク質を含む．エクソソームはこれら膜表面タンパク質を介して，分泌した細胞の情報や機能を他の細胞・組織ならびに個体間を伝搬する媒介体として働くと考えられている[3-5]．例えば，GBMでは恒常的活性型上皮成長因子受容体（EGFRvⅢ）がエクソソームを介して伝搬されることが報告されている[6]．低酸素環境下においてGBM分泌エクソソーム膜上に結合した組織因子が，血管内皮細胞の細胞膜上に発現しているprotease-activated receptor-2（PAR-2）を活性化し，下流のシグナルを刺激することで血管新生を誘導するという報告もある[7]．また，乳がん細胞が分泌するエクソソーム内miR-181cは血液脳関門を破壊することで乳がんの脳転移に関与していることが明らかにされている[8]．生物学的機能を有するエクソソームは体液中で比較的安定に存在し，分泌した細胞の様々な情報（核酸やタンパク質）を保有していることが明らかにされ，新たな機能・バイオマーカー探索の標的として精力的に解析が進められている[9-10]．

今回，私たちはGBM患者と健常人の血漿中のエクソソームに含まれるmiRを比較分析することで，診断マーカーとなりうるmiRの同定を目的として解析を行い，GBM患者の病状に即した新規診断用バイオマーカーとなりうるmiR-186を発見した．

対象と方法

本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認（13-0002），柏葉脳神経外科病院の臨床研究の承認（2015-10），愛媛大学医学部付属病院臨床研究センターの承認のもとに行った．

対　　象

2012年から2013年にかけて脳神経外科にて再発例も含めてGBMと診断された患者６人（男性３人女性３人，31歳から81歳，平均54.8歳）の凍結血漿を用いた．同じ患者で期間内に再発の見られたものも含めて，術前（手術日より起算し５か月前まで）に採取された血漿７検体と，術後（手術日より１週間後）に採取された血漿１検体を加え，全部で８検体とした．健常人コントロールとしてボランティア２人の凍結血漿を用いた．（表１）

表1-A　RNA-seqに用いた対象の背景

番号	年齢	性別	初発/再発	治療歴	術前/術後
0	61	F	再発	手術、RT	前

表1-B　定量PCRに用いた対象の背景

番号	年齢	性別	初発/再発	治療歴	術前/術後
1	41	M	再発	手術、RT	前
2	40	M	再発	手術、RT	前
3a	31	F	再発	手術、RT	前
3b	31	F	再々発	手術、RT	前
4	81	F	初発		前
5a	75	M	初発		前
5b	75	M		手術	後

表1-C　健常人ボランティアの年齢，性別

番号	年齢	性別
normal1	29	F
normal2	26	M

エクソソーム回収法およびエクソソーム内miRの抽出方法

血中エクソソームの調整においては，血清調整時に形成する血餅が約50%の血中エクソソームを取り込むことが報告されている[11]．このため，本研究では，血漿エクソソームを使用し，効率的に血中エクソソームを回収した．対象患者と健常人の全血採取後，遠心して血漿を分離し，-80℃で保管した．37℃温浴で血漿を溶解させたのち，300 g×10分（4℃），1900 g×20分（4℃），10000 g×30分（4℃）で遠心し，上清を0.20 μmフィルターでろ過した．得られた血漿2 mlずつからExocap Isolation and Enrichiment Kits for Serum Plasma（MBL社）を用いてプロトコールに従ってエクソソームを回収した．回収したエクソソームからExocap Nucleic Acid Elution Buffer（MBL社）を用いてプロトコールに従ってmiRNAを含むtotal RNAを抽出し，27 μlのRNase free water に溶解した．

細胞由来エクソソームmiRについては，当研究室で樹立したGBM幹細胞（GIC）細胞株およびU251（GBM cell line）と正常神経幹細胞（NSC）の培養上清からExoMir Kit（BIOO SCIENTIFIC）を用いてエクソソーム内のRNAを抽出した．グリオーマ幹細胞の樹立方法については文献12に準じて行った．

GIC -E6の培養上清から超遠心法にてエクソソームを回収し，電子顕微鏡にてその形態観察を行った．超遠心法については既存の報告の通り行った[13]．超遠心機はOptima XPN-80（BECKMAN COULTER）を用いた．

透過型電子顕微鏡での観察

染色液に0.25%モリブデン酸アンモニウムと1 M KOHの混合液を用いたネガティブ染色にてGIC培養上清由来エクソソームをグリッド膜に吸着させ，透過型電子顕微鏡JEM-1400（日本電子）を用いて形態観察を行った．

ウェスタンブロッティング法

定量PCRに用いた検体のうちGBM患者２人と健常人１人の血漿各1 mlずつからExocap Isolation and Enrichiment Kits for Serum Plasma（MBL社）を用いて回収したエクソソームに1×Sample Bufferを加え，SDS-PAGEにて展開した．展開後，PVDF膜（Amersham Hybond P；GEヘルスケアジャパン株式会社）に転写した．一次抗体として，mouse ant-ihuman CD63（1：200；BD）を用い，goat anti-mouse IgG（1：10000；Santa Cruz Biotechnology）が結合した二次抗体で処理し，ChemiDoc MP（BIORAD）にて発光させた．

