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［全文の要約］
Author(s)	山口, 響子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12610号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66158
Type	doctoral thesis
File Information	Kyoko_Yamaguchi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

Plasma exosomal microRNA as a potential biomarker for glioblastoma multiform

（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）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　山　口　響　子

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．実際に，他臓器がんでは，PSA，CA19-9，AFP や PIVKA-II など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．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．エクソソームは分泌細胞の情報や機能を他の細胞・組織ならびに個体間に伝搬する媒介体として働くと考えられている．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や，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ことが報告されている.

このように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．そこで私たちは，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以下の 2 点について解析を行った.

1．GBM 血漿エクソソーム miR の検討

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，術前に採取された血漿 7 検体と，術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. 血漿からエクソソームを回収し，エクソソームから miRNA を含む total RNA を抽出した.

まず GBM 患者 1 検体と健常人 2 検体の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により，GBM 患者血漿エクソソームに多く含まれる miR 34 種と有意に少ない miR 47 種を同定した．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．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．加えて，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, 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.

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 量は一部の術前血漿で顕著に多かったが，それ以外の検体については健常人との差は見られなかった．一方，miR-186 量は 1 例を除き，初発例のみならず既に標準治療を施されている再発例においても術前血漿において有意に増加していた．また，同一患者の術前後の miR 含有量を比較すると，術後血漿エクソソーム内の miR-20a と miR-186 量が有意に減少していた．これらの結果から miR-186 が前治療に関わらず GBM 発生・再発をモニタリングできる病態に即したバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された.

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 は強い腫瘍形成能をもち，放射線化学療法にも抵抗性を示すことから，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に含まれる miR を患者体液サンプルから検出することが出来れば，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．

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．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)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．その結果，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，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. さらに GBM 患者血漿エクソソーム miR との比較では, 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含まれていることを発見した.

このように今回の結果から，まず miR-186 が GBM 患者の病態に即したバイオマーカー候補となることが示唆された．また， GIC 分泌エクソソーム特異的な miR と GBM 患者のバイオマーカー候補と両者で共通に認められた miR は miR-144 のみであった. 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予想される．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．すい臓がんや大腸がんではそれぞれの分泌細胞特異的なエクソソーム膜タンパク質を同定して，バイオマーカーとして応用しているという報告があることから，血漿エクソソーム中から GIC 分泌エクソソーム膜タンパク質を同定・利用することが出来れば, 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.

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．

ただし，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．今後は，検体数を増やし，今回解析を行った 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．