

氏名（本籍）	前川由佳	（岐阜県）
学位の種類	博士	（医学）
学位授与番号	甲第1224号	
学位授与日付	令和5年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Profiling of Serum Extracellular Vesicles Reveals miRNA-4525 as a Potential Biomarker for Advanced Renal Cell Carcinoma	
審査委員	（主査）教授	永井 宏樹
	（副査）教授	大沢 匡毅
		教授 山田 陽一

論文内容の要旨

（目的、緒言）

進行性腎細胞癌の治療は分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤の登場により進歩したものの、依然として死亡率は高いままである。そのため腎細胞癌では早期診断や再発のモニタリングが必要であるが、腎細胞癌の診断や予後予測のための適切なバイオマーカーはない。細胞外小胞（EV）は細胞から分泌される膜小胞であり、内部に分泌元細胞のタンパクや核酸を含む新しい疾患バイオマーカーとしての可能性が報告されている。本研究では腎細胞癌のバイオマーカー探索のため EV 内の miRNA に着目し、その網羅的解析を通して腎細胞癌の進行に関連する因子を見出すことを目的とした。

【対象と方法】

研究対象者：2015年1月～2019年5月に腎細胞癌と診断された患者18人および健常者7人。倫理委員会の承認及び患者の同意を得た後に血清を採取し-80度で保存した。

細胞株：腎細胞癌の細胞株としてCaki-1, OS-RC-2を使用した。

EV単離：TIM4結合磁気ビーズを作製し、血清又は細胞培養上清と反応させてEVを単離した。

miRNAマイクロアレイ：3D-Gene RNA extraction reagentにてEVからmiRNAを抽出したのちに3D-Gene Human miRNA Oligo chipを用いて網羅的解析を行った。

RT-qPCR：患者血清及び細胞培養上清EVからmiRNAを調整し、cDNAを合成しそれぞれのプローブを用いて定量的RCRを行った。

プロテオーム解析：miRNA-4525阻害剤を腎細胞癌細胞株に導入し、UltiMate 3000 RSLCnano systemを用いてLiquid chromatography-tandem mass spectrometryを行った。

【結果】

- ① ヒト血清からTIM4結合磁気ビーズで採取した分画はCD9とCD63を発現しておりEVを含んでいることが確認できた。対象群、早期腎細胞癌、進行性腎細胞癌患者のプール血清中のEVから採取したmiRNAマイクロアレイを行ったところ、進行性腎細胞癌患者群で1.5倍以上上昇しているmiRNAは9個同定できた。その中で上位のmiRNA-4516, 4534及び4525を疾患バイオマーカー候補として、さらなる解析対象に選定した。
- ② miRNA-4524, 4534がRT-qPCRで同定可能であり、中でもmiRNA-4525は進行性腎細胞癌患者の血

清 EV 内で有意に増加していた。

- ③ 血清 EV 内の miRNA-4525 発現が組織内の情報を反映していることを確認するために、外科的に切除された腎細胞癌組織とそれに隣接する正常組織における miRNA-4525 発現量について RT-qPCR 解析を行ったところ、癌組織中での miRNA-4525 の有意な発現上昇を確認できた。
- ④ miRNA-4525 の生理学的意義を検討するために、miRNA-4525 阻害剤を腎細胞癌細胞株に導入しプロテオーム解析を行った。Caki-1 と OS-RC-2 細胞において 1.5 倍以上の発現上昇を認めたタンパクはそれぞれ 32 と 45 個同定できた。その中で共通するタンパク質はアルブミンとアルファフェトプロテイン (AFP) であった。

【考察】

EV は癌をはじめとする様々な疾患のバイオマーカーとして大きな可能性を秘めているが、マイクロアレイ解析やプロテオーム解析などの網羅的解析に適した EV 精製法は確立されていない。本研究では腎癌バイオマーカーを探索するために、血清タンパク結合 miRNA の混入を抑えた EV 採取法である TIM4 磁気ビーズを利用して採取した EV の miRNA のプロファイリングを行った。その結果 1700 以上の miRNA の同定、定量が可能であり、miRNA-4525 が進行性腎細胞癌患者で増加していた。この現象は同じ患者の腎細胞癌組織と正常組織でも確認できたことから、血清中 EV の miRNA プロファイリングは癌細胞内の情報を反映している可能性を示すことができた。miRNA-4525 に関しては膵管癌患者の血中 EV での増加も報告されており、今後の癌バイオマーカーとしての有用性の検討が必要である。miRNA-4525 の機能は今までに報告がないため、阻害剤を用いてプロテオーム解析を行ったところ AFP とアルブミンの発現増加が認められた。腎癌と AFP の関連は明らかではないが、腎細胞癌患者において低アルブミン血症は、栄養失調、異化亢進及び全身炎症を反映し、多くの臨床研究で低アルブミン血症と全生存期間の短縮との関係が報告されている。そのため EV 中 miRNA-4525 は腎細胞癌から血液中に分泌後に肝細胞に運ばれアルブミン合成を阻害し低アルブミン血症をもたらす可能性がある。このことは低アルブミン血症が腎細胞癌の予後不良因子であることと一致するが、この仮説を裏付けるにはさらなる研究が必要であると考えられる。

【結論】

TIM4 結合磁気ビーズによって精製した血清 EV は miRNA-4525 のマイクロアレイ解析で有用であった。また血清 EV 中の miRNA-4525 が腎細胞癌のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 前川 由佳 は、腎細胞癌の新規バイオマーカー探索のため、細胞外小胞 (EV) 内 miRNA の解析を行った。マイクロアレイおよび RT-qPCR 解析の結果、進行性腎細胞癌患者の血清 EV では、miRNA-4525 が有意に増加していることを見出した。このことは、血清 EV 中の miRNA-4525 が腎細胞癌の新規バイオマーカーとなる可能性を示唆するものであり、本研究の成果は泌尿器科学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

【主論文公表誌】

YUKA MURAMATSU-MAEKAWA, KYOJIRO KAWAKAMI, YASUNORI FUJITA, MANABU TAKAI, DAIKI KATO, KEITA NAKANE, TAKU KATO, TOMOHIRO TSUCHIYA, TAKUYA KOIE, YURI MIURA, MASAFUMI ITO and KOSUKE MIZUTANI : Profiling of Serum Extracellular Vesicles Reveals miRNA-4525 as a Potential Biomarker for Advanced Renal Cell Carcinoma
Cancer Genomics Proteomics 18, 253-259 (2021)