RNAシークエンス（RNA-seq）およびマイクロアレイ

血漿エクソソーム由来total RNAのRNA-seqについてはDNAチップ研究所にて，シークエンス用ライブラリ作成，Illumina社のHi-seqによるシークエンス，遺伝子プロファイルの網羅的な解析を行った．Fold change値は（GBM患者の発現量（log2）／健常人の発現量の平均（log2））で求めた．培養細胞の培養上清由来エクソソーム内total RNAについてもDNAチップ研究所に委託しマイクロアレイ解析を行った．Fold change値は（GIC細胞株の発現量（log2）／NSCの発現量（log2））で求めた．

定量PCR

Total RNA 5 μlからTaqman MicroRNA Reverse Transcription Kitを用いて逆転写を行いcDNAを合成したのち，Taqman Universal Master Mix II と Taqman microRNA assays（Applied Biosystems）を用いたPCR反応によりリアルタイムPCR（ABI社Step One Plus）を行った．内在性コントロールとしてmiR-328を用いた．PCR反応の条件は50 ℃２分，95 ℃10分の後95 ℃15秒，60 ℃60秒を45サイクルとした．定量PCRは各回triplicateで行った．

統計学的処理

２群間の比較検討にはStudent's T testを用い，$p<0.05$を統計学的有意とした．グラフは平均値±S.E.値で示した．

結　　果

１．GBM特異的血漿エクソソームmiRの検討

健常人とGBM患者血漿から調整したエクソソーム分画について，エクソソームの代表的なマーカータンパク質CD63に対するwestern blotting（図１）を用いてエクソソームの回収を確認した．RNA-seq解析により健常人コントロールとGBM患者の血漿エクソソーム中に含まれるmiRを比較検討した．その結果，GBM患者血漿エクソソームに多く含まれるmiR（Fold change値≧2）34種と有意に少ないmiR（Fold change値≦−2）47種を同定した．GBM患者血漿エクソソームに多く含まれるmiRには，miR-320を含め[10]文献報告されている複数のmiRが含まれていたことから，本実験結果の信頼性は高いと判断した．GBM患者血漿エクソソームに５倍以上のFold change値を示す上位５種のmiRは，miR-144，-186，-27a，-20aと-208aであった（図２）．GBM患者血漿エクソソーム中における個々のmiRのリードカウントはmiR-144では８と非常に低く，その他４種のmiRでは100以上であった．また，miR-208aを除く４種の候補miRのグリオーマ形成における機能は既に報告されていたが[14-19]，５種類の候補miRがGBM患者血漿エクソソームに多く含まれるバイオマーカーであることを示した論文はない．しかし，miR-144，-27a，-208aは他がん種を含む疾患患者血漿エクソソーム内バイオマーカー miRとして報告されていることから[20-22]，GBMバイオマーカー miRとしての新規性を重視してmiR-20aとmiR-186の解析を進めた．

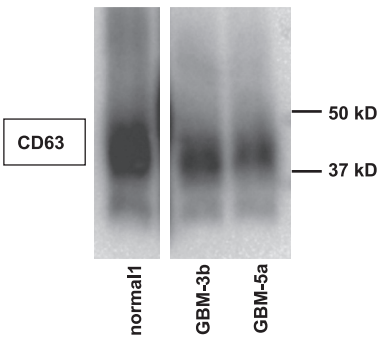

図１　Exocap Composite Kit(MBL)で回収した血漿中CD63陽性エクソソームのウェスタンブロットでの解析像
健常人（normal1）とGBM患者（GBM-3b, GBM-5a）の血漿からエクソソームを濃縮し，ウェスタンブロットにて両者の血漿中にCD63陽性エクソソームが含まれていることを確認した．

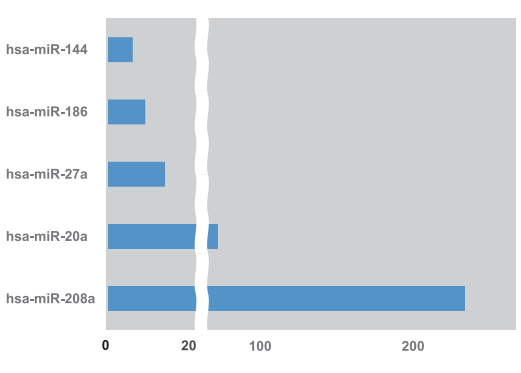

図２　GBM患者血漿エクソソームに多く含まれるmiR群
GBM患者（n=1）と健常人コントロール（n=2）について，RNA-seqにより遺伝子プロファイルを網羅的に解析した。健常人（normal 1，normal 2の平均値）と比較してGBM患者血漿由来エクソソーム画分に含有量の高いmiR（Fold change値>5）をグラフに示しており，miR-144-3p，miR-186，miR-27a-3p，miR-20a-5p，miR-208aであった．

