

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Detection of Circulating MicroRNAs with Ago2 Complexes to Monitor the Tumor Dynamics of Colorectal Cancer Patients during Chemotherapy

(Ago2 タンパク質に関連した循環マイクロ RNA 測定を用いた大腸癌化学療法患者の抗腫瘍効果のモニタリング)

藤 智和、榎田祐三、入谷光洋、谷口文崇、河合 毅、安井和也、戸嶋俊明、吉田一博、藤原俊義、Ajay Goel、永坂岳司

International Journal of Cancer (掲載予定)

平成 27 年 9 月 The 18th European Cancer Congress/40th European Society for Medical Oncology2015 に発表

平成 27 年 10 月 The 115th Annual Congress of Japan Surgical Society に発表

主 論 文

Detection of Circulating MicroRNAs with Ago2 Complexes to Monitor the Tumor Dynamics of Colorectal Cancer Patients during Chemotherapy

(Ago2 タンパク質に関連した循環マイクロ RNA 測定を用いた大腸癌化学療法患者の抗腫瘍効果のモニタリング)

【緒言】

マイクロ RNA (miRNA) は 18~24 ヌクレオチドからなる非コード RNA であり、標的メッセンジャー RNA に結合してこれを抑制することで転写後調節を制御している。成熟 miRNA は血漿中で安定的に発現しており、その発現プロファイルによって悪性新生物をスクリーニングすることができると考えられている。

血液中の miRNA は様々な機序でリボヌクレアーゼによる分解に抵抗性を有しているが、大部分は蛋白質との結合によるものと報告されている。miRNA 結合タンパク質のなかで中心となるのが Argonaute2 (Ago2) であり、Ago2 は miRNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) の構成タンパク質として miRNA に結合してメッセンジャー RNA の抑制を調節している。Ago2 複合体と結合して血液中に存在する miRNA (Ago2-miRNAs) は主に死細胞からの放出に由来することが示唆されている。

もう一つの循環 miRNA の形態は、細胞外小胞 (EVs) に含有されて細胞から放出される miRNA (EV-miRNA) で、生存細胞から能動的に放出されて細胞間コミュニケーションに関与すると考えられている。

我々はこのような異なる形態の循環 miRNA を測定することによって癌患者に対する化学療法効果をモニタリングすることができるのではないかと仮定した。この研究では *in vitro* で 2 種類の miRNA の放出機構を調べ、*in vivo* で Ago2-miRNA が結腸直腸癌 (CRC) の化学療法に対する治療反応の予測やモニタリングに有効なバイオマーカーとなり得るかを評価した。

【材料 (対象) と方法】

研究材料

血漿サンプルは、I期からIV期までの治療前の結腸直腸癌 (CRC) 患者40名と、対照群として治療切除術から少なくとも1年経過したコンピュータ断層撮影 (CT) にて再発を認めない患者20名から採取した。化学療法中の血液サンプルは、2008年から2014年の間に岡山大学病院で行われた臨床試験に登録された4人のCRC患者において化学療法の各コース開始前に採取した。

ヒト大腸がん細胞株 HT29 をエキソソーム枯渇-10%FBS (System Biosciences) を添加した McCoy 培養液 (37°C、5%CO₂) で培養した。培養液 10ml 当たり 100 万個の細胞を 10cm² シャーレに播種し、24 時間ごとに 750 μl の培養液上清を収集した。48 時間の収集後に、5-FU 溶液を含む培養液 1ml をシャーレに添加して最終濃度を 0.5mM とした。細胞生存率は WST アッセイキット (Roche

Diagnostics)を、細胞毒性はLDH Assay Kit (DOJINDO) を用いて24時間ごとに測定した。

Ago2-miRNA と EV-miRNA の測定

Ago2 の免疫沈降は抗ヒト Ago2 モノクローナル抗体 (WAKO) と Pierce Classic IP Kit (Thermo Scientific) を用いて行った。血漿サンプルを PBS で 200 μ l に調整し、抗体と結合していない Protein A/G アガロース 20 μ l と一晩インキュベートした (プレクリアステップ)。回収した血漿を Ago2 抗体 1 μ g と室温で1時間インキュベートした。培養液は 200 μ l をプレクリアステップは施行せず Ago2 抗体と直接インキュベートした。上記サンプルを Protein A/G アガロース 20 μ l と、室温で1時間インキュベートして Ago2 と結合した複合体を回収し PBS で洗浄した。200 μ l のキアゾール (Qiagen) を添加し、5分間静置した後遠心分離にて溶出液を回収した。EVs は exoRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) を使用して 200 μ l の血漿または培地から回収した。

