

血漿中 miR-92a の発現は大腸癌の有無に關与する

松 土 尊 映¹⁾ 田 中 正 視²⁾ 須 藤 カツ子³⁾
 土 田 明 彦¹⁾ 和 田 建 彦¹⁾ 久 田 将 之¹⁾
 黒 田 雅 彦²⁾ 大 屋 敷 一 馬⁴⁾ 大 屋 敷 純 子⁵⁾
 青 木 達 哉¹⁾

¹⁾東京医科大学外科学第三講座

²⁾東京医科大学分子病理学講座

³⁾東京医科大学動物実験センター

⁴⁾東京医科大学内科学第一講座

⁵⁾東京医科大学医学総合研究所

【要旨】 癌の治療において早期癌の根治治療が可能になった今日、特に早期に癌を診断することや治療の選択を既定する予後因子の測定の重要性が再認識されており、より鋭敏なマーカーの発見が望まれている。また、近年 non-coding RNA の一種である microRNA (miRNA) が血漿中に存在し、患者への負担が少なく、高感度な診断マーカーとして注目されている。そこで、我々はこの血漿中の分泌型 miRNA に着目し、マイクロアレイを用いて大腸癌患者における血漿 miRNA のプロファイリングを行い、変化を示す microRNA の同定を試みた。その結果、miR-486-5p、miR-1225-5p、miR-92a、miR-630 が顕著に変化を示していた。これらの中で、miR-92a が「miR-17-92 cluster」と呼ばれ、癌発生に関わる重要な領域より転写されることに着目し、Real-Time PCR を用いて追加解析を行った結果、血漿中の miR-92a は大腸癌患者において有意に減少していることがわかった。また、この結果が癌組織に由来するかどうかを調べるため、大腸癌組織をマウスに移植し生育させたところ、マウス血漿中の miR-92a の発現が有意に減少することが確認された。

以上の結果より、血漿中 miR-92a は大腸癌組織の有無を検出する有意義なマーカーであることが示された。

はじめに

食生活の欧米化に伴い、日本でも欧米諸国と同じく大腸癌が増加傾向にあり、日本で2番目に多い癌となっている。大腸癌は他の臓器の癌に比べて比較的緩徐に転移・進展する傾向があり、早期発見、早期手術によって完治する確率が高いと報告されている。現在、大腸癌においては CEA や CA19-9 といっ

た腫瘍マーカーが用いられるが、それらを早期診断に用いるには、感度が低く、より鋭敏なマーカーの発見が望まれている。

microRNA (以下、miRNA あるいは miR) は、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA であり、他のタンパクをコードする遺伝子の発現を調節する機能を持つ。現在、既に多種の miRNA が同定されデータベースに登録されている

平成 23 年 2 月 14 日受付、平成 23 年 3 月 1 日受理

キーワード: microRNA、miR-92a、血漿中 microRNA、大腸癌

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第三講座 松土 尊映)

TEL: 03-3342-6111 (内線 5080) FAX: 03-3340-4575

が、それぞれの miRNA は、相補的な塩基配列を持つ標的 mRNA に特異的に作用し、その mRNA の分解または翻訳阻害という 2 様式で機能する¹⁾。近年の研究結果では、特定の miRNA の発現が変化することで癌が進行することや²⁾、癌の分類や予後予測において有効に機能することが報告されている³⁾。中でも染色体 13q.31-3 に位置する miR-17-92 cluster と呼ばれる領域は 6 つの microRNA、miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1、miR-92a-1 によって構成され、この領域の欠損マウスは肺の形成不全⁴⁾や B 細胞の分化異常⁵⁾で生後すぐに死ぬことが知られている。またこの領域の発現上昇は、肺癌⁶⁾、B 細胞リンパ腫⁷⁾、慢性骨髄性白血病⁸⁾、骨芽腫⁹⁾、大腸癌¹⁰⁾、肝癌¹¹⁾ など種々多様な癌の進行において重要であることが報告されており、癌マーカーとしての有用性が考えられる。