RNA-seqの結果を確認するために，GBM患者血漿エクソソーム７検体と健常人２検体から調整したtotal RNAを用いてmiR-20aとmiR-186量について定量PCRにて検証した．その結果，miR-20a量はサンプルNo.3a，5aで顕著に多かったが，それ以外の検体については健常人（normal 1, normal 2とも）との差は見られなかった（図３）．一方，miR-186量は１例（No.2）を除き，初発（No.4，5a）と再発（No.1，3）患者の術前血漿において有意に増加していた（図４）．加えて，同一患者の術前と術後血漿（No.5aとNo.5b）を用いた実験結果を比較すると術後血漿エクソソーム内のmiR-186が有意に減少していた（図5a，5b）．

２．血漿エクソソームmiRとGIC分泌エクソソームmiRの比較

GICはGBM発生と再発の根幹細胞であり，その存在数は予後に影響を及ぼす．GICが分泌するエクソソーム（図６）に含まれるmiRを患者体液サンプルから検出するこ

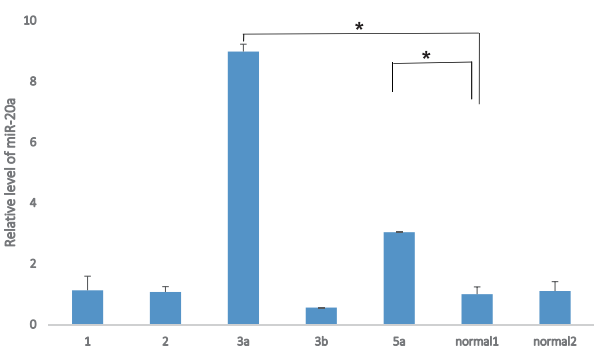

図３　各サンプルにおけるmiR-20aの含有量

GBM患者血漿エクソソーム中で特異的に多く含まれていたmiR-20aに着目し，残りの検体（n=6）について定量PCRを行って含有量の差について検討した．

normal 1を１としたときの相対定量値を示す．術前のサンプルNo.1～5aのうち，No.3aと5aでmiR-20aの高い含有量を示した．（＊p<0.05）

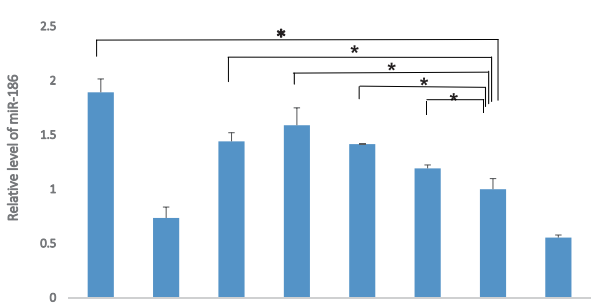

図４　各サンプルにおけるmiR-186の含有量

GBM患者血漿エクソソーム中で特異的に多く含まれていたmiR-186に着目し、残りの検体（n=7）について定量PCRを行って含有量の差について検討した．

normal 1を１としたときの相対定量値を示す．術前のサンプルNo.1～5aのうち，No.2以外のすべてのサンプルでmiR-186の高い含有量を示した．（＊p<0.05）

