

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

辻 顕介

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：

胃癌由来の胃液エクソソームの機能分子の解析

共著者：

山本 博幸、末永 大介、森田 亮、吉田 良仁、安田 宏、

大坪 毅人、伊東 文生

緒言

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の膜小胞で、血液、尿、唾液、腹水などの体液に存在する。胃液からエクソソームを抽出し、含有されるmicroRNA(miRNA)やDNAなどの機能分子の胃癌に伴う変化を明らかにできれば、胃液採取による胃癌早期診断や胃発癌リスク診断マーカーの開発につながる可能性がある。

一方、病原タンパク質CagAを持つ*H. pylori* (CagA陽性*H. pylori*)に感染すると、胃癌を始めとする胃粘膜病変を発症することが分かっている。*H. pylori*感染胃癌患者の血液中に存在するエクソソームに*H. pylori*由来CagAが含まれることが報告されている。本研究では、超遠

心法を用いて胃癌患者の胃液からエクソソームを抽出し、その機能分子 (miRNA および DNA メチル化) の異常を明らかにすることを目的とした。

方法・対象

10 症例の胃癌患者、5 症例の *H. pylori* 感染陰性の健常ボランティアからの胃液の採取を行い、胃液検体から超遠心法を用いて、エクソソームを抽出した。透過型電子顕微鏡およびエクソソームマーカである CD9 に対する抗体を用いたウェスタンブロットによりエクソソームの確認を行った。エクソソームからの RNA および DNA を抽出した。RNA を用いて、リアルタイム PCR 法により、miR-34b および miR-34c の発現を解析し、DNA を用いてバイサルファイト処理後、パイロシーケンスにより miR34b/c 遺伝子の DNA メチル化を定量解析した。また、エクソソームを抽出した胃癌患者の治療後のホルマリン固定パラフィン包埋組織から DNA を抽出し、miR34b/c 遺伝子の DNA メチル化を定量解析した。

また、*H. pylori* CagA に対する抗体を用いたウェスタンブロットによりエクソソーム内に CagA が含有されるか胃癌患者 (*H. pylori* 現感染)、健常ボランティア (*H. pylori* 未感染) 各 3 症例で解析した。

統計学的処理は 2 群間の測定値の比較に Mann-Whitney 法を、2 群間の相関はスピアマン順位相関係数検定を用いた。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り、患者からの書面での同意を得た後、胃液を採取した。

結果

胃癌患者および健常ボランティアの胃液から超遠心法を用いて膜小胞を抽出し、透過型電子顕微鏡とウェスタンブロットにより、エクソソ

ームが抽出できたことを確認した。リアルタイム PCR 法により、miR-34b および miR-34c 発現は、胃癌患者において、コントロールに比べ有意に低値であった。パイロシーケンスにより、miR-34 b/c の DNA メチル化は、胃癌患者において、コントロールに比べ有意に高値であった。胃液から抽出した DNA を用いた miR34b/c メチル化解析結果と同一症例の胃癌組織パラフィン切片から抽出した DNA を用いたメチル化解析結果は、胃液から抽出した DNA のものと相関していた。*H. pylori* CagA に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより、*H. pylori* 陽性 3 症例において、エクソソーム中に CagA を検出し、一方、*H. pylori* 陰性 3 症例においては、検出しなかった。

考察

胃癌における miR-34 発現の低下の一因として、DNA メチル化が報告されている。エクソソーム機能分子として、DNA も注目されている。従って、次にエクソソーム由来の DNA (exoDNA) をバイサルファイト処理し、パイロシーケンスによる DNA メチル化解析を行った。miR-34b/c の DNA メチル化は、胃癌患者において、コントロールに比べ有意に高値であった。次に、核 DNA のメチル化情報が exoDNA 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。胃液から抽出した exoDNA を用いたメチル化解析結果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、胃液由来 exoDNA を用いたメチル化解析は、胃癌の有望なマーカーとなりうると考えられた。

また、CagA に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより、*H.*

*pylori*陽性症例においてのみ、エクソソーム内にCagAを検出した。CagAが生物活性を保持したままエクソソームから細胞内へ運ばれ機能発現しているとの報告もあり、今後、胃液エクソソーム機能分子の解析は、*H. pylori*感染を含めた胃癌の診療において有用であると示唆された。