

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Circulating *MicroRNA-92b-3p* as a Novel Biomarker for Monitoring of Synovial Sarcoma

(循環型 *microRNA-92b-3p* の滑膜肉腫患者における新規バイオマーカーとしての有用性)

魚谷弘二、藤原智洋、吉田 晶、岩田慎太郎、森田卓也、清野正普、横尾 賢、國定俊之、
武田 健、長谷井嬢、沼本邦彦、根津 悠、米本 司、石井 猛、川井 章、落谷孝広、
尾崎敏文

Scientific Reports 7: 14634(1-11), 2017

平成 29 年 7 月 第 50 回 日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会に発表

参 考 論 文

Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in
osteosarcoma

(循環型 miR-25-3p の骨肉腫に対する診断・予後予測マーカーとしての重要性)

藤原智洋、魚谷弘二、吉田 晶、森田卓也、根津 悠、小林英介、吉田明彦、上原健敬、
大森敏規、杉生和久、小松原将、武田 健、國定俊之、川村眞智子、川井 章、落谷孝広、
尾崎敏文

Oncotarget 8(20): 33375–33392, 2017

主 論 文

Circulating *MicroRNA-92b-3p* as a Novel Biomarker for Monitoring of Synovial Sarcoma (循環型 *microRNA-92b-3p* の滑膜肉腫患者における新規バイオマーカーとしての有用性)

【緒言】

希少がんである軟部肉腫は、集学的治療により予後は徐々に改善しているものの、再発や転移により致命的な経過をたどる症例も少なくない。軟部肉腫の予後改善には、再発および転移の早期発見が重要であるが、現在のところ有用なバイオマーカーがないことが軟部肉腫患者の診療において大きな問題である。近年、様々な遺伝子発現を制御する *microRNA* (*miRNA*) が体液中で循環していることが近年解明され *liquid biopsy* への応用が期待されている。本論文では滑膜肉腫における新規バイオマーカーの開発を目指し、血清中の *miRNA* に着目し研究を行った。

【対象と方法】

細胞株

肉腫細胞株として (1) 滑膜肉腫細胞株：SYO-1、HS-SY-II、YaFuSS、YamatoSS、(2) その他の肉腫細胞株：未分化多型肉腫 (UPS2023)、悪性末梢神経鞘腫瘍 (NMS2)、線維肉腫 (HT1080) を用いた。また、正常コントロールとしてヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用いた。

動物実験

4週齢のメス BULB/c nu/nu マウス臀部皮下に滑膜肉腫細胞株を細胞数 1 万個接種し、1 週ごとに腫瘍サイズを計測した。1 群は細胞株接種後 3 週で腫瘍切除を行った。対照群には PBS を同様に皮下注射し、経時的に腫瘍径と血清内の候補 *miRNA* の発現の変化を RT-qPCR を用いて検討した。

ヒト血清

滑膜肉腫患者、非肉腫患者および健常者の血清を用いた。*miRNA* の網羅的解析では各群 9 名、さらに独立したコホートとして各群 12 名の血清サンプルを用いた。各血清サンプル内の候補 *miRNA* の発現レベルを RT-qPCR を用いて検討した。

RT-qPCR

細胞株とその培養上清および血清内の *miRNA* を Qiagen 社製のキットを用いて抽出し、TaqMan プローブを用いて RT-qPCR を行った。解析は $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて行った。

miRNA の網羅的解析

患者血清および細胞株培養上清の *miRNA* を用いて Agilent 社により提供される手法で行った。

エクソソームの抽出

細胞株培養上清からは超遠心法を用いて、ヒト血清からはゲルろ過法である EV-Second カラムを用いてエクソソームを抽出した。

抽出したエクソソームの確認

抽出したエクソソームは Nanosight および電子顕微鏡によりサイズ分布と形態を確認し、ウェスタンブロットによりテトラスパニン蛋白の存在を確認した。

免疫沈降および免疫ブロット

ヒト血清に対して抗 Argonote2 (Ago2)抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにより確認した。