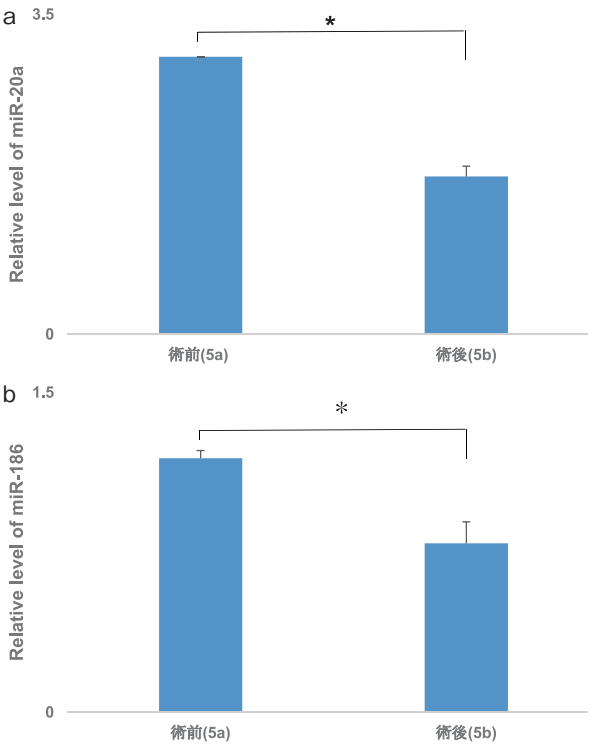

図５　サンプルNo.5における術前術後のmiR量の比較

術前術後におけるmiRの含有量を比較した．縦軸にnormal 1を基準とした相対定量値を示す．（＊p<0.05）

a：miR-20aの含有量は術後に有意に低下し，健常人レベルとなった．b：miR-186の含有量は術後に有意に低下し，健常人レベルとなった．

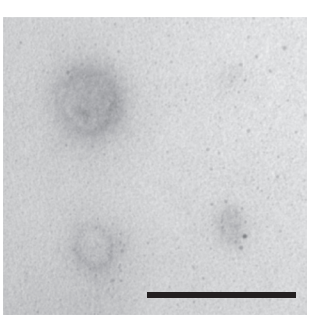

図６　超遠心法で回収したGIC-E6由来エクソソームの透過型電子顕微鏡での観察像（bar, 200 nm）．

とが出来れば，GBMの進行度や再発状況のモニタリングが可能となる．そこで，血漿エクソソームmiR群とGICが分泌するエクソソームmiR群を比較検討した．GIC5種，GBM細胞株U251と正常神経幹細胞（NSC）から分泌されたエクソソーム内miRについて，DNAマイクロアレイを用いた解析を行った結果（図７），NSC分泌エクソソームとGIC分泌エクソソームに含まれるmiRは大きく異なるパターンを示した．NSC分泌エクソソームmiRと比較して全てのGIC分泌エクソソームに多く含まれる18種のmiRを同定した（表２）．この中でmiR-144のみがGBM患者血漿とGIC分泌エクソソームに共通して多く含まれていることを

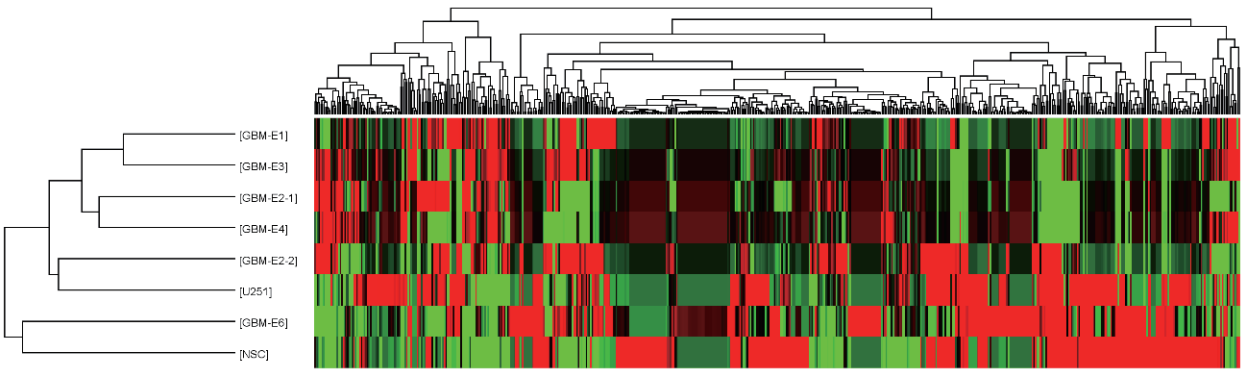

図７　GICとNSCのマイクロアレイ解析によるmiRの分布

ヒトGBMから樹立したGIC5株（GIC1，2，3，4，6），GBM cell line U251とヒトNSCの培養上清から回収したエクソソームに含まれるmiRについてクラスター解析を行った．GICとNSC由来エクソソーム中のmiRは大きく異なるパターンを示したが，エクソソームmiRプロファイルは由来細胞によってばらつきがみられた．

表２　GICとU251細胞株分泌エクソソーム内に多く含まれるmiR群

	GIC						cell line
miR Name	E1	E2-1	E2-2	E3	E4	E6	U251
hsa-let-7f	2.16	2.01	2.01	2.90	2.69	2.86	2.98
hsa-miR-100	2.85	3.10	2.91	3.34	2.71	3.30	2.98
hsa-miR-23a	2.99	3.06	2.75	3.30	3.30	3.30	3.69
hsa-miR-1202	3.82	2.55	2.55	3.49	3.82	2.91	2.97
hsa-miR-29a	4.08	2.65	3.38	2.69	2.83	3.56	4.97
hsa-miR-376c	5.04	5.56	4.79	4.30	4.01	4.77	3.47
hsa-miR-493*	4.34	5.44	5.67	5.25	5.28	4.77	2.39
hsa-miR-495	6.39	5.83	5.89	6.36	5.47	4.30	2.95
hsa-miR-127-3p	5.87	5.48	6.83	6.24	5.61	5.03	4.24
hsa-miR-122	6.44	5.50	7.12	7.12	7.42	2.10	2.55
hsa-let-7b	5.65	5.65	6.33	6.14	6.50	5.96	7.38
hsa-miR-376a	6.91	7.19	6.31	5.50	5.89	6.60	4.61
hsa-miR-136	7.22	6.20	6.62	6.77	6.42	5.50	4.03
hsa-miR-584	8.19	8.91	0.28	7.40	9.76	4.34	8.87
hsa-miR-133b	7.79	6.41	6.00	8.91	9.09	3.48	2.16
hsa-miR-451	8.36	6.79	4.99	8.73	8.36	4.77	4.39
hsa-miR-142-3p	9.30	7.88	6.09	10.24	10.39	5.22	4.80
hsa-miR-144	10.34	8.23	5.97	10.92	10.72	5.69	4.85