一方、血清中には RNase が存在することから、血中に入った RNA は短時間で分解されることが知られている。したがって血清中に miRNA が存在することもありえないと考えられてきた。このような中、まず 2 つの研究グループが胎盤由来の miRNA の存在を母胎の血漿中で確認した¹²⁾¹³⁾。つづいて Mitchell らが、血清中に存在する miRNA を網羅的に解析し¹³⁾、さらに、我々の研究グループも血液中から miRNA が検出できることを見だし、白血病患者や肝癌患者血清中の疾患特異的な miRNA の検出に成功した¹⁴⁾。これらの結果は、血液中に存在する分泌型 miRNA の検出が、高感度な診断マーカーとして有用であることを示すものである。

このような背景から、本研究では大腸癌患者における高感度な診断マーカーを探索する目的で、血漿中の miRNA のプロファイリングを試みた。また、この結果を検証するために、大腸癌組織をマウスに移植し、マウス血漿中の miR-92a の発現の変化を検討した。

研究材料および方法

検体収集

すべての検体は、インフォームドコンセントのもとで東京医科大学病院において集められたものであり、ヘルシンキ宣言に則った東京医科大学医学倫理審査委員会の承認を得て行われた(承認番号: 987)。American Joint Committee on Cancer (AJCC) 規定の分類による臨床情報の詳細は Table 1 に記載した。東京医科大学病院にて大腸癌と診断された 20 例の患者と 22 人の健常者のボランティアから採血し、血漿分離を行い解析に用いた。

血漿回収、RNA 抽出

末梢血は、1600×g で 15 分間遠心されたのち上清を血漿として使用した。RNA 抽出には Isogen-LS (ニッポンジーン) を製品プロトコルに従って、250 μl の血漿に対し Isogen-LS を 750 μl 使用した。

microRNA マイクロアレイ

RNA は Agilent 社の Human microRNA Microarray Kit の製品プロトコル (ver. 1.5) に従って行われ、検出、画像解析は Agilent 社の DNA Microarray Scanner、Feature Extraction Software v9.2 をそれぞれ用いた。

Table 1 Characteristics of colon cancer patients

	Mean±SD or n (%)
Age	69.7±9.38
Sex	
male	14 (70%)
female	6 (30%)
AJCC classification	
Stage I	6 (30%)
Stage II	6 (30%)
Stage III	3 (15%)
Stage IV	5 (25%)
Total	21 (100%)

定量 RT-PCR

逆転写反応では TaqMan[®] MicroRNA microRNA RT Kit (Applied Biosystems) と microRNA specific stem-loop primer を用い (miR-92; 4374013, miR-638; 4380986, miR-16; 4373121, Applied Biosystems)、定量 PCR では、TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystems) と TaqMan[®] Universal Master Mix, No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems) を、それぞれ製品プロトコルに従って行った。解析装置には Mx3005P[™] QPCR System (STRATAGENE) を用い、Ct 決定の為の基準線と閾値の解析には MxPro-Mx3005P version 3.00 (STRATAGENE) の automatic Ct setting を用いた。統計検定に t-検定を用い、有意差水準は 5% とした。ヒト血清検体のデータの標準化においては、miR-638 を用いた。マウスの血清検体のデータの標準化においては、miR-16 を使用した。

動物実験

本研究における全ての動物実験は「東京医科大学動物実験規定 (2007年)」を遵守し、博愛の精神に基づき実験を行った (東京医科大学動物実験委員会承認: S-22-018)。東京医科大学病院にて切除された6例の大腸癌手術摘出材料をペニシリン、ストレプトマイシン存在下の PBS で洗浄後、8週齢、雄、Rag2^{-/-}/B6 マウスの背部皮下に移植した。移植においては、2 mm 角の腫瘍片を数個移植し、後に長径 1.0 cm の腫瘍を得た。この動物をエーテル麻酔後に心臓採血を行い、血漿を分離し、その後の解析に使用した。

結 果

血漿サンプルを用いたマイクロアレイ実験により、microRNA 約 1,000 個中の 100-150 個程度が検出された (Fig. 1)。また、血漿中の microRNA の順位は安定した指標であるとの過去の報告より¹⁵⁾ データを解析した結果、miR-486-5p, miR-1225-5p, miR-92a, miR-630 が顕著に変化を示していた (Fig. 2)。