回収した Ago2 および EV から miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) を用いて miRNA を抽出した。標準化コントロールとして cel-miR-39 (1.6×10^8 コピー/ μ l) 3.5 μ l をサンプルに添加した。一本鎖 DNA 合成は miScriptII RT Kit (Qiagen) を用いて行った。miScript Primer Assays と miScript SYBR Green PCR キット (Qiagen)、LightCycler 480 (Roche Diagnostics) を用いて定量的リアルタイム PCR を行った。ターゲット miRNA の発現値は2回の反応を平均した Ct 値から cel-miR-39 の Ct 値を差し引くことによって Δ Ct を計算した。

miRNA PCR アレイ/マイクロアレイによる網羅的発現解析

miRNA PCR アレイは血漿 100 μ l より Ago2-miRNA および EV-miRNA を回収し、miScript PreAMP Human miRNome Primer Mix (Qiagen) と miScript PreAMP PCR Kit (Qiagen) を使用して miRNA を増幅し、miScript miRNA PCR Array human miRNome (Qiagen) を用いて包括的発現を評価した。

miRNA マイクロアレイは2名のCRC患者から採取した原発巣、正常結腸粘膜、肝転移巣の凍結標本を用いて行った。miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて miRNA を抽出し、The SurePrint G3 Human miRNA Microarray Kit Release 21.0 (Agilent Technologies) で分析した。

統計解析

統計解析は JMP ソフト ver10.02 (SAS Institute, Inc) にて行った。培養液中の miRNA 発現量は平均±標準偏差として表し、比較には t 検定を使用した。Ago2-miR-451 と血漿容量との関連性はピアソン積率相関係数で決定した。CRC 患者血漿サンプル中の Ago2-miRNA の Ct および Δ Ct 値を比較は Wilcoxon 符号順位検定を使用した。P 値は両側検定で <0.05 をもって有意とした。

【結果】

培養細胞株による細胞外 miRNA 放出機構の評価

HT29 細胞株を培養して播種後 48 時間で 5-FU を投与した。WST アッセイと LDH アッセイでは 5FU 非投与群は細胞死を伴わずに増殖する一方で、5-FU 投与群では投与直後から細胞増殖が減少して

投与 24 時間より細胞死が生じていた。培養液中の Ago-miRNA と EVs-miRNA (miR-21、miR-31、miR-200c) を 24 時間毎に測定したところ、非投与群では Ago2-miR-21 が指数関数的に増加しており能動的に放出されていることが示唆された。5-FU 投与群では全ての Ago2-miRNA と EV-miRNA が 5FU 投与後に指数関数的に増加しており、細胞死に伴う放出であることが示唆された。

大腸癌肝転移病変に発現する miRNA の同定

大腸癌原発部位、正常結腸粘膜、肝転移病変、正常肝臓組織の凍結標本を用いて miRNA の発現状況を評価した。原発部位と肝転移部位に共通して、miR-21-5p は最も発現が高く、miR-200c の発現は比較的高く、miR-31 は発現を認めなかった。

循環 Ago2-miRNA の検出法の開発

循環 Ago2-miRNA を検出するために少量の血漿から Ago2-miRNA を検出する方法の開発に取り組んだ。血漿中には抗体やタンパク質が大量に存在し、これが免疫沈降の際にプロテイン A/G アガロースに非特異的に結合することで Ago2 抗体との結合が阻害される。そこで免疫沈降の前に血漿をアガロースとインキュベートして非特異的抗体や蛋白質を除去しておくプレクリアステップを行った (Preclear 法)。健常人血漿中の Ago2-miRNA/EV-miRNA 発現量を miRNA PCR アレイを用いて網羅的に解析した結果 miR-451 が最も多く発現している Ago2-miRNA であり、かつ EV-miRNA としては検出されなかった。そこで健常人血漿中の Ago2-miR-451 を測定して Preclear 法の評価を行った。preclear 法を用いない場合、Ago2-miR-451 の大部分は免疫沈降の残渣内に認められたが、preclear 法では血漿 10~60 μ l までは Ago2-miR-451 の大部分が免疫沈降によって回収可能であり、回収量とサンプル容量は直線的に増加し強い相関を示した ($r^2=0.903$)。以上より Ago2-miRNA を回収するための血漿量は 30 μ l が適切であり、かつ Ago2-miR-451 を血漿 Ago2 の内部コントロールとして各サンプルにおける Ago2-miRNA の Δ CT 値から Ago2-miR-451 の Δ CT 値を差し引いた Δ CT (miR-451) で各サンプル間の発現量を比較することとした。

血漿 Ago2-miRNA を用いた CRC 患者の腫瘍スクリーニング

CRC 患者 40 人と、治癒切除後に再発を認めなかった対照群 20 人から得られた血漿を用いて Ago2-miR-21/200c の発現量を比較した。標準化コントロールである Ago2-miR-451 の Ct 値が 40 以上だった 1 名は分析から除外した。Ago2-miR-451 の発現量は CRC 患者群とコントロール群で差を認めなかったが、Ago2-miR-21/200c は CRC 群がコントロール群より有意に発現量が増加していた。各群の平均を元に Ago2-miR21/200c の正常上限カットオフ値を設定した。次に根治的切除を受けた患者 11 人の術前後の血漿サンプルを比較したところ、Ago2-miR-21/200c いずれもが手術後には有意に発現低下していた。

