

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

吉田 良仁

専攻分野：内科学

コース：消化器・肝臓内科

指導教授：伊東 文生

主論文の題目：

Detection of DNA Methylation of Gastric Juice-Derived Exosomes in Gastric Cancer

(胃癌における胃液由来エクソソームの DNA メチル化の検出)

共著者：

Hiroyuki Yamamoto, Ryo Morita, Ritsuko Oikawa, Yasumasa Matsuo, Tadateru Maehata, Katsuhiko Nosho, Yoshiyuki Watanabe, Hiroshi Yasuda, Fumio Itoh

緒言

胃癌は、癌部位別死因の第2位であり、侵襲性の低い胃癌の早期診断マーカーの開発は極めて重要な意義を有している。生検を必要とせず、かつ胃を面として捉える診断マーカーの開発が望まれる。

エクソソームは生体内のさまざまな細胞および癌細胞から分泌される40~100nmの分泌型膜小胞で、血液、尿、唾液、腹水などの体液に存在する。エクソソームが酸性環境でも安定していることに着目し、胃液からエクソソームを抽出し、エクソソーム機能分子のうちDNAを抽出できるか検討した。さらに、ゲノムワイドなDNAメチル化のマーカーであるLINE-1およびSOX17遺伝子のメチル化を解析した。

方法・対象

9種の胃癌細胞株および20症例の胃癌患者の胃液を対象とした。

胃癌細胞株培養上清および胃癌患者の胃液からのエキソソーム抽出は、ExoQuick-TC 試薬を用いて行った。

エキソソームの確認は、電子顕微鏡およびエキソソームマーカーである抗 CD9 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。また、カルネキシン(小胞体マーカー)、GM130(ゴルジ体マーカー)、アコニターゼ 2 (ミトコンドリアマーカー)抗体も用いて解析した。

エキソソームおよび胃癌のパラフィン切片からの DNA 抽出は、フェノール・クロロホルム法を用いた。

DNA メチル化解析は、DNA をバイサルファイト処理後、パイロシーケンスにより定量解析した。

胃癌のパラフィン切片からの RNA 抽出は、抽出キットを用いて行い、TaqMan リアルタイム PCR 法により、SOX17 遺伝子発現を解析した。

統計はスピアマン検定を用いた。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会（承認 2470 号（遺 118））の承認を得たものである。

結果

胃癌細胞株培養上清から抽出した小胞をウェスタンブロットにより解析し、CD9 発現を検出した。一方、セルライセートを用いた解析では、CD9 発現を検出しなかった。

胃液から抽出した小胞を電子顕微鏡で観察し、40~100nm の膜小胞を確認した。さらに、ウェスタンブロットにより CD9 発現を検出した。

胃癌細胞株培養上清から抽出したエキソソームより DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動解析したところ、10 キロベースペアを超える DNA を検出した。

胃癌細胞株培養上清由来エキソソームに関して、エキソソーム DNA と核 DNA を用いた LINE-1 および SOX17 遺伝子の DNA メチル化解析結果は、相関していた ($P < 0.05$)。

胃液由来エキソソームに関しても、エキソソーム DNA と核 DNA を用いた LINE-1 および SOX17 遺伝子の DNA メチル化解析結果は、相関していた ($P < 0.05$)。計 20 症例中 16 症例（早期胃癌 10 症例中 8 症例）で有意な SOX17 遺伝子 DNA メチル化を検出した。SOX17 遺伝子 DNA メチル化陽性症例の胃癌組織において、SOX17 mRNA 発現低下を認めた。

考察

胃癌細胞株培養上清からのエキソソーム抽出の報告はあるが、胃液からのエキソソーム抽出の報告は認めない。本研究では、ポリマーを用い

たエクソソーム抽出試薬を用いて、胃液からのエクソソーム抽出を試みた。まず、本試薬を用いて、胃癌細胞株培養上清からエクソソームが効率的に抽出できることをウェスタンブロットにより確認した。

胃液からエクソソームが抽出できているかの確認は、電子顕微鏡とウェスタンブロットにより行った。電子顕微鏡によって 40~100nm の膜小胞を確認した。また、抗 CD9 抗体を用いたウェスタンブロットにより、特異的バンドを検出した。以上により、胃液からの抽出物は、エクソソームであると考えられた。

次に、胃癌細胞株培養上清由来エクソソームから 10 キロベースペアを超える DNA を抽出できることを確認した。同 DNA を用いて、LINE-1 および SOX17 遺伝子の DNA メチル化の定量解析が可能であった。核 DNA のメチル化情報がエクソソーム DNA に反映されているか、両者の DNA メチル化解析結果を比較検討した。興味深いことに、核 DNA とエクソソーム DNA を対象とした DNA メチル化解析結果が相関していることを明らかにした。従って、メチル化 DNA が、エクソソーム内にパッケージングされていると考えられた。

同様に胃液から抽出したエクソソーム由来の DNA と同一症例の胃癌組織パラフィン切片から抽出した DNA を用いた LINE-1 および SOX17 遺伝子のメチル化解析結果が相関していることを明らかにした。早期胃癌 10 症例中 8 症例という高い感度で有意な DNA メチル化を検出したことから、胃液エクソソームを用いた SOX17 遺伝子 DNA メチル化解析は、早期胃癌の有望なマーカーとなりうると思われた。

結論

胃癌患者の胃液からエクソソームを抽出し、SOX17 遺伝子 DNA メチル化を早期癌患者で高率に検出することができた。