さらに、この中でも、我々は miR17-92 cluster に存在する miR-92a に着目し詳細解析を行った。具体的には、大腸癌患者 20 例 (Table 1) における miR-92a の発現を TaqMan qRT-PCR 法を用いて解析した。その際、血清中で恒常的に高発現している miR-638 を用いてデータの標準化を行なった¹³⁾。その結果、健常者 22 例と比較検討したところ、AJCC

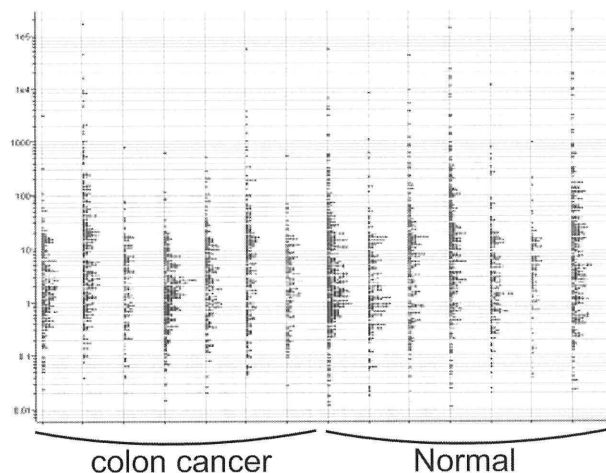


Fig. 1 Expression profiling of miRNAs in plasmas of patients with colorectal cancer
x-axis: samples, y-axis: signal intensity of the microarray. Seven samples from the left side are colorectal cancer patients of plasma and 7 samples from the right side are normal ones. One hundred fifty microRNAs were detected as histograms in each sample.

病期分類における stage II、stage III において miR-92a の有意差な減少が見られた (それぞれ、 $p=0.015, 0.0012$) (Fig. 3)。

以上の結果は、大腸癌の発生が、直接的に miR-92a の発現の減少を引き起こしている可能性を示すものであるが、さらにマウスに大腸癌組織を移植することでの血清 miR-92a の発現検討を行った。今回は、ヒト大腸癌手術検体から腫瘍片を採取し、T細胞及びB細胞を欠如した Rag2^{-/-}/B6 マウスに移植した。移植後一ヶ月後、腫瘍が生着した後に、血清 miR-92a の発現を TaqMan qRT-PCR 法を用いて確認した。データの標準化には miR-16 を用い、その結果血清 miR-92a の有意な減少が確認された ($p=0.043$) (Fig. 4)。以上の結果は、大腸癌による、直接的な miR-92a の減少を示すことが示唆された。

考 察

本研究において、血漿中の miRNA が約 100 種類ほど検出され (Fig. 1)、過去の報告とある程度一致した結果であった¹⁵⁾。しかし、我々の結果では miR-638 などが高い発現を示していたのに対し、他の報告ではそれらが検出されなかったことなど、各 miRNA の存在量に関してはいくつかの報告とは一致していないものもあった¹⁴⁾。また、我々の実験時から現在までも新規の miRNA の発見がなされているなど、実験上のプラットフォームに依存した検