【結果】

miRNA の網羅的解析により候補 miRNA の特定

滑膜肉腫、非肉腫患者、健常者由来血清および滑膜肉腫細胞株の培養上清から得られた miRNA に対してマイクロアレイを行い、患者群および滑膜肉腫細胞株で発現が高く、患者群において術前よりも術後に発現が低下する miRNA として 4 つの候補が選出された。

miR-92b-3p は滑膜肉腫細胞内から細胞外へ分泌される

滑膜肉腫細胞株 3 種類と hMSC を用いて細胞数 40 万個あたりの細胞内および培養上清内の miRNA の発現を比較検討した。さらに、滑膜肉腫細胞株の細胞数 (10 万および 40 万) および培養時間 (培養開始 24 および 48 時間後) の変化による細胞株培養上清内の miRNA の発現レベルの変化を RT-qPCR を用いて検討した。候補 miRNA のうち、miR-92b-3p のみが hMSC と比較して全ての滑膜肉腫細胞株の培養上清内で発現が高く、細胞数および培養時間依存的に培養上清内の発現レベルが上昇した。

担がんマウスモデルにおいて血清内 miR-92b-3p は担癌状態を反映する

miR-92b-3p は滑膜肉腫細胞株接種後、経時的に血清内の発現レベルが上昇し、腫瘍サイズと正の相関を示した ($R = 0.776, p < 0.05$)。また、腫瘍切除により有意に血清内のその発現は減少した。

滑膜肉腫患者血清における血清 miR-92b-3p のバイオマーカーとしての意義

網羅的解析とは独立したコホートでも血清中の miR-92b-3p の発現レベルは滑膜肉腫患者群でいずれの群よりも高く、ROC 曲線による解析では AUC は 0.77 (CI=0.61-0.94)、感度は 81.8% で特異度は 63.6% であった。また、経時的に観察可能なサンプルが取得できた患者において、手術や化学療法の効果に伴い血清 miR-92b-3p の発現レベルは減少し、転移および増悪により上昇した。これに対してヘモグロビン値や白血球数は腫瘍の状態とは異なる変化を示していた。

血清 *miR-92b-3p* は滑膜肉腫以外の軟部肉腫患者では低値を示す

miR-92b-3p の特異性を確認するため、その他の軟部肉腫の細胞株（未分化多型肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、線維肉腫）および血清を用いて解析を行った。細胞株培養上清およびヒト血清いずれも滑膜肉腫群でその他の軟部肉腫群よりも *miR-92b-3p* の発現レベルは高かった。

血清 *miR-92b-3p* は Argonaute 2 よりもエクソソームを担体として体内を循環している

miRNA はエクソソームに内包されるか Ago2 蛋白と結合して主に体内を循環していることが知られている。滑膜肉腫細胞株培養上清からエクソソームを単離し、さらに RNA を抽出すると RT-qPCR で滑膜肉腫細胞株由来エクソソームに *miR-92b-3p* が含まれていることが示された。さらに、滑膜肉腫患者血清をゲルろ過法である EV-second 法により分画化し、テトラスパニン蛋白である CD9 がウェスタンブロット法で陽性である分画群（エクソソーム分画）と免疫沈降により Ago2 蛋白が含まれる分画群（Ago2 分画）で *miR-92b-3p* に対する RT-qPCR を行うと、エクソソーム分画で Ago2 分画よりも多くの *miR-92b-3p* が含まれていることが示された。このことにより Ago2 よりもエクソソームにより *miR-92b-3p* が体内を循環していることが示された。

【考察】

近年の様々な報告により、細胞内もしくは組織内の miRNA の発現異常はあくまでもその培養上清もしくは血清中の発現変化とは一致しないことがあると報告されている。過去の研究では、組織中の miRNA の発現異常から疾患バイオマーカーを探索するものが見られるが、バイオマーカーの開発において、患者血清や細胞株培養上清の miRNA を直接用いて網羅的解析を行うことは理にかなっていない。

また、血清 miRNA の中には白血球や赤血球などから分泌されるものもあり、バイオマーカーへの応用を目指すとき、腫瘍の状態以外に全身状態の変化による影響を受ける miRNA は使用しないことが望ましい。今回特定した血清 *miR-92b-3p* は、臨床検体による検討で白血球やヘモグロビン値に影響を受けずに腫瘍の状態を反映しており、この点でもバイオマーカーとして適している。

滑膜肉腫は融合遺伝子 *SS18-SSX* をもつことが特徴である。現在の滑膜肉腫の診断は、病理所見および PCR による *SS18-SSX* の発現の確認によりなされる。今回の検討では、滑膜肉腫細胞株培養上清由来のエクソソームには融合遺伝子の発現が確認されたが、患者血清および血清由来エクソソームからは融合遺伝子を検出できなかったため、融合遺伝子をバイオマーカーとして応用することは現在のところ困難である。

