

## 胃癌腹水中エクソソームに存在するmicroRNAの 臨床応用に向けた基礎的研究

<sup>1)</sup> 鳥取大学医学部 器官制御外科学講座 消化器・小児外科学分野

<sup>2)</sup> 鳥取大学技術部 化学バイオ・生命部門

<sup>3)</sup> 鳥取大学医学部 電子顕微鏡室

宮谷幸造<sup>1)</sup>, 梶見吉朗<sup>2)</sup>, 澤田将平<sup>1)</sup>, 牧野谷真弘<sup>1)</sup>, 宮内 亘<sup>1)</sup>, 宍戸裕二<sup>1)</sup>,  
松永知之<sup>1)</sup>, 坂本照尚<sup>1)</sup>, 長谷川利路<sup>1)</sup>, 堀江享史<sup>3)</sup>, 藤原義之<sup>1)</sup>

### Clinical application of exosomal microRNAs in peritoneal fluids of gastric cancer patients with peritoneal metastases

Kozo MIYATANI<sup>1)</sup>, Yoshiaki MATSUMI<sup>2)</sup>, Shohei SAWATA<sup>1)</sup>,  
Masahiro MAKINOYA<sup>1)</sup>, Wataru MIYAUCHI<sup>1)</sup>, Yuji SHISHIDO<sup>1)</sup>,  
Tomoyuki MATSUNAGA<sup>1)</sup>, Teruhisa SAKAMOTO<sup>1)</sup>,  
Toshimichi HASEGAWA<sup>1)</sup>, Atsushi HORIE<sup>3)</sup>, Yoshiyuki FUJIWARA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Division of Gastrointestinal and Pediatric Surgery, Department of Surgery, School of Medicine,  
Tottori University Faculty of Medicine*

<sup>2)</sup> *Division of Chemical Biology, Technical Department, Tottori University*

<sup>3)</sup> *Laboratory of Electron Microscopy, Tottori University*

#### ABSTRACT

The purpose of this study is to explore the exosomal microRNAs obtained from peritoneal fluids of gastric cancer patients, which are specific for peritoneal metastasis (PM) and could be a predictive marker of disease status in PM. Exosomes were isolated from peritoneal fluids of patients of gastric cancer with PM. Presence of isolated extracellular vesicles (EVs) from peritoneal fluid specimens were confirmed using a transmission electron microscope showed that many EVs were approximately 100 nm in diameter, which were equivalent to exosome fractions. We carried out RNA extraction and comprehensive array analysis of exosomal microRNAs and have identified that 86 microRNAs were significantly up- or down-regulated in all 4 specimens and that out of them, miR-323-3p was highly expressed in all 4 cases. In this way, we have established an experimental system for measuring exosomal microRNAs in peritoneal lavage specimens. Next, we plan to apply this analysis for additional peritoneal lavage specimens obtained from gastric cancer patients with or without PM and to identify specific microRNAs, which could be predictive biomarkers for the disease status of PM in gastric cancer.

(Accepted on May 13, 2021)

**Key words :** Gastric cancer, peritoneal metastasis, exosome, microRNA, biomarker

## はじめに

胃癌は、肺癌や大腸癌と並んで本邦においては、最も頻度の高い癌である<sup>1)</sup>。切除可能胃癌に対する治療成績は、低侵襲手術手技・周術期管理技術の向上により改善傾向である一方、切除不能・再発胃癌に対する治療成績は未だ満足できるものではない。生存期間中央値を指標にした場合、化学療法の進歩が目覚ましい切除不能進行再発大腸癌が30カ月を越えるまで延長しているのに対し<sup>2)</sup>、切除不能進行・再発胃癌の生存期間中央値は6~14カ月と不良である<sup>3)</sup>。

腹膜転移は、胃癌において最も多い転移再発様式であり<sup>4)</sup>、治療困難な病態である。通常、胃癌腹膜転移に対しては、肝転移や肺転移、遠隔リンパ節転移患者と同様に全身化学療法が選択されるが、腹腔内のblood peritoneal barrierにより十分量の薬剤が腹膜まで到達しにくい<sup>5)</sup>。そこで、腹腔内で高い抗癌剤濃度を維持し効果を増強させる方法として、抗癌剤を直接腹腔内に投与する腹腔内化学療法の有用性が報告された<sup>6)</sup>。本治療は、パクリタキセル (PTX) 腹腔内および静脈内投与、ならびにS-1内服併用療法での腹腔内化学療法であるが、先進医療での治療期間を終了し保険収載を目指している。当教室でも特定臨床研究 (C1704B011) として本治療を導入してこれまで約30例に対して治療を行い、再発から3年11カ月の長期予後で現在も治療継続中の症例を報告している<sup>7)</sup>。

