

腎ラブドイド腫瘍における Exosomal miR-214-3p の
新規バイオマーカーとしての可能性

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

山岡 敏

修了年 2022 年

指導教員 越永從道

腎ラブドイド腫瘍における Exosomal miR-214-3p の
新規バイオマーカーとしての可能性

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

山岡 敏

修了年 2022 年

指導教員 越永從道

目次

概要	1
緒言	5
目的	8
対象と方法	9
結果	15
考察	17
まとめ	21
謝辞	22
表	23
図	24
図説	26
引用文献	28
研究業績	39

<概要>

はじめに

小児腎腫瘍のうち、稀で極めて予後不良なものとして、腎ラブドイド腫瘍が挙げられる。腎ラブドイド腫瘍を含む小児腎腫瘍には特異的なバイオマーカーが存在しないため、それぞれの鑑別や、副腎を好発部位とする神経芽腫との鑑別は困難である。診断には組織学的検査が必要であるが、腫瘍生検は手技中の腫瘍散布のリスクのため極力避けられる。腫瘍生検を避けた上での初期診断や再発の早期発見により、適切な治療を行うことにより予後を改善させるため、腎ラブドイド腫瘍の新たなバイオマーカーが強く求められている。

Exosome はほとんどの細胞で分泌され、血液や尿などの体液中に観察される細胞外小胞であり、新たなバイオマーカーとして注目を集めている。また、exosome に内包される miRNA (exosomal miRNA)の発現様式には exosome を放出した細胞の状態が反映されると言われ、低侵襲かつ簡便に測定できることから、悪性腫瘍の新たなバイオマーカーとして大きな可能性を持つ。しかし、腎ラブドイド腫瘍に関わる exosomal miRNA についての報告はない。

目的

本研究では、細胞株を用いて腎ラブドイド腫瘍特異的 exosomal miRNA の候補を同定し、さらに、候補 exosomal miRNA が腎ラブドイド腫瘍モデルマウスの血清から検出可能かを検討することにより、候補 exosomal miRNA の腎ラブドイド

腫瘍のバイオマーカーとしての可能性を評価することを目的とした。

対象と方法

ヒト腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401)およびコントロールのヒト正常胎児腎由来細胞株(HEK293T)の培養上清から exosomal RNA を抽出し、次世代シーケンシングによる miRNA の網羅的発現解析を行い、腎ラブドイド腫瘍特異的な exosomal miRNA の候補を絞り込んだ。次に、候補 exosomal miRNA について qRT-PCR を行い、ヒト神経芽腫細胞株(Kelly, SH-SY5Y)も含めた細胞株間での発現を比較検討した。さらに、腎ラブドイド腫瘍モデルマウスを作成し、その血清中の候補 exosomal miRNA の発現を qRT-PCR によって解析した。

結果

次世代シーケンシングの結果、腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401)において、HEK293T と比較して高発現であった 10 個の miRNA のうち、WT-CLS1, G401 でともに最も高発現であった miR-214-3p を腎ラブドイド腫瘍特異的 exosomal miRNA の候補とした。qRT-PCR によって各種細胞株培養上清中の exosomal miR-214-3p の発現を比較したところ、腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401)において、HEK293T, 神経芽腫細胞株(Kelly, SH-SY5Y)と比較し、培養上清中の exosomal miR-214-3p が有意に高発現であった。さらに、腎ラブドイド腫瘍モデルマウスを作成し、血清中の exosomal miR-214-3p の発現を qRT-PCR

によってコントロールマウスと比較した。その結果、腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中の exosomal miR-214-3p が有意に高発現であった。

考察

本研究により, exosomal miR-214-3p が腎ラブドイド腫瘍の新規バイオマーカーとして可能性を持つことが示唆された。

腎ラブドイド腫瘍患者では高頻度に転移や再発を来し, 予後は極めて不良である。血清中の Exosomal miR-214-3p を腎ラブドイド腫瘍の新規バイオマーカーとして用いることで, 低侵襲かつ簡便な初期診断や再発の早期発見が可能となり, 適切な治療法の選択による予後の改善に繋がる。

miR-214-3p は筋や神経の発生に関与すると報告されている。腎ラブドイド腫瘍の起源は不詳であるが, 悪性ラブドイド腫瘍が筋もしくは神経を起源とするという報告がある。これらのことより, 腎ラブドイド腫瘍において miR-214-3p が高発現であることは矛盾しない結果であるといえる。