GICとU251細胞株分泌エクソソームに共通して多く含まれていたmiR 18個を示す．このうちmiR-144はGBM患者血漿エクソソームに多く含まれていた．NSCと比較した各種細胞のFold change値を示す．

表３　GBM患者血漿エクソソームに多く含まれるmiR群のGIC，GBM細胞株，NSC分泌エクソソーム内での含有量（Log2 [raw data]）

	GIC							
miR Name	E1	E2-1	E2-2	E3	E4	E6	NSC	U251
hsa-miR-144	10.52	8.42	6.15	11.11	10.91	5.88	0.19	5.04
hsa-miR-186	4.93	4.97	3.66	6.15	0.82	6.58	6.26	4.64
hsa-miR-27a	10.96	10.57	11.44	10.26	10.01	8.89	8.67	11.56
hsa-miR-20a	9.10	7.43	8.42	9.59	8.89	11.44	12.44	8.63
hsa-miR-208a	0.41	0.75	0.47	0.62	0.82	0.07	0.19	0.18
hsa-miR-21	13.67	13.67	14.99	13.67	12.83	13.15	11.90	14.53
hsa-miR-320a	6.25	5.38	7.17	4.83	6.50	6.38	6.92	6.43
hsa-miR-574-3p	5.84	5.45	5.45	5.80	0.82	6.06	3.97	4.39

miR-208aを除いた７種のmiRは，GIC，GBM細胞株，NSC分泌エクソソームに多く含まれていた．

発見した．しかし，GBM患者血漿エクソソーム内miR-144のRNA-seq解析でのリードカウントは非常に低く，定量PCRでは検出できない可能性があった．その他のmiRは，GBM患者血漿エクソソーム内では検出限界量以下か健常人と変わらない含有量であった．

次に，GBM患者血漿エクソソームに多く含まれていた5種のmiRと今までに報告されていた[6, 10]３種のmiR（miR-21，-320a，-574-3p）がGIC分泌エクソソームに含まれているか検証した（表３）．miR-144はGICとGBM細胞株分泌エクソソームに特異的に含有されていた．miR-208aは，検討した８種類の細胞の分泌エクソソームに殆ど含まれていなかったが，miR-186を含むその他の６種のmiRは全ての細胞分泌エクソソームに存在した．

これらの結果は，GICとNSC由来エクソソームに含まれるmiRプロファイルの比較検討から抽出したGIC特異的miR-144がGBM患者血漿エクソソーム中でのシグナルは弱いものの，共通に含まれていることを示した．

考　　察

GBMに対する様々な取り組みにも関わらず，過去数十年にわたり劇的な改善がみられる治療法は開発されていない[23-24]．発生臓器の重要性を鑑みて，病変が小さく神経症状がないような早期に腫瘍を摘出することが出来れば，患者にとって大きな福音となる．このために，GBMの発生と再発過程をモニタリングできる感度の高いバイオマーカーの同定は必要不可欠である．

実用性の高いバイオマーカーを探索する上で必要な条件は，(1) 病態と関連していること，(2) 試料採取が低侵襲で簡便であること，(3) 試料が比較的安定であること，(4)

高いS/N比の確保と考えられる．これらの条件を満たす候補試料が，血液中で安定に存在するエクソソームに含まれる核酸である．その中でも，21-25塩基から構成されるmiRは，長鎖核酸（mRNA，long non-coding RNA，DNA断片）に比べて分解される可能性が低く，PCRによる増幅も可能であることに加えて，その分布が分泌細胞の性状を反映していることから，理想的なバイオマーカーといえる．

我々は，新規GBM診断用バイオマーカーを探索するために，RNA-seqを用いたGBM患者と健常人の血漿エクソソームmiRのプロファイルの比較検討から，GBM患者血漿エクソソームに多く含まれる５種類のmiRを同定した．これら候補miRとGBMを含むグリオーマとの関連については，miR-186を除く４種のmiRについて以下のような機能が報告されている．miR-144はc-Metを標的としてGBMの増殖と浸潤能を抑制し[14]，miR-27aはForkhead box O3（FOXO3）やBTG family member 2（BTG2）を標的としてGBMの増殖を抑制していた[15, 16]．miR-20aは，tissue-inhibitor of matrix metalloprotease 2（TIMP2）を阻害することでGBM細胞の組織浸潤を促進することやNK細胞の活性化に関わる受容体（NKG2D）に結合するリガンド（NKG2DL）の発現を抑制することにより腫瘍免疫の回避に働いているとされていた[17, 18]．また，miR-186はX-linked inhibitor of apoptosis（XIAP）とp21 activated kinase 7（PAK7）を標的としてグリオーマ細胞株の生存・増殖を抑制することが報告されている[19]．このように，GBM患者血漿中には腫瘍に対して抑制的又は促進的に働くmiRを包含する多様なエクソソームが存在し，その分泌細胞の同定が腫瘍全体像の理解と新たながん治療法の創出に繋がる可能性がある．