一般的に、切除不能進行・再発胃癌の予後向上のためには、限られた化学療法レジメンを、適切なタイミングで切り替えて使い切ることが重要であると言われており、通常、CT検査を用いて描出される病変のサイズを測定し、治療継続の可否を判断する。しかしながら胃癌腹膜転移症例では、CT検査で病変が描出されず<sup>8)</sup>、確立した治療効果判定方法が存在しない点が解決すべき問題点として挙げられる。即ち、治療前、もしくは治療過程において化学療法による腹膜転移病変の治療効果を予見できるバイオマーカーの同定が急務である。

近年、細胞が分泌するエクソソームが癌研究において大きな注目を集めている。エクソソームは、癌細胞を含めたほとんどの細胞で分泌される直径50nm~150nm程度の膜小胞で、内部に様々なタンパク質や脂質、RNAが含まれており、離れた細胞や組織に情報を伝達し、腫瘍微小環境において

重要な役割を担っていると考えられている<sup>9,10)</sup>。胃癌腹膜播種患者においても近年、腹水中のエクソソーム中のmicroRNA (miRNA) が予後予測因子として有用であるとする報告がなされている<sup>11,14)</sup>。一方で、腹腔内化学療法中の胃癌腹膜播種症例において、腹水中のエクソソーム中のmiRNA発現量の「変動」を解析した報告はない。

そこで今回、当科で特定臨床研究 (C1704B011, 20C004) として行っている胃癌腹膜転移に対する腹腔内化学療法施行症例において、腹水中のエクソソーム中のmiRNAの推移を網羅的に解析し、①診断・治療バイオマーカーとしての利用 (リキッドバイオプシー)、②新規治療法の開発のシーズとなるmiRNAの探索研究へとつなげる、予備実験を行ったので、現在までに得られた結果を報告したい。

## 対象および方法

### 1. 対象

胃癌腹膜転移症例4名(腹腔内化学療法未施行症例2例/既施行症例2例, 年齢: 67歳~82歳) に対して、研究に対する詳細な説明を実施した後に、研究参加の同意を得た。

### 2. 腹水からのエクソソームの単離

採取した腹水は、4℃条件下において3,000gで15分間遠心することで夾雑物を除去した。エクソソームの単離には、Human Complete SeraMire Exosome RNA Amplification & profiling Kit (System Biosciences, Mountain View, CA) を用い、プロトコールに従って実施した。各1mLの腹水サンプルに240μLのExoQuickを加え、4℃で16時間静置した後に4℃条件下において3,000gで30分間の遠心を行い、遠心後のペレットをエクソソームとした。回収したエクソソームを含む分画は、透過型電子顕微鏡でネガティブ染色法によりエクソソームの存在とサイズを確認した。

### 3. エクソソーム内包microRNA発現の網羅的解析

単離したエクソソームを含む分画に対して、前述したHuman Complete SeraMire Exosome RNA Amplification & profiling Kitを用い、small RNA分画を含むtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。その後、miRNAの網羅的な発現解析には、Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて、380種のmiRNAについて発現状況を評価し