滑膜肉腫の発生源は現在のところ不明で、これまでの研究では神経堤由来である可能性が示唆されている。一方、*miR-92b-3p* は、グリオーマのアポトーシスに *Dkk3* および *Wnt/βcatenin* 系を通じて関連していることや、原発性脳腫瘍で高発現であること、マウス胚の脳において中間皮質脳細胞の発達を制御していることなどが言われており、我々が示した *miR-92b-3p* が滑膜肉腫細胞から分泌されているという結果は滑膜肉腫が神経堤由来であることを裏付ける可能性がある。

今回の検討では、*miR-92b-3p* は主にエクソソームに内包されることで体内を循環していることが示唆された。バイオマーカーとしての応用に際して、miRNA の担体を把握し、担体を抽出することでバイオマーカーとしての感度および特異度を上げることができる可能性があり、今後の検討を要する。

【結論】

今回我々が特定した *miR-92b-3p* は、滑膜肉腫の病勢モニタリングを可能とするバイオマーカーになりうることを示唆された。さらに大規模な症例での検討が必要であるが、この新規バイオマーカーは滑膜肉腫の腫瘍の状態を早期に把握し、個々に応じた適切な治療方針を計画し、患者の予後改善につながる一助となる可能性がある。

参 考 論 文

Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma

(循環型 miR-25-3p の骨肉腫に対する診断・予後予測マーカーとしての重要性)

骨軟部肉腫における臨床上重要な問題の一つに、バイオマーカーが無いことが挙げられる。骨肉腫は小児から若年者に発生する、骨原発悪性腫瘍で最多の疾患である。原発腫瘍や再発腫瘍の検索には X 線や CT、PET-CT および MRI などの画像検査が用いられる。手術方法や集学的治療の発展に伴い、現在の 5 年生存率は約 60-80% であるが、局所再発や肺転移により予後は悪くなり、診断後の 5 年生存率は 30% 以下となる。さらに、術前強化化学療法に対する組織学的奏効性が、無病生存率の最も信頼できる予測因子といわれており、治療への反応性をリアルタイムにモニタリングすることや、再発や転移を早期に発見することは更なる予後の改善につながる。アルカリフォスファターゼ (ALP) は、骨肉腫の血液バイオマーカーとして使用されているが、若年者では ALP がそもそも比較的高値であることや臓器障害により ALP が上昇することから偽陽性となることが時にある。それ故、非侵襲的で感度・特異度の高いバイオマーカーの開発が骨肉腫の診療に望まれている。今回我々は、様々ながん種のバイオマーカーの研究で注目されている循環型 miRNA に着目して研究を行った。

骨肉腫患者および対照ヒト血清由来の miRNA および骨肉腫細胞株培養上清由来の miRNA を用いて網羅的解析を行い、患者群および骨肉腫細胞株で発現が高い miRNA として 8 種類の miRNA を選出した。そのうち、骨肉腫細胞株の培養上清内で細胞数および培養時間依存的に上昇する miRNA として miR-25-3p と miR-17-5p を特定した。

骨肉腫細胞株を臀部皮下に接種した担がんマウスモデルでは、どちらの miRNA も腫瘍の増大とともに血清内の発現は上昇した。miR-25-3p は腫瘍切除により血清内での発現が減少した。肺転移を起こした群では、肺転移を認めなかった群と比較してどちらの miRNA も血清内の発現レベルが高かった。

独立したコホート群における骨肉腫患者と非骨肉腫患者および健常者由来血清における候補 miRNA の発現を解析すると、miR-25-3p はいずれの群よりも骨肉腫患者群で発現が高かったが miR-17-5p は非骨肉腫患者群と骨肉腫患者群では優位な差を認めなかった。ROC 曲線による解析では、AUC は ALP で 0.724 であったのに対し miR-25-3p では 0.868、miR-17-5p では 0.720 であり、miR-25-3p が既存のマーカーである ALP よりもより良い感度と特異度を示すことが明らかとなった。さらに、治療経過に伴う腫瘍の状態を反映して血清中の miR-25-3p は変化した。また Kaplan-Meier 曲線を用いた解析により血清 miR-25-3p の発現レベルは、診断 3 年後の無転移生存率に関連していることが示された。

以上から血清 miR-25-3p は骨肉腫に対する非侵襲的な新規バイオマーカーとして応用できる可能性が示唆された。