

胃癌制圧に向けた慢性胃炎を対象とした 胃発癌リスク診断システムの構築と臨床応用

聖マリアンナ医科大学 内科学（消化器・肝臓内科）

教授 伊東 文生

（共同研究者）

聖マリアンナ医科大学 内科学（消化器・肝臓内科） 准教授 山本 博

聖マリアンナ医科大学 内科学（消化器・肝臓内科） 臨床教授 渡邊 嘉行

はじめに

本邦において、癌が死亡原因の第1位であり、癌好発年齢である中・高年者の増加と共に著しい増加を示している。国民の2人に1人が癌に罹患し、3人に1人が癌で死亡するなか、胃癌は、癌部位別死因の第2位であり、分子病態の解明に基づく、侵襲性の低い胃発癌リスク診断マーカーの同定は極めて重要な意義を有している。胃癌や慢性胃炎患者は多く（国内だけでも数千万人を超える）、ピロリ菌除菌による胃癌予防効果、ABC検診や内視鏡診断には限界がある。斬新な着想や方法論による新しい視点で突破口を切り開く胃癌研究が急務である。従って、生検を必要とせず、かつ胃を面として捉える診断マーカーに着目した。

目 的

エクソソームは生体内のさまざまな細胞および癌細胞から分泌される40～100nmの膜小胞で、血液、尿、唾液、腹水などの体液に存在する¹⁻³。エクソソームが酸性環境でも安定していることに着目し、胃液からエクソソームを抽出し、エクソソーム機能分子の胃発癌に伴う変化を明らかにし、エピジェネティックな異常およびmicroRNA（miRNA）異常を統合した慢性胃炎の胃発癌リスク診断マーカーを開発する。それを基盤に*H. pylori*感染および薬剤感受性診断をも組み込んだ診断・治療・予防一体化統合臨床システムおよび発癌リスクに基づく慢性胃炎の画期的個別化医療統合システムを構築することを目的とする。

方 法

1) 胃癌細胞株および胃癌患者の胃液からのエクソソーム抽出

ExoQuick-TC試薬等を用いて、プロトコルを改変、最適化し行った。

2) エキソソームの確認

電子顕微鏡および抗CD9抗体等を用いたウェスタンブロットにより解析した。

3) エキソソームからのDNA、miRNA抽出

それぞれプロトコルを改変、最適化し行った。

4) DNAメチル化解析

DNAをバイサルファイト処理後、パイロシーケンスにより複数の遺伝子のDNAメチル化を定量解析した。細胞株においては、エキソソーム由来DNAのメチル化と核DNAのメチル化を比較した。胃液においては、エキソソーム由来DNAのメチル化と同一症例の胃癌組織パラフィン切片から抽出したDNAを用いたメチル化を比較した。

5) miRNA発現解析

TaqManリアルタイム法により解析した。

結 果

1) 胃癌細胞株および胃癌患者の胃液からのエキソソーム抽出、確認

胃癌細胞株および胃癌患者の胃液からExoQuick試薬等を用いてエキソソームを沈殿させた。電子顕微鏡によって40～100nmの膜小胞を確認した。また、抗CD9抗体等を用いたウェスタンブロットにより、エキソソームが抽出できたことを確認した。

2) エキソソームからのDNA抽出およびDNAメチル化の検出

エキソソームからDNAを抽出し、ゲル電気泳動解析したところ、long fragmentsを検出することができた。細胞株における複数の遺伝子のDNAメチル化に関して、エキソソームDNAおよび核DNAを対象とした解析結果が相関していることを明らかにした。同様に胃液から抽出したエキソソーム由来のDNAを用いたメチル化解析結果と同一症例の胃癌組織パラフィン切片から抽出したDNAを用いたメチル化解析結果が相関していることを明らかにした。

3) エキソソームからのRNA抽出およびmiRNA発現の検出

エキソソーム由来RNAを対象に種々のmiRNA発現を解析することができた。

考 察

我々は、通常内視鏡検査時に廃棄される胃洗浄廃液から回収したDNAを診断ツールとして用いる胃癌超早期診断法（胃洗浄廃液診断）を開発⁴し、更なる技術の発展として酸性環境で