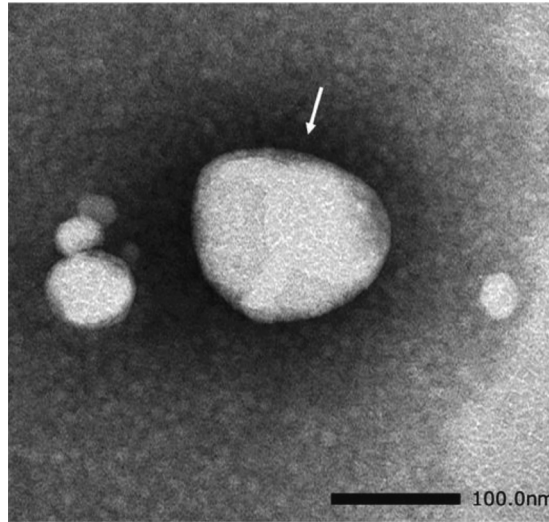


図1 胃癌腹膜転移症例の腹水中より単離したエクソソーム（矢印で示す）の電子顕微鏡像

表1 腹水中のエクソソーム内包miRNAの網羅的解析で発現変動を認めたmiRNA（miR-323-3pは4例に共通して最も高く発現していた）

let-7b				miR-148b				miR-335				
miR-19a				miR-149				miR-339-3p				
miR-19b				miR-151-3p				miR-362-5p				
miR-20b				miR-152				miR-375				
miR-21				miR-181a				miR-378				
miR-23a				miR-181c				miR-381				
miR-23b				miR-187				miR-421				
miR-24				miR-188-5p				miR-422a				
miR-26a				miR-191				miR-423-5p				
miR-27a				miR-193a-5p				miR-425				
miR-28-5p				miR-193b				miR-431				
miR-30a				miR-200b				miR-483-5p				
miR-30c				miR-211				miR-486-5p				
miR-30d				miR-212				miR-493				
miR-30e				miR-219-1-3p				miR-500				
miR-34c-3p				miR-221				miR-501-5p				
miR-92a				miR-223				miR-503				
miR-92b				miR-296-3p				miR-516a-3p				
miR-95				miR-300				miR-518b				
miR-101				miR-320a				miR-518e				
miR-105				miR-320b				miR-520c-3p				
miR-124				miR-320c				miR-520h				
miR-125a-5p				miR-320d				miR-523				
miR-132				miR-323-3p				miR-524-3p				
miR-133a				miR-323-5p				miR-542-5p				
miR-134				miR-324-5p				miR-548a-3p				
miR-139-3p				miR-330-3p				miR-548b-5p				
miR-146b-3p				miR-331-5p								

発現減弱      発現亢進

た。網羅的解析の結果から、4症例に共通して発現しているmiRNAを複数選抜した。

### 結 果

電子顕微鏡観察の結果、胃癌腹膜転移症例の腹水から単離した細胞外小胞は、エクソソーム分画であることを確認した（図1）。また、抽出された

total RNA濃度は、5.62~7.74 ng/μLであった。網羅的な発現解析では、4例に共通して86個のmiRNAに発現変動を認め、その中でもmiR-323-3pは4例に共通して最も高く発現していた（表1）。

### 考 察

がんの進展における細胞間のコミュニケーション

ンツールとしてはこれまでに、サイトカインなどのタンパク質が研究されてきたが、最近では、エクソソームもその細胞間のコミュニケーションツールとして働いていると考えられ、様々な癌種において報告がなされている。過去の胃癌腹膜転移症例の腹水中のエクソソーム内包miRNAの研究に関して、大澤らは、4種類のmiRNA (miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-223-3p, and miR-342-3p) が播種陽性症例で有意に増加しており<sup>11)</sup>、miR-29群の発現量減少が根治手術後の腹膜転移再発・予後と相関し<sup>12)</sup>、腹腔内化学療法を施行した患者で施行前のmiR-21/miR29-b, miR223/miR29-bが低いほど予後が良好であったと報告している<sup>14)</sup>。今回の我々の研究では、わずか4例と少数例の検討ではあるが、4例に共通してmiR-323-3pが最も高く発現していた。Wangらは膵管癌において、miR-323-3pを過剰発現させることでSMAD2/3の発現が抑制され、浸潤・転移能が阻害されることを報告している<sup>15)</sup>。SMAD2/3はTGF- $\beta$ シグナル伝達系における主要な転写因子であり、様々な補因子と結合することにより、多種多様な遺伝子発現の制御を行い、癌や線維症といった重篤な疾患に関与している<sup>16)</sup>。スキルス胃癌は腹膜転移を引き起こしやすい特徴があるが、その組織像は、がん組織の間質に著しい線維性組織増生を伴いながら、広範囲にわたって未分化型癌がびまん性浸潤を起こすものである。スキルス胃癌細胞が生産するTGF- $\beta$ が癌間質の筋線維芽細胞の発現を亢進させるという報告など<sup>17)</sup>、胃癌進展とTGF- $\beta$ の関連について検討した報告が過去に多くなされており、この度の我々の研究結果は、その一端を見ている可能性が示唆された。ただし、あくまでも予備実験段階の研究結果であり、今後症例数を増やし、腹膜転移陰性症例をコントロールとして設定し患者背景をそろえ、より詳細な検討が不可欠である。

