

氏 名	駕 田 修 史
(ふ り が な)	(かごた しゅうじ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 1191 号
学 位 審 査 年 月 日	令和元年7月31日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 名	Analysis of Extracellular Vesicles in Gastric Juice from Gastric Cancer Patients (胃癌患者胃液由来細胞外小胞の解析)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 樋 口 和 秀 教授 田 中 慶 太 朗 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

胃癌は本邦全悪性疾患の部位別死亡数で第3位であり、早期診断が望まれる。近年、新たなバイオマーカーとして細胞外小胞中遺伝産物の応用が試みられている。細胞外小胞とは生体内の細胞および培養細胞から分泌される膜小胞で、miRNA, mRNA, DNA, Protein 等の遺伝情報を内包している。大きさと分泌過程によって exosomes (エクソソーム) と microvesicle (マイクロベジクル) に分別され、総称として extracellular vesicles(以下 EVs) と定義されている。生体内では血液、唾液、尿、羊水、腹水等の体液中で EVs の存在が確認され、細胞から分泌後、目的の細胞へと運ばれ、細胞や組織間のシグナル伝達の役割を担っている。特に、がん細胞由来 EVs は、がん由来遺伝子を含んでいると報告されている。胃癌患者の胃液は癌に接していることよりがん細胞由来の EVs が含まれていることが予想されるが、胃液は粘液成分が多く EVs の抽出に適した試料とされておらず、研究が進んでい

ない。本研究で、我々は胃癌患者の胃液中 EVs の存在を同定し、機能解析を行うことを目的とした。

《対象》

2 種の胃癌細胞株 (KATO-III、MKN7) 及び、18 例の胃癌患者の胃液を対象に解析した。機能解析として胃癌患者胃液由来 EVs の正常線維芽細胞 (ASF-4) に対する効果を検証した。

《方法》

超遠心法を用いて EVs の回収を行った。超遠心法は 100,000 rpm (450,200×g)、3 時間で行った。前処理として、0.23mm のメッシュで濾過の後、分離した粘液を細断したうえで濾過液と混合し、再度 0.22µm のフィルターで濾過した。形態学的観察として Nano tracking analysis を用いた粒度分布解析、透過型・走査型電子顕微鏡による超微形態的解析、レーザー顕微鏡を用いた三次元画像解析を行った。EVs 陽性マーカーとして抗 TSG 抗体、抗 CD9 抗体、抗 CD81 抗体を、陰性マーカーとして抗 GM130 抗体、抗 Calnexin 抗体を使用し、ウェスタンブロット法で解析した。EVs 中の代表的遺伝子産物として知られる microRNA (miRNA) の存在・発現をバイオアナライザー、リアルタイム PCR 法で解析した。検索する miRNA としては、EVs の Housekeeping Gene として他の臨床試料で用いられている MIRLET7A1-5p, MIR16-5p, MIR103a-3p, MIR191-5p, MIR423-5p, RNU6-6P を選択した。さらに、同様の超遠心条件で抽出した EVs を、正常線維芽細胞 (ASF-4) に曝露し EVs の取り込み及び、細胞増殖能を検証した。適宜、胃癌細胞株から抽出した EVs を比較対象として用いた。

《結果》

先ず初めに、胃液中の EVs は胃粘液に包埋される形で存在することを、透過電子顕微鏡で確認した。観察された小胞は免疫蛍光顕微鏡で EVs の特異的マーカーである CD63 が陽性であった。次に、前処理を加えた胃液から超遠心法で EVs を回収し、形態学的観察を行っ

た。Nano Tracking Analysis 解析では 200 nm 付近の小胞が含まれていることが示され、走査型、透過型電子顕微鏡で観察では、100 nm 以下の小胞及び、300 nm 程度の小胞が確認された。ウェスタンブロット法では、抗 TSG 抗体、抗 CD9 抗体、抗 CD81 抗体の発現が確認され、抗 GM130 抗体、抗 Calnexin 抗体は陰性であった。バイオアナライザーでは EVs には 25 から 200 ヌクレオチドの RNA が含まれ、18S、28S ribosomal RNA ピークは観察されなかった。リアルタイム PCR では EVs 中の Housekeeping Gene である MIRLET7A1-5p, MIR16-5p, MIR103a-3p, MIR191-5p, MIR423-5p, RNU6-6P いずれの発現も確認された。特に MIR16-5p と MIR191-5p が比較的安定して発現していた。進行 4 型胃癌症例では miRNA の収量および発現が顕著なものが確認された。EVs の ASF-4 に対する曝露実験では、RNA 染色した EVs が ASF-4 に取り込まれていることをレーザー顕微鏡で確認した。細胞増殖能に関する検証では EVs の曝露により ASF-4 細胞の増殖増加が確認され、胃癌患者胃液中 EVs は癌微小環境を修飾する可能性があることが示唆された。