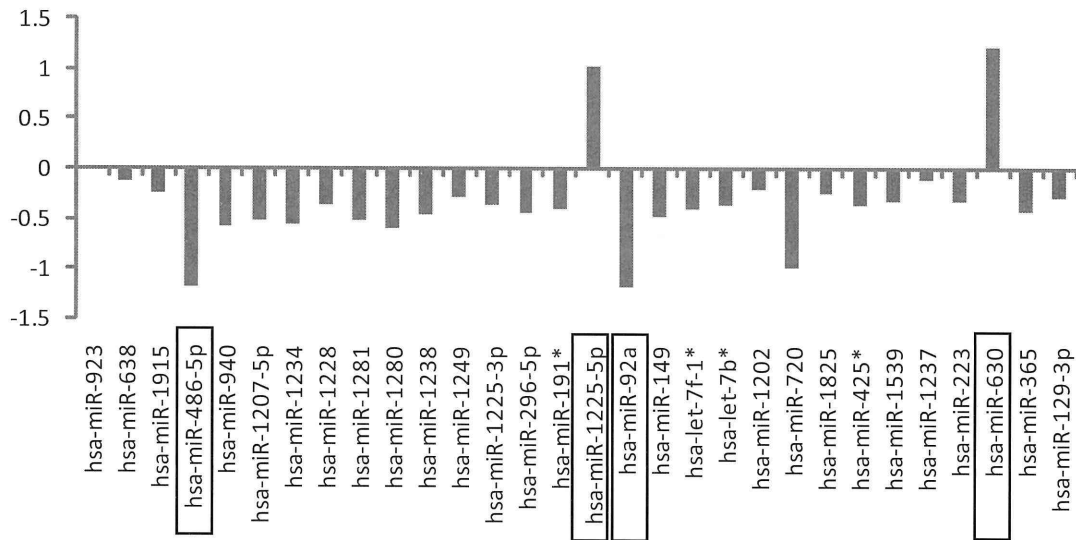


Fig. 2 Comparison of signal intensity ranks various miRNAs in plasmas of patients with colorectal cancer by microarray analysis. Y-axis indicate the mean ratio of the signal intensity rank of colorectal cancer to the normal rank of each microRNA. It reveals that the value of minus numbers in the graph are the decreasing miRNAs in plasmas, on the other hand, the value of plus numbers indicate increasing miRNAs. Sequentially from the left, the 30 miRNAs showed a high ratio of the signal intensity rank of normal plasmas. The miRNAs which were enclosed in the box showed dramatical changed. (absolute-value>1.0)

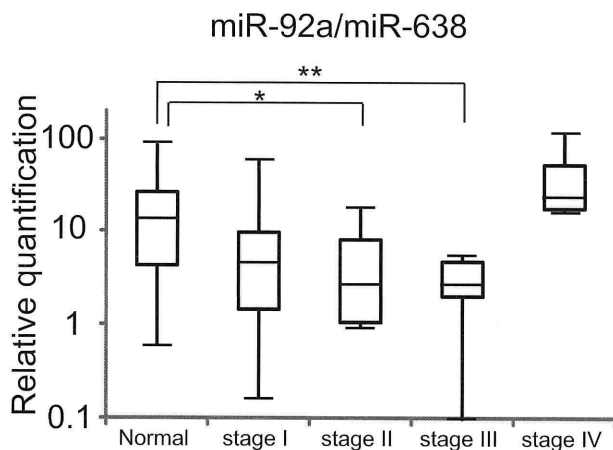


Fig. 3 Comparison of the ratio of miR-92a signal intensity to miR-638 signal intensity in plasmas of normal or colorectal cancers of various stages. The Y-axis represents the mean ratio of the signal intensity for miR-92a/miR-638 expression. We used miR-638 for the normalized signal intensity in each sample. The X-axis represented the stage for colorectal cancers according to ACJJ classification. (Normal : n=22, stage 1 : n=6, stage 2 : n=6, stage 3 : n=3, and stage 4 : n=5) Error bars represent s.d. *p-value < 0.05, **p-value < 0.01

出結果の限界などが考えられる。

今回、大腸癌患者において miR-92a の減少が確認されたが、なぜ癌患者の血清中において、特異的に miR-92a の発現が減少するのか、そのメカニズ

ムは不明である。この現象は、血液中に存在する miRNA の発現制御機構を考察するうえで非常に興味深い。すなわち、この現象の理由として 2 つの可能性が考えられる。1 つは大腸癌細胞から miR-92 の分解を促進する分子が分泌されている可能性であり、もう一つは癌細胞が血液中の miR-92 を選択的に取り込んでいる可能性である。しかし、いずれの場合も、現時点では仮説の域をでないため、今後の詳細な検討が重要になってくる。また、Fig. 2,3 に見られるように、大腸癌において miR-92a の発現が有意に変化していたことは確かであったが、その変化が stage II や stage III でのみ有意差がみられたことは解釈が難しい。また、stage I でも有意差はないものの減少が見られ、今後の大規模解析により明確な結論が見出せると考える。