全身化学療法中の CRC 患者血漿中の Ago2-miRNA 変動

最後に化学療法を受けた 4 人の肝転移を有する CRC 患者から経時的に採取した血漿試料中の Ago2-miR-21/200c について検討した。

切除不能肝転移を有する大腸癌患者にベバシツマブ+FOLF0X6 を投与して一時的な腫瘍縮小が得られたケースでは、化学療法が奏功している腫瘍縮小期に Ago2-miR-200c 発現が増加を続け、縮小維持期ではカットオフ値を上回っていた。5 コース目以降は発現が減少に転じて化学療法レジメンが不応となったことが示唆され、腫瘍増殖期ではカットオフ値を常に下回るようになり死滅する癌細胞がなくなっていることが示唆された。

術後補助化学療法早期に肝転移再発を認めた症例では、補助療法 2 コース目で Ago2-miRNA 発現が早くもカットオフ値以下に転じており、直後に顕在化した肝転移によりレジメンが変更された後の維持期では CEA の変動に反比例して Ago2-miRNA 発現量が増減していた。

化学療法に有効な反応を示すことなく不応となったケースでは、Ago2-miR-200c は治療初期のみ一過性に増加したが、その後はカットオフ値を上回ることなくレジメンが無効であることを示唆していた。一方で Ago2-miR-21 発現量はカットオフを超えており viable な癌細胞による能動輸出を反映している可能性が示唆された。

同時性肝転移に対し原発巣切除後に行った化学療法が著効したケースでも、化学療法の初期のみで Ago2-miR-21 はカットオフ値を超えており、レジメンの有効性は一時的であることが示唆された。

【考察】

この研究では、循環 miRNA 特に Ago2 複合体と結合した miRNA を CRC 患者のスクリーニングと治療反応のモニタリングのためのバイオマーカーとして検証した。

最初に大腸がん細胞株の培養液を用いて 2 種類の形態の細胞外 miRNA を調べた。EVs に内包される miRNA は Ago2-miR-21 よりも微量であり、また能動的な EV-miR-31/200c の放出は認められなかった。一方で Ago2-miRNA は 5-FU 投与後の細胞死の過程において、細胞崩壊だけでなく薬剤応答としての能動的放出も併せて、培養液中に大量に放出されることが示された。当初の予想に反して Ago2-miR-21 は能動的放出も行われることが示され、過去の研究で大腸癌患者の血漿中 miR-21 発現が増加していたとされる報告に合致する結果であった。化学療法の腫瘍応答を評価するさらなる候補として原発巣および肝転移巣の両方で高度に発現され、主に細胞溶解によって放出される Ago2-miR-200c を選択した。すなわち Ago2-miR-21 は原発および転移部位の両方で高度に発現され、能動的放出と受動的放出が行われているのに対して、Ago2-miR-200c は原発よりも転移部位に発現が高く主に細胞溶解により放出されていた。

我々は少量の血漿から Ago2-miRNA を測定する新しい手法として、RNA 結合タンパク質の免疫沈降においてバックグラウンドノイズ低減に使用されるプレクリア法を利用した。従来の循環 miRNA 検出には 80~400 μ l の血漿または血清を必要とするが、本法により少量の血漿から Ago2-miRNA を効果的に回収することができるようになった。また miR-451 が Ago2 複合体と結合して血漿中で安定して発現する miRNA であることも示されたことから、循環 miRNA 発現を正規化する方法として Ago2-miR-451 を Ago2-miRNA の内部対照として選択した。

この方法を用いて、治療前の CRC 患者から得られた血漿と、化学療法を受けた 4 人の CRC 患者

から得られた経時的な血漿サンプルを用いて Ago2-miRNA を測定した。その結果能動的に放出される Ago2-miR-21 により CRC 患者をスクリーニングすることができ、化学療法中は細胞溶解に伴って受動的に放出される Ago2-miRNA が多く、かつ受動的放出は治療不応性に従いプラトーに達し、減少することが示された。

細胞傷害薬は可能な限り多くの癌細胞を死滅させることによって臨床的利益が得られることから、ほとんどの全身化学療法は許容しうる最大用量で投与される。しかしながら近年、化学療法初期の腫瘍制御に引き続く小量の薬物用量が腫瘍進行を効果的に阻止できることが実証されている。興味深いことに、我々の結果は効果的な化学療法であっても細胞死に起因する Ago2-miRNA 増加は初期の数サイクルのみであり、腫瘍制御後には過量投与となっている可能性を示唆している。このように Ago2-miRNA のモニタリングは有害事象が出現する前に化学療法の用量を減少させ維持療法への切り替え決定の判断を可能にする。

【結論】

循環 Ago2-miRNA の興味深い特徴を立証した。細胞外 Ago2-miRNA は少なくとも 2 つの機序、すなわち細胞死による受動的放出と生細胞からの能動的放出から生じていた。我々は細胞死により放出される Ago2-miRNA が、全身化学療法における腫瘍病勢のモニタリングに利用できる可能性を実証した。Ago2-miRNA の能動的輸送を直接的に実証することはできなかったが、この複合体は補助化学療法中の再発を早期にスクリーニングできる有益なバイオマーカーである可能性がある。