## 結 語

胃癌腹膜転移症例の腹水からエクソソームを単離することに成功し、そのエクソソーム中で複数個のmiRNAの発現が変動していることが確認できた。今後、腹膜転移陰性症例も含めて症例数を増やし、腹膜転移陰性症例をコントロールとして腹膜播種に特徴的なmiRNAを同定し、その機能解析を行うとともに測定系を確立して、腹膜播種の診断に臨床応用していく予定である。

本研究は、令和2年度鳥取大学医学部研究助成の助成を受け実施した。

なお、本研究が探索的でpreliminaryな内容であることを鑑み、本論文は” Letter to Editor”として米子医学雑誌に掲載するものである。

## 文 献

- 1) 人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部編）。
- 2) 大腸癌研究会編：大腸癌治療ガイドライン 医師用 2019年版。金原出版、東京、2019。
- 3) 日本胃癌学会編：胃癌治療ガイドライン 医師用 第5版。金原出版、東京、2018。
- 4) Nashimoto A, Akazawa K, Isobe Y, et al: Gastric cancer treated in 2002 in Japan: 2009 annual report of the JGCA nationwide registry. *Gastric Cancer* 2013; **16**: 1-27
- 5) Jacquet P, Sugarbaker PH: Peritoneal-plasma barrier. *Cancer Treat Res* 1996; **82**: 53-63
- 6) Ishigami H, Fujiwara Y, Fukushima R, et al: Phase III Trial Comparing Intraperitoneal and Intravenous Paclitaxel Plus S-1 Versus Cisplatin Plus S-1 in Patients With Gastric Cancer With Peritoneal Metastasis: PHOENIX-GC Trial. *J Clin Oncol* 2018; **36**: 1922-1929
- 7) Miyatani K, Miyauchi W, Kono Y, et al: Successful treatment of peritoneal recurrence after gastric cancer surgery with intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 chemotherapy: a case report. *Surg Case Rep* 2020; **6**: 88
- 8) Kim SJ, Kim HH, Kim YH, et al: Peritoneal metastasis: detection with 16- or 64-detector row CT in patients undergoing surgery for gastric cancer. *Radiology* 2009; **253**: 407-415
- 9) Carrington JC, Ambros V: Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 2003; **301**: 336-338
- 10) Croce CM: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; **10**: 704-714

- 11) Ohzawa H, Kumagai Y, Yamaguchi H, et al: Exosomal microRNA in peritoneal fluid as a biomarker of peritoneal metastases from gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg* 2020; **4**: 84-93
- 12) Ohzawa H, Saito A, Kumagai Y, et al: Reduced expression of exosomal miR-29s in peritoneal fluid is a useful predictor of peritoneal recurrence after curative resection of gastric cancer with serosal involvement. *Oncol Rep* 2020; **43**: 1081-1088
- 13) Tokuhisa M, Ichikawa Y, Kosaka N, et al: Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS One* 2015; **10**: e0130472
- 14) Ohzawa H, Kimura Y, Saito A, et al: Ratios of miRNAs in Peritoneal Exosomes are Useful Biomarkers to Predict Tumor Response to Intraperitoneal Chemotherapy in Patients with Peritoneal Metastases from Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2020; **27**: 5057-5064
- 15) Wang C, Liu P, Wu H, et al: MicroRNA-323-3p inhibits cell invasion and metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via direct suppression of SMAD2 and SMAD3. *Oncotarget* 2016; **7**: 14912-14924
- 16) Miyazono KI, Moriwaki S, Ito T, et al: Hydrophobic patches on SMAD2 and SMAD3 determine selective binding to cofactors. *Sci Signal* 2018; **11**
- 17) Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, et al: Upregulation of cancer-associated myofibroblasts by TGF- $\beta$  from scirrhous gastric carcinoma cells. *Br J Cancer* 2011; **105**: 996-1001