一方、stage IV では miR-92a の上昇が認められたが、この結果は、腫瘍の転移の有無による影響を受けたのではないと思われる。近年の研究から、血液中の miRNA は exosome と呼ばれる分泌型小胞に包まれた状態で RNase などの分解を受けずに体液中をめぐっていることが明らかになっている¹⁶⁾¹⁷⁾。Exosome は、細胞が分泌している直径 10~100 nm の膜小胞であるが、分泌する細胞の起源によって異なるものの、Exosome 中には 100 から 300 種類の蛋白質、100 種類前後の mRNA、そして 200 種類を超

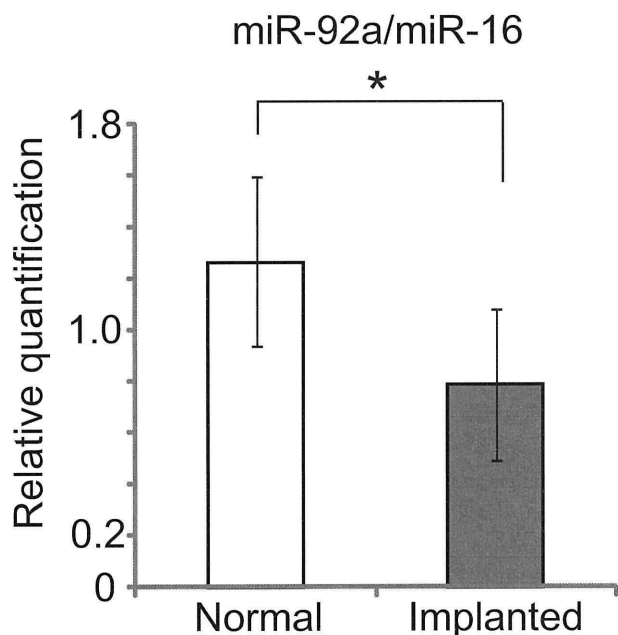


Fig. 4 Comparison of the ratio miR-92a signal intensity to miR-16 signal intensity by TaqMan qRT-PCR among the plasmas of mice bearing a human colorectal cancer and mice not bearing human colorectal cancers.

We used miR-16 to normalize the signal intensity in each sample. The Y-axis represented the mean ratio of the signal intensity for miR-92a/miR-16 expression in plasmas of normal mice ($n=4$) and the transplanted mice ($n=6$). Error bars represented s.d. * p -value <0.05

える miRNA が内包されている。興味深い事に、これらの exosome は circulating tumor cell において、より多く分泌されている可能性も示唆されており¹⁸⁾、今回の stage による miR-92a の発現の差も、転移能を獲得した癌細胞の有無を反映している可能性も考えられ、今後のより詳細な検討が必要である。

動物実験の結果からは、大腸癌組織による血漿 miR-92a への影響を検証したものであり、予想されるように血漿中の miR-92a の存在量は、大腸癌組織の移植によって減少することが確認された (Fig. 4)。この結果は、大腸癌による直接的な miR-92a の減少を示すものであるが、今後は、腫瘍免疫に対する miR-92a の影響なども考慮し、検討していく必要がある。

今回着目した miR-92a は、miR-17-92 cluster に存在し、多くの癌において非常に重要な役割を持っていると考えられているが、この microRNA は細胞周期の調節因子である p63 を負に制御することで細胞増殖を促進することや⁵⁾、血管新生を制御することなどが知られている¹⁹⁾。また、肝癌や急性白血病な

どの癌細胞や癌組織中で非常に高い発現を示していることも知られている²⁰⁾²¹⁾。今後、これら miR-92a の減少するメカニズムや臨床応用にむけての詳細な検討が重要になってくる。今回の血漿中の miR-92a の変化が、実際の癌組織や個体全体とどう関与するか、解明することにより生物学的な意義を含めた癌マーカーとしての有用性が高まると考えられる。

結 論

血漿中の miR-92a のレベルは大腸癌組織に影響を受け変化することが確認され、新たなバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

なお、本研究は、平成 20 年度～24 年度、文部科学省・私立大学戦略的基盤研究形成支援事業「分子情報に基づく難病研究拠点形成：エピジェネティックスを標的とした統合的がん克服のための研究拠点形成」による研究資金で行われた。