《考察》

近年、血液や尿中の EVs は新たなバイオマーカーとして期待されているが、胃液中の EVs は粘液中に存在し回収に難渋することが想定され、胃液中 EVs 解析に関する報告は殆どない。また、胃液由来 EVs の回収法を詳細に記載した論文はなく、本成果が初の報告である。EVs の抽出方法は超遠心法の他に、免疫学的補足法、サイズ排除法、リン脂質アフィニティー、ポリマー沈降法等が挙げられる。本研究では、胃液の粘性を考慮して超遠心法を選択した。しかし、実験過程で抽出に難渋したため、粘液中の EVs を取り出すための前処理を加えることが必要であった。概して本法は比較的簡便に施行でき、今後における胃液由来 EVs の詳細検討等への幅広い応用が期待される。

胃癌は肉眼型で 0 - 5 型の 6 型に分類されるが、中でも 4 型胃癌は早期診断が困難で予後不良である。今回の検討結果では、4 型胃癌において RNA 量が他に対して多い症例が存在し、バイオマーカーとしての可能性が示唆された。また、がん関連線維芽細胞はがん細胞の発育・進展に重要な役割を果たしていることが報告されており、4 型胃癌との関連も報告さ

れている。本検討でも胃癌患者胃液由来 EVs により線維芽細胞の増殖増加を示したことから、胃液由来 EVs ががん微小環境を修飾している可能性が示唆された。しかし健常者胃液由来 EVs 中の遺伝子プロファイリングとの差異の検討が今後の課題として残った。

《結論》

胃癌患者の胃液から超遠心法を用いて EVs の抽出方法を確立した。また、胃癌患者の胃液中に存在する EVs が線維化などのがん微小環境を修飾している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

細胞外小胞 (EVs) は細胞から分泌される膜小胞で miRNA, mRNA, DNA, Protein 等の遺伝情報を含有する。がん細胞由来 EVs を介した細胞間伝達のがんの発育・進展に関与していると報告されている。生体内では血液、唾液、尿、羊水、腹水等の体液中で EVs が確認されている。近年、血液や尿中の EVs は新たなバイオマーカーとして期待されているが、胃液中の EVs の解析に関する報告は殆どない。

今回、申請者は胃液中に包埋される形で EVs が存在していることを形態学的観察 (Nano tracking analysis を用いた粒度分布解析、透過型・走査型電子顕微鏡による超微形態解析、レーザー顕微鏡を用いた三次元画像解析)、EVs マーカーを用いたウェスタンブロット法、EVs に含まれるとされる microRNA 発現をバイオアナライザー、リアルタイム PCR 法により確認し、胃癌症例の胃液から前処理を加えた超遠心法を用いて胃液中の EVs の回収法を確立した。これまで、胃液由来 EVs の回収法を詳細に記載した論文はなく新たな知見である。EVs 中には microRNA が含まれていることが知られているが、4 型胃癌症例における胃液由来 EVs 中の RNA 量が他の症例に対して多く、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。がん関連線維芽細胞は、4 型胃癌を含めたがん微小環境を担う重要な構成因子であり、がん細胞の発育・進展に寄与していることが報告されている。本研究では胃癌患者の胃液由来 EVs を曝露することにより線維芽細胞が増殖増加を示したことから胃液由来 EVs が、がん微小環境を修飾している可能性が示唆された。さらに今後症例を蓄積しながら、健常者の胃液中 EVs 中の遺伝子産物において、胃癌患者との差異が同定できれば、胃液由来 EVs が胃癌における新規バイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences

20(4): 953, 2019, doi: 10.3390/ijms20040953 <オンライン掲載>