

論文内容要旨

Predicting the presence of breast cancer using circulating small RNAs, including those in the extracellular vesicles

(細胞外小胞体由来血清中循環小分子 RNA を使用した乳癌診断バイオマーカーの開発)

Cancer Science, 2020, in press.

主指導教員：岡田 守人教授

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

副指導教員：栗井 和夫教授

(医系科学研究科 放射線診断学)

副指導教員：角舎 学行講師

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

厚井 裕三子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【諸 言】

体液中から腫瘍細胞や腫瘍特異的 DNA などを検出するリキッドバイオプシーは、低侵襲なうえ繰り返し測定が可能で腫瘍の全体像が評価できるため、早期発見や再発予測を目的とした臨床的有用性が期待されている。乳癌は我が国の女性における癌の罹患率第 1 位の悪性腫瘍である。近年の薬物療法の発展に伴い再発率は減少しているが、早期診断による早期治療介入が重要であることは異論ない。小分子 RNA はマイクロ RNA や transfer RNA fragment (tRF)などを含むノンコーディング RNA で、血液中を安定して循環し多くの腫瘍で発現プロファイルに違いがみられることが報告されている。細胞外小胞体は小分子 RNA や脂質、タンパク質などを内包し、能動的に細胞間コミュニケーションを担っている。内包された小分子 RNA は疾患ごとにプロファイル異なるため、その差を用いた癌診断の可能性が示唆されている。本研究は、血清中を循環する小分子 RNA を用いた乳癌の早期診断バイオマーカー探索および診断モデルの開発を目的とし、合わせて血清中および乳癌培養細胞上清中の細胞外小胞体に内包された小分子 RNA の発現を確認した。

【対象と方法】

- ① 2016 年 11 月から 2017 年 8 月に乳癌と診断された臨床病期 0-Ⅲの原発性乳癌 (78 例)と同時期に乳癌検診を受け異常なしと判定された健常女性(72 例)を対象とした。
- ② 血清から小分子 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて小分子 RNA の発現解析を行った。
- ③ 乳癌患者と健常女性のシーケンス解析結果を比較し、乳癌患者で発現量が有意に増加した複数の小分子 RNA を同定した。それらを組み合わせて乳癌を早期に検出可能な診断モデルを作成した。
- ④ 乳癌患者(32 例)および健常女性(20 例)の血清から抽出した細胞外小胞体に内包されている小分子 RNA の発現解析を行い、診断モデルに用いた小分子 RNA の発現変動を確認した。
- ⑤ 乳癌細胞株(MCF-7, MDA-MB-231)と正常乳腺細胞株(184-h TERT)の細胞培養上清から細胞外小胞体を抽出した。内包された小分子 RNA の発現解析を行い、診断モデルに用いた小分子 RNA の発現変動を確認した。

【結 果】

- ① 血清中小分子 RNA シーケンス解析の結果、isomiR of miR-21-5p (3' addition C), miR-23a-3p, tRF-Lys (TTT)の 3 つを乳癌診断バイオマーカーとして同定した。tRF は正式な名称が定まっておらず、本旨では 5'-GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUCAGAC-3'配列を有する tRF を、tRF-Lys (TTT)とした。これらの小分子 RNA は、乳癌の全例で検出され、健常女性と比較し有意に発現が上昇していた。
- ② 同定した 3 つの小分子 RNA を用いて重回帰分析による判別モデルを作成した。AUC は 0.92 (感度 79.5%、特異度 100%) と高精度であった。このモデルは、非浸潤性浸潤癌から判別可能であり、乳癌のサブタイプにかかわらず判別可能であった。

③ isomiR of miR-21-5p (3' addition C)と miR-23a-3p は乳癌患者の血清中($p < 0.01$)および乳癌細胞培養上清中の細胞外小胞体内に多く含まれており、血清中の循環型小分子 RNA と動向が一致していた。一方、tRF-Lys (TTT)は乳癌患者と健常女性の血清中細胞外小胞体に発現差を認めず($p = 0.62$)、正常乳腺細胞培養上清中の細胞外小胞体内に多く含まれていた。

【考察】

乳癌の検診は一般的にマンモグラフィーが用いられているが、放射線被曝や疼痛、乳腺濃度が高い若い女性への偽陰性率上昇が指摘されており、患者への身体的負担の少ない乳癌診断バイオマーカーの開発が求められている。今回の研究では、3つの血清中循環型小分子 RNA を用いた早期乳癌診断の可能性を示した。これにより、血液を用いたスクリーニングを行い、不必要な検査や組織生検などの侵襲を避けられる可能性が示唆された。また、次世代シーケンサーを用いたことにより、ゲノムにコードされた塩基配列とは異なる配列をもつ isomiR および tRF が新規乳癌バイオマーカーとして同定されたことは今後の乳がんにおける遺伝子発現調節機構の解明にもつながると考える。さらに、血清中および細胞培養上清中の細胞外小胞体についても同様の解析を行うことにより、乳癌に関与する小分子 RNA をバイオマーカーとして使用することが可能であった。今回同定した3つの小分子 RNA のうち、isomiR of miR-21-5p (3' addition C)と miR-23a-3p は血清循環型の結果と血清中および乳癌細胞培養上清中で結果が一致した。対照的に tRF-Lys(TTT)は変動が一致しなかった。tRF-Lys(TTT)に関しては細胞外小胞体ではなく、タンパク質や脂質に結合して血中を循環している可能性が示唆され、これらの意義については、今後さらなる検討を進めていかなければならないと考える。