また, miR-214-3p は, 他の腫瘍において, がん促進因子として働く場合と, がん抑制因子として働く場合の双方が報告されている。miR-214-3p の腎ラブドイド腫瘍における機能は現在当研究室で検討中である。

miR-214-3p は肝細胞癌や乳癌などの悪性腫瘍の新たなバイオマーカーとしての可能性が報告されている。臨床応用には課題が残るが, miR-214-3p は腎ラブドイド腫瘍を含む様々な悪性腫瘍のバイオマーカーとして有用となりうる。

本研究の limitation として、他の小児腎腫瘍との **exosomal miR-214-3p** の発現量比較が行えていないことや、患者の血清サンプルを用いた発現解析が行えていないことが挙げられ、感度や特異度を考慮した適切なカットオフ値の検討を含め、臨床応用へ向けた課題となる。

結語

本研究により、**exosomal miR-214-3p** が腎ラブドイド腫瘍細胞株において有意に高発現であり、さらに腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中においても有意に高発現であることが示された。これらの結果により、**exosomal miR-214-3p** が腎ラブドイド腫瘍の新規バイオマーカーとしての可能性を持つことが示唆された。臨床応用に向けて、患者血清サンプルを用いたさらなる検討が必要である。

<緒言>

小児腎腫瘍

小児腎腫瘍は小児悪性腫瘍の約 7%を占める(1). 最も頻度が高いのは腎芽腫であり, 小児腎腫瘍の約 90%を占め(2), その全生存率は 90%(1)と予後良好である. その他の稀な腫瘍として腎明細胞肉腫, 腎ラブドイド腫瘍, 腎細胞癌, 先天性間葉芽腎腫などが存在する. 小児腎腫瘍にはバイオマーカーが存在せず, それぞれの鑑別は困難である. また, 特異的な画像所見もないため, 副腎に好発する小児悪性固形腫瘍である神経芽腫との鑑別が困難であることがある(3). 小児腎腫瘍では原則, 初期治療として腫瘍の一次的切除を行うが, 転移症例や切除困難症例には術前化学療法を行う(4). 組織型により化学療法の強度が異なるため, 適切な治療の選択には治療開始前の鑑別診断が必要となる. バイオマーカーが存在しないため, 診断には組織学的検査が必要だが, 腫瘍生検は手技中の腫瘍散布のリスクのため極力避けられる.

腎ラブドイド腫瘍

腎ラブドイド腫瘍は *hSNF5/INI1* 遺伝子の変異を特徴とし(5), 小児腎腫瘍の約 2%を占める稀な疾患である(6). 稀な小児腎腫瘍のうち, 腎ラブドイド腫瘍は特に進行が早く, 診断から再発までの期間の中央値は 8 ヶ月, 5 年生存率は 26%(7)と極めて予後不良である. 24-29%の患者において診断時に転移を来しており(7, 8), 肺に最も転移しやすく, 肝や骨, 脳へも転移しうる(9). 腎ラブドイド腫瘍に

は有効な治療法が確立されておらず、腎芽腫などと比較し、より強力な化学療法が必要とされる。初診時には肉眼的もしくは顕微鏡的血尿、発熱などが出現することが多く(9)、高カルシウム血症を認めることがある(10, 11)が、特異的な症状やバイオマーカーは存在しない。腫瘍生検によるリスクを避けた上での正確な初期診断による適切な治療法の選択や、再発や転移のモニタリング、早期発見によって予後を改善させるため、腎ラブドイド腫瘍の特異的なバイオマーカーが強く求められている。

Exosome

Exosomeはほとんどの細胞で分泌される直径30-200nmの細胞外小胞であり(12)、悪性腫瘍のバイオマーカーとして注目されている。Exosomeは血清や血漿、尿、精液といった体液から低侵襲に検出することができる(13)。Exosome中にはmicroRNA(miRNA)を含むRNAが存在し、それらの発現様式には、exosomeを放出した細胞の状態が反映される(14)。

microRNA

miRNAは18-25塩基長の1本鎖非コードRNAであり、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する(15)。体液中に存在するmiRNAはcirculating miRNAと呼ばれ、様々な悪性腫瘍において、診断や予後予測、再発や転移のモニタリングのためのバイオマーカーとして有用である可能性が報告されている

(16-18). Circulating miRNA のうち, Exosome に内包されて血中に存在する miRNA (exosomal miRNA)は RNase による分解を回避するため, より高い安定性を持つ

(19-22). 測定の簡便さやその安定性により, exosomal miRNA は悪性腫瘍の低侵襲な新規バイオマーカーとして大きな可能性を持つ. しかし, 腎ラブドイド腫瘍に関連する exosomal miRNA についての報告はない.