抜粋した５種のmiRがGBM患者血漿エクソソームに含まれるバイオマーカー候補であることを示した論文は見当たらないが，miR-144，-27a，-208aは遠隔虚血プレコンディショニング（RIPC），大腸がん，循環器疾患における血漿エクソソーム内バイオマーカー miRとして既に報告されていることから[20-22]，新規性を重要視してmiR-20aと-186について複数のGBM患者と健常人血漿エクソソームを用いた確認を行った．その結果，miR-20aはサンプル間でばらつきがあったものの，miR-186は６サンプル中５サンプルでGBM患者血漿エクソソームに多く含まれていることを確認した．さらに，miR-186は初発と再発のGBM患者の術前血漿エクソソームに多く含まれ，同一患者の術後サンプルでは健常人レベルまで減少していることを発見した．加えて，Human miRNA tissue atlas（https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas）を使用した検索から，miR-186の発現は全ての正常組織で低レベルであることを確認した（図８）．これらの結果は，血漿エクソソーム内miR-186が前治療に関わらずGBM発生・再発をモニタリング

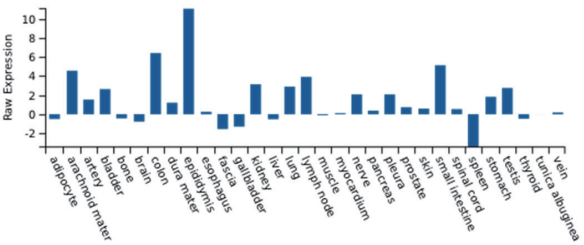

図８　正常組織におけるmiR-186の発現
Human miRNA tissue atlasから，miR-186は副睾丸に若干の発現（Raw expression 11程度）が認められる以外，検討した全ての組織でその発現は低い．

できる病態に即した理想的なバイオマーカーである事を示唆している．また，我々は，miR-186がヒトGICとNSCが分泌したエクソソームに共通して多く含まれていることを発見した．この結果はmiR-186が幹細胞性を有する細胞が分泌するエクソソームに含まれている可能性を示し，その機能と発現制御メカニズムは大変興味深い．

病態に即したバイオマーカーとなるエクソソームmiRを同定する目的として，健常人とGBM患者血漿エクソソームmiRのプロファイルとNSCとGIC分泌エクソソームmiRのプロファイルを比較検討した．その結果，これら２つのmiRプロファイルが大きく異なることを発見した．この結果はGIC分泌エクソソームmiRが血中エクソソームmiRを反映していないというManterolaらの報告と一致する[10]．その理由としては，GBM患者の全体細胞数に対するGIC数は極めて少ないことからGIC由来の血中エクソソームも微量であることが想像され，本研究で遂行した全血漿エクソソームから抽出したmiRを用いた解析では，GIC分泌エクソソームmiRの十分なシグナルを検出できていない可能性が挙げられる．私たちは，今回の研究でGIC分泌エクソソームに含まれるmiR-144を唯一GBM患者血漿エクソソーム内に検出した．患者血漿エクソソーム内のmiR-144シグナルは非常に弱く，定量PCRで検出できない可能性があったことから，現時点ではGBMバイオマーカーとしての有用性に疑問が残る．最近の報告ではエクソソームの回収時に，対象とする分泌細胞固有の膜タンパク質を標的とすることで特定の細胞由来のエクソソームを特定することが可能であるといわれている．大腸がんではCD147とCD9共陽性エクソソームを標的とし[25]，膵臓がんでは特異的膜タンパク質glypican-1を標的とする[26]ことで臓器特異的なエクソソームを捕捉することができるとし，さらにそのマーカーとしての有意性は感度特異度ともに既存の血清マーカーよりも高いとされている．GBMにおいてもそのようなGIC分泌エクソソーム膜タンパク質を同定・利用することにより，GBM患者血漿中の微量なGIC分泌エクソソームを濃縮してmiR-144を含むGIC分泌エクソソーム特異的miRをGBM患者血漿中に検出することは可能と思われる．一方

で，患者の病態に一致するバイオマーカー候補として同定した血漿エクソソームmiR-186が，GICとNSC分泌エクソソームにも豊富に含まれていることを発見した．この結果は，幹細胞性を有する細胞が分泌するエクソソームmiRが診断用バイオマーカーになりうる事を示唆している．

腫瘍形成は，がん細胞自身の増殖とがん細胞とその周辺細胞のコミュニケーションにより成立すると考えられる．エクソソームは細胞間コミュニケーション方法の１つであることから，腫瘍周辺細胞もエクソソームを放出していることが予測される[27, 28]．今回同定した５つのGBM患者血漿エクソソームmiRがGIC，GBM細胞株，NSC分泌エクソソームに含まれているかを検討した結果，miR-208aはこれら細胞分泌エクソソームには含まれていなかった．これは，miR-208aが腫瘍に影響を受けた非腫瘍細胞から分泌されたエクソソームに由来することを示唆している．Human miRNA tissue atlas（https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas）を使用した検索から，miR-208aの発現は，筋肉組織（特に心筋細胞）に限局し，その他の組織では殆ど検出されない（図９）．これらの結果は，腫瘍に影響を受けた細胞がmiR-208aを発現していることを示唆し，その機能や発現制御機構については今後解析する予定である．