文 献

- 1) Mattick JS, Makunin IV: Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 1**: R17-29, 2006
- 2) Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 259-269, 2006
- 3) Osada H, Takahashi T: MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **28**: 2-12, 2007
- 4) Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T: Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* **132**: 875-886, 2008
- 5) Manni I, Artuso S, Carecchia S, Rizzo MG, Baserga R, Piaggio G, Sacchi A: The microRNA miR-92 increases proliferation of myeloid cells and by targeting p63 modulates the abundance of its isoforms. *FASEB J* **23**: 3957-3966, 2009
- 6) Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T: A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* **65**: 9628-9632, 2005
- 7) He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**: 828-833, 2005
- 8) Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, Ganser A, Eder M,

- Scherr M : Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* **109** : 4399-4405, 2007
- 9) Uziel T, Karginov FV, Xie S, Parker JS, Wang YD, Gajjar A, He L, Ellison D, Gilbertson RJ, Hannon G, Roussel MF : The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 2812-2817, 2009
- 10) Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B, Meijer GA : MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer* **101** : 707-714, 2009
- 11) Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, Rogler LE, Zavolan M, Tuschl T, Rogler CE : Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol* **173** : 856-864, 2008
- 12) Chim SS, Shing TK, Hung EC : Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* **54** : 482-490, 2008
- 13) Gilad S, Meiri E, Yogev Y : Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* **3** : e3148, 2008
- 14) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM : Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **105** : 10513-10518, 2008
- 15) Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M : Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* **4** : e5532, 2009
- 16) Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T : Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol* **3** : 478-481, 2010
- 17) Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T : Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* **5** : e13247, 2010
- 18) Friel AM, Corcoran C, Crown J, O'Driscoll L : Relevance of circulating tumor cells, extracellular nucleic acids, and exosomes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **123** : 613-625, 2010
- 19) Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S : MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* **324** : 1710-1713, 2009
- 20) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M : Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int* **60** : 351-357, 2010
- 21) Ohyashiki JH, Umezu T, Kobayashi C, Hamamura RS, Tanaka M, Kuroda M, Ohyashiki K : Impact on cell to plasma ratio of miR-92a in patients with acute leukemia : in vivo assessment of cell to plasma ratio of miR-92a. *BMC Res Notes* **3** : 347, 2010

Down-regulation of miR-92a in plasma correlated with colorectal cancer

Takaaki MATSUDO¹⁾, Masami TANAKA²⁾, Katsuko SUDO³⁾, Akihiko TSUCHIDA¹⁾,
Tatehiko WADA¹⁾, Masayuki HISADA¹⁾, Masahiko KURODA²⁾,
Kazuma OHYASHIKI⁴⁾, Junko OHYASHIKI⁵⁾, Tatsuya AOKI¹⁾

¹⁾Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

²⁾Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

³⁾Animal Research Center, Tokyo Medical University

⁴⁾First Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University

⁵⁾Institute of Medical Sciences, Tokyo Medical University

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) belong to a class of endogenously expressed non-coding small RNAs, which have an important function in regulating RNA stability and gene expression. The deregulation of microRNAs has been linked to cancer development and may constitute robust biomarkers for diagnosis and prognosis of cancer. Recently, we reported that serum contained sufficiently stable microRNA signatures and we demonstrated that levels of several miRNAs are dramatically altered in the plasma of cancer patients. Therefore, deviations in levels of particular miRNAs detected in the plasma of cancer patients could be a useful and non-invasive marker to detect cancer development. To identify the differentially expressed miRNAs in the plasmas of colon cancer patients, we screened colon cancer samples using microarrays. Our results revealed that cancer-related miRNAs such as miR-486-5p, miR-1225-5p, miR-92a, and miR-630 are differentially expressed in the plasmas of colon cancer patients. Furthermore, we confirmed that plasma miR-92a levels in colon cancer were extremely low, compared with healthy subjects, using a quantitative real time PCR analysis. In addition, we detected diminution of plasma miR-92a levels in colon cancer mouse models.

In conclusion, these results indicate that miR-92a levels in plasma could be a novel biomarker signature for the diagnosis of colon cancer.

〈Key words〉 : microRNA, miR-92a, microRNA in plasma, colorectal cancer