<目的>

本研究では、細胞株を用いて腎ラブドイド腫瘍特異的な **exosomal miRNA** を同定し、その候補 **exosomal miRNA** が腎ラブドイド腫瘍モデルマウスの血清から検出可能かを検討することにより、候補 **exosomal miRNA** の腎ラブドイド腫瘍のバイオマーカーとしての可能性を評価することを目的とした。

<対象と方法>

各種細胞株の培養

細胞株は、ヒト腎ラブドイド腫瘍細胞株 WT-CLS1, G401, ヒト正常胎児腎由来細胞株 HEK293T, およびヒト神経芽腫細胞株 Kelly, SH-SY5Y を使用した。かつて WT-CLS1 と G401 はともに腎芽腫が起源とされていたが、近年、組織学的および遺伝学的解析により腎ラブドイド腫瘍由来細胞株に再分類された(23, 24)。WT-CLS1 と G401 はそれぞれ Cell Lines Service (Eppelheim, Germany)と Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)から購入した。HEK293T は Invitrogen (Waltham, MA)から購入した。Kelly, SH-SY5Y はそれぞれ DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan), American Type Culture Collection(Manassas, VA)から購入した。WT-CLS1 は 10%ウシ胎児血清(Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan), 1% HEPES(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)含有の DMEM 培地(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)で培養し, G401 は 10%ウシ胎児血清含有の McCoy's 5A 培地 (Invitrogen)で培養した。HEK293T は 10%ウシ胎児血清含有の DMEM 培地で培養した。Kelly は 10%ウシ胎児血清含有の RPMI 1640 培地(Nacalai Tesque)で培養し, SH-SY5Y は 10%ウシ胎児血清, 0.1mM nonessential amino acids(Thermo Fisher Scientific), 5 mM sodium pyruvate(Thermo Fisher Scientific)含有の MEM 培地(Nacalai Tesque)で培養した。すべての培地は 100 IU/mL の penicillin(Nacalai Tesque)と 100 μ L/mL の streptomycin (Nacalai Tesque)を含有している。すべての細胞は 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。

培養上清, 血清からの Exosome の抽出

各種細胞株を 100 mm dish で培養し, 70-80 % confluent となった時点で, phosphate-buffered saline(PBS)で 2 回洗浄し, 培地を 5mL のウシ胎児血清不含有培地に交換した. 48 時間培養した後, 培養上清を回収し, 3,000 g で 15 分間遠心し, 0.22 μm フィルターで濾過して debris を除去した. debris を除去した培養上清に 2mL の ExoQuick-TC(System Biosciences, Palo Alto, CA)を加え, 4°Cで 1 晩静置し, 15,300 g で 30 分間遠心した. さらに 1,500 g で 5 分間遠心し, 上清を吸引して除去し, exosome の pellet を精製した.

血清を 3,000 g で 15 分間遠心して debris を除去し, 分離した血清 250 μL あたり 63 μL の ExoQuick (System Biosciences)を加え, 4°Cで 30 分間静置した. 1,500 g で 30 分間遠心し, 上清を破棄し, さらに 1,500 g で 5 分間遠心し, exosome の pellet を精製した.

透過型電子顕微鏡による形態観察

抽出した exosome の pellet を PBS 100 μL で懸濁したもののうち 3 μL を, collodion 支持膜を張った copper grids にマウントした. Grids を 4% uranium acetate で 10 秒間染色し, カーボン蒸着を行い, 透過型電子顕微鏡(JEMI1200EX; JEOL, Tokyo, Japan)にて加速電圧 80KV で観察した.

Western blotting による Exosome マーカーの検出

各種細胞とその培養上清から抽出した exosome を、それぞれ protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) 含有の radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Thermo Fisher Scientific)で溶解し、Bio-Rad DC kits (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて蛋白濃度を測定した。蛋白量を 10 µg / lane に調整し、NuPAGE 4%-12% Bis-Tris gels (Life Technologies)の各 lane にアプライして電気泳動し、polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Thermo Fisher Scientific)に wet 法で転写した。Blocking One (Nacalai Tesque)を用いて 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体は exosome マーカーとして rabbit anti-HSP70 antibody (System Biosciences), 小胞体膜を含む細胞内小器官の混入がないことを示すマーカーとして rabbit anti-Calnexin antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)をそれぞれ Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (GE Healthcare, Tokyo, Japan)で 1 : 1,000 の濃度に希釈し、4°Cで 1 晩反応させた。0.1 % Tween 20 含有 Tris-buffered saline (TBS-T)で洗浄し、2 次抗体は horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody to rabbit IgG (System Biosciences)を 1 : 2,000 で TBS-T にて希釈して室温で 1 時間反応させ、Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque)で化学発光させたのち Bioimage Analyser LAS-4000 Mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)で可視化した。

Total RNA の抽出

Exosome からの total RNA の抽出は、SeraMir Exosome RNA Amplification Kit

(System Biosciences)を用いて推奨プロトコールに則って行った. RNA の濃度は分光光度計 (NanoDrop ND-1000; Thermo Fisher Scientific)で測定した.