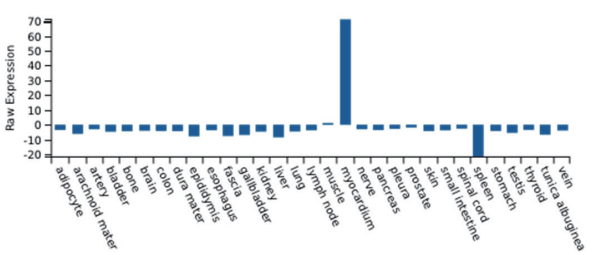

図９　正常組織におけるmiR-208aの発現

Human miRNA tissue atlasから，miR-208aは心筋に強い発現（Raw expression 71程度），筋肉（Raw expression 11程度）に弱い発現が検出される以外、その他の組織でその発現レベルは極めて低い．

miRは標的mRNAと1対1の制御ではなく，複数のmiRが標的mRNAの制御に関わっているため，複数のmiRを組み合わせてバイオマーカーとして応用することで信頼性が高いマーカーとなると考えられる．今後検体数を増やし，これらmiRがGBMの病態に即した診断マーカーであることを確認する必要があると考えられる．

結　　論

健常人とGBM患者の血漿エクソソーム内miRとGBM形成・再発に関わるGIC由来エクソソーム内miRの網羅的な解析により，GBMの診断バイオマーカーとなりうるmiR-186を同定した．

謝　　辞

本稿を終えるにあたり，本研究に数々のご援助，ご協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学教室ならびに北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野，愛媛大学医学部脳神経外科学教室の教室員各位，DNAチップ研究所のスタッフの皆様，位相差電子顕微鏡の技術指導を賜りました北海道大学歯学研究科学術支援部の牛島技術専門職員，柏葉脳神経外科病院の大滝敏裕様と山崎祐実様に厚く御礼申し上げます．

参　考　文　献

1）Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, Partin AW : Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. JAMA, 294 : 433-439, 2005.

2）元井冬彦，島村弘宗，石山秀一，及川昌也，桜井直樹，阿南陽二，中村隆司，内山哲之，片寄　友，海野倫明：膵臓癌切除後腫瘍マーカー非正常化は重要な予後因子である．日本消化器外科学会雑誌, 45 : 697-707, 2012.

3）Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO : Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol, 9 : 654-659, 2007.

4）Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T : microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. Silence, 1 : 7, 2010.

5）Bakhti M, Winter C : Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. J Biol Chem, 286 : 787-796, 2011.

6）Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO : Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol, 10 : 1470-1476, 2008.

7）Svensson KJ, Kucharzewska P, Christianson HC, Sköld S, Löfstedt T, Johansson MC, Mörgelin M, Bengzon J, Ruf W, Belting M : Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 108 : 13147-13152, 2011.

8) Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, Lötvall J, Nakagama H, Ochiya T. : Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. Nat Commun, 6 : 6716, 2015.
9) Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T : The roles of extracellular vesicles in cancer biology : toward the development of novel cancer biomarkers. Proteomics, 14 : 412-425, 2014.
10) Manterola L, Guruceaga E, Gállego Pérez-Larraya J, González-Huarriz M, Jauregui P, Tejada S, Diez-Valle R, Segura V, Samprón N, Barrena C, Ruiz I, Agirre A, Ayuso A, Rodríguez J, González A, Xipell E, Matheu A, López de Munain A, Tuñón T, Zazpe I, García-Foncillas J, Paris S, Delattre JY, Alonso MM : A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. Neuro Oncol, 16 : 520-527, 2014.
11) Kenneth W.W, Edit I.B, Lynne T.B, Adriana B, Cecilia L, Jan L, Esther N. NH, Melissa G.P, Sarada S, Johan S, Clotilde T, Marca H. Wauben, Fred H : Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. J Extracell Vesicles, 2 : 20360, 2013.
12) Yamashita D, Kondo T, Ohue S, Takahashi H, Ishikawa M, Matoba R, Suehiro S, Kohno S, Harada H, Tanaka J, Ohnishi T : miR340 suppresses the stem-like cell function of glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator. Cancer Res, 75 : 1123-1133, 2015.
13) 落谷孝弘 : エクソソーム解析マスターレッスン. 26-43, 実験医学別冊, 羊土社, 2014.
14) Lan F, Yu H, Hu M, Xia T, Yue X : miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met. J Neurochem, 135 : 274-286, 2015.
15) Ge YF, Sun J, Jin CJ, Cao BQ, Jiang ZF, Shao JF : AntagomiR-27a targets FOXO3a in glioblastoma and suppresses U87 cell growth in vitro and in vivo. Asian Pac J Cancer Prev, 14 : 963-968, 2013.
16) Li WQ, Yu HY, Zhong NZ, Hou LJ, Li YM, He J, Liu HM, Xia CY, Lu YC : miR 27a suppresses the clonogenic growth and migration of human glioblastoma multiforme cells by targeting BTG2. Int J Oncol, 46 : 1601-1608, 2015.
17) Codo P, Weller M, Meister G, Szabo E, Steinle A, Wolter M, Reifenberger G, Roth P : MicroRNA-mediated down-regulation of NKG2D ligands contributes to glioma immune escape. Oncotarget, 5 : 7651-7662, 2014.
18) Wang Z, Wang B, Shi Y, Xu C, Xiao HL, Ma LN, Xu SL, Yang L, Wang QL, Dang WQ, Cui W, Yu SC, Ping YF, Cui YH, Kung HF, Qian C, Zhang X, Bian XW : Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. Oncogene, 34 : 1407-1419, 2015.
19) Zheng J, Li XD, Wang P, Liu XB, Xue YX, Hu Y, Li Z, Li ZQ, Wang ZH, Liu YH : CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186. Oncotarget, 6 : 25339-25355, 2015.
20) Li J, Rohailla S, Gelber N, Rutka J, Sabah N, Gladstone RA, Wei C, Hu P, Kharbanda RK, Redington AN : MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. Basic Res Cardiol, 109 : 423, 2014.
21) Ostenfeld MS, Jensen SG, Jeppesen DK, Christensen LL, Thorsen SB, Stenvang J, Hvam ML, Thomsen A, Mouritzen P, Rasmussen MH, Nielsen HJ, Ørntoft TF, Andersen CL : miRNA profiling of circulating EpCAM(+) extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer. J Extracell Vesicles, 5 : 31488, 2016.
22) Navickas R, Gal D, Laucevičius A, Taparauskaitė A, Zdanytė M, Holvoet P : Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. Cardiovasc Res, 111 : 322-337, 2016.
23) Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO : Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol, 10 : 459-466, 2009.
24) Ostrom QT, Gittleman H, de Blank PM, Finlay JL, Gurney JG, McKean-Cowdin R, Stearns DS, Wolff JE, Liu M, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS : American Brain Tumor Association Adolescent and Young Adult Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. Neuro Oncol, 18 (Suppl 1) : i1-i50, 2016.

25) Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M, Furuta K, Nakajima T, Hayashi H, Sugisaki H, Higashimoto H, Kato T, Takeshita F, Ochiya T : Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun, 5 : 3591, 2014.
26) Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnica-Worms D, Kalluri R : Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. Nature, 523 : 177-182, 2015.
27) Kalluri R, The biology and function of exosomes in cancer. J Clin Invest, 126 : 1208-1215, 2016.
28) Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T : Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. J Clin Invest, 126 : 1163-1172, 2016.

ORIGINAL

Plasma exosomal microRNA as a potential biomarker for glioblastoma multiform

Kyoko Yamaguchi[1, 2], Tetsuo Moriguchi[2], Daisuke Yamashita[3], Takanori Ohnishi[3], Sadao Kaneko[4], Ryo Matoba[5], Kanchu Tei[1] and Toru Kondo[2]

ABSTRACT : Glioblastoma multiform (GBM), the most malignant brain tumor with a median survival rate of about 15 months, frequently recurs despite multimodal treatment with surgery and chemo/radiotherapies. One of the reasons why GBM is incurable is that it is impossible to remove all of GBM cells invading into the large area of brain, when patients are diagnosed. It is, therefore, crucial to identify a simple and sensitive biomarker that diagnoses GBM at its earliest stage.

Exosomes are extracellular vesicles secreted by all cells including tumor cells. Since exosomes contain mRNA, microRNA (miR) and proteins specific for the cell of origin, and are relatively stable in body fluids including blood, they are attracting more attention as targets for identifying new biomarkers.

Here we addressed to identify new diagnostic exosomal miR in the plasma of GBM patients, by comparing with those of healthy volunteers. Plasma samples were collected from six GBM patients and two healthy controls. We have performed RNA sequence analysis, using plasma exosomes from one preoperative GBM patient and two healthy volunteers and identified that thirty four miRs were predominantly included in the plasma exosomes of GBM patients, while forty seven ones did in those of healthy volunteers. Among the GBM plasma exosome miRs, we focused on miR-186 and miR-20a, as they have not yet shown as exosome biomarkers. Using plasma exosomes from five GBM patients and two volunteers, we performed qRT-PCR and verified the increase amount of miR-186 in the GBM plasma exosomes, whereas miR-20a showed no significant difference between GBM plasma exosomes and control ones. It should be notable that miR-186 in the GBM plasma exosomes decreased after operation, and significantly increased in recurrence. Taken together, our results identified miR-186 as a potentially useful GBMdiagnostic biomarker.

Key Words : glioblastoma multiform (GBM), exosome, microRNA (miR), biomaker

[1]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kanchu Tei) , Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan
[2]Division of Stem Cell Biology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Toru Kondo) Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060-0815, Japan
[3]Department of Neurosurgery, Ehime University Graduate School of Medicine, Toon, Ehime, 791-0295, Japan
[4]Department of Neurosurgery, Kashiwaba Neurosurgical Hospital, No. 7-20, 15-chome, 1-jyou, Tsukisamuhigashi, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido, 062-8513, Japan
[5]DNA Chip Research Inc., Minato-ku, Tokyo, 105-0022, Japan