も安定しているエクソソーム¹⁻³に着目した。本研究では、まず、胃癌細胞株培養上清および胃液からエクソソームを抽出し、その機能分子（DNA、miRNA、蛋白質等）のバイオマーカーとしての有用性を検討することとした。つまり、エピジェネティックな異常およびmiRNA異常を統合した慢性胃炎の胃発癌リスク診断マーカーを開発することを目的とした。

胃癌細胞株培養上清からのエクソソーム抽出の報告はあるが、胃液からのエクソソーム抽出の報告は認めない。従って、市販のエクソソーム抽出試薬のプロトコルを改変するなど検討を重ね、胃液からのエクソソーム抽出を試みた。

エクソソームが抽出できているかの確認は、電子顕微鏡とウェスタンブロットにより、行った。電子顕微鏡によって40～100nmの膜小胞を確認した。また、抗CD9抗体等を用いたウェスタンブロットにより、特異的バンドを検出した。以上により、胃液からの抽出物は、エクソソームであると考えられた。

エクソソームからのRNA（miRNA）抽出に関しては、多数報告されているが、DNA抽出の報告は少ない⁵⁻⁷。我々は、エクソソームからのDNA抽出に際し、プロトコルを改良することにより、良質なDNAを抽出することができた。さらに、ゲル電気泳動解析したところ、long fragmentsを検出することができた。従って、次にDNAをバイサルファイト処理し、パイロシーケンシングによるDNAメチル化解析を試みた。

まず、細胞株において、複数の遺伝子のDNAメチル化を検出することができた。核DNAのメチル化情報がエクソソームDNAに反映されているか、両者のDNAメチル化解析結果を比較検討した。興味深いことに、核DNAとエクソソームDNAを対象としたDNAメチル化解析結果が相関していることを明らかにした。従って、メチル化DNAが、エクソソーム内にパッケージングされていると考えられた⁷。

同様に胃液から抽出したエクソソーム由来のDNAを用いたメチル化解析結果と同一症例の胃癌組織パラフィン切片から抽出したDNAを用いたメチル化解析結果が相関していることを明らかにした。従って、胃液エクソソームを用いたDNAメチル化解析は、有望なマーカーとなりうると考えられた。エクソソーム内にパッケージングされたメチル化DNAの機能的意義は今後の検討課題である⁸。

次にmiRNA発現の検討を行った。胃液エクソソーム由来RNAを対象にTaqManアッセイによるリアルタイムPCRを用いて、種々のmiRNA発現を解析することができた。しかしながら、定量化したmiRNA発現を分子マーカーとして用いるには、比較するコントロールの選択の問題もあり、容易ではない。胃癌組織で発現が亢進している癌遺伝子的miRNA（Oncomir）の発現が、胃液エクソソーム由来miRNA発現に反映されているかなど今後、検討する必要がある。

今後、さらなる解析が必要であるが、本研究の知見を基盤とし、慢性胃炎の胃発癌リスク診断マーカー開発が期待できる。さらに*H. pylori*感染および薬剤感受性診断⁹をも組み込んだ診断・治療・予防一体化統合臨床システムおよび発癌リスクに基づく慢性胃炎の画期的個別化医療統合システムの構築も期待できる。これらにより、国民とくに癌好発年齢である中・高年者の保健・医療および福祉に大きく寄与することが望まれる。

要 約

胃癌細胞株上清および胃癌患者の胃液からのエキソソーム抽出に成功した。さらにエキソソームからのDNAおよびRNA抽出、DNAメチル化解析およびmiRNA発現解析に成功し、複数の有望なマーカー候補を得た。今後、これらの知見を基盤とし、慢性胃炎の胃発癌リスク診断マーカーの開発が期待できる。

文 献

1. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med* 91: 431–437, 2013.
2. Saleem SN, Abdel-Mageed AB. Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression. *Cell Mol Life Sci* [Epub ahead of print], 2014.
3. Kosaka N, Yoshioka Y, Tominaga N, Hagiwara K, Katsuda T, et al. Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy. *Future Oncol* 10: 671–681, 2014.
4. Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chung W, Estecio MR, et al. Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology* 136: 2149–2158, 2009.
5. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2: 180, 2011.
6. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem* 289: 3869–3875, 2014.
7. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 24: 766–769, 2014.
8. Mittra I, Nair NK, Mishra PK. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J Biosci* 37: 301–312, 2012.
9. Baba S, Oishi Y, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, et al. Gastric wash-based molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Digestion* 84: 299–305, 2011.