次世代シーケンシングによる miRNA の網羅的発現解析

腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401), コントロールとしての HEK293T から抽出した Exosomal total RNA を対象として次世代シーケンシングによる網羅的発現解析を行い, 細胞株間で miRNA の発現量を比較した. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), 分光光度計 (Nano Drop One; Thermo Fisher Scientific)を用いてサンプルのクオリティーチェックを行った後, 5ng の total RNA で, QIA seq™ miRNA Library Kit (QIAGEN, Hiden, Germany)を用いてシーケンシング用のライブラリー作成を行った. シーケンシングは HiSeq にて 75 bp single-end read mode で行った. FastQC によって FASTQ ファイルに記録された raw data のクオリティーを評価し, さらに QIAGEN の data analysis center で解析した. シーケンシングデータをリファレンスゲノム (UCSC Human hg 19)にアライメントし, Unique Molecular Index (UMI)を用いて PCR duplicate を除去した. miRbase Release 21 に準拠してそれぞれの miRNA にアノテーションを付与し, Trimmed mean of M-value normalization (TMM)法でデータを正規化し, サンプル間の発現変動を算出した. 上記のうち, サンプルのクオリティーチェック以降の行程は, DNA Chip Research Inc. (Tokyo, Japan)に委託した.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

miRNA-specific reverse transcription stem-loop primer, TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて、各サンプルから抽出した 10 ng の exosomal RNA を逆転写し、最終濃度 10 ng/ μ L の complementary DNA (cDNA) を作成した。PCR 反応は、TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Waltham, MA) と specific stem-loop primer has-miR-214-3p (assay ID 002306; Applied Biosystems)を用いて、95°Cで 10 分間の熱変性、続いて 95°Cで 15 秒間、60°Cで 60 秒間を 40 サイクルの設定で Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)にて行った。発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法で U6 snRNA (assay ID 001973; Applied Biosystems)を内在性コントロールとして相対定量法で算出した。PCR は n=3 もしくは n=4 で行った。

動物実験

腫瘍群ではそれぞれ 1.0×10^7 個の腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401)と Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)の混合液、コントロール群では PBS と Matrigel の混合液を、腫瘍群は各 7 頭、コントロール群 14 頭の週令 5, 雌の BALB/c-nu マウスの右背部に皮下注射し、腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍が生着したマウスについて、腫瘍径を測定し、腫瘍体積 ($V=\pi/6 \times L \times W \times H$)が 100 mm^3 を超えた時点で isoflurane による全身麻酔下に心臓穿刺による採血を行った。全血を 3,000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心し、分離した血清を-80 °Cで保存した。腫瘍

細胞をマウスの体幹部に皮下注射して腫瘍モデルマウスを作成する手法については, Nagasaki-Maeoka らの報告(25)を参照した. 動物実験は日本大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 : APMED19MED021-1).

統計学的解析

統計学的解析は EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japna)を用いて行った. 2 群間の有意差検定は Student's t 検定で行い, 多群間では one-way analysis of variance (ANOVA)で比較し, Tukey-Kramer 法で有意差検定を行った. $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした.

<結果>

抽出した exosome の形態観察, Western blotting による exosome マーカーの検出

抽出産物が exosome であることを確認するため, 透過型電子顕微鏡による観察と Western blotting を行った. 透過型電子顕微鏡により, 各種細胞株からの抽出産物中に, exosome に矛盾しない直径 40 – 200 nm の小胞を確認した(図 1A). Western blotting では, 各種細胞株からの抽出産物において, exosome マーカーである HSP70 が検出され, calnexin が検出されなかったことにより, 抽出産物が exosome であり, 細胞内小器官の混入がないことを確認した(図 1B).

腎ラブドイド腫瘍特異的 exosomal miRNA の絞り込み

次世代シーケンシングにより, 腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401), コントロールとしての HEK293T から抽出した exosomal miRNA の網羅的発現解析を行い, 発現量を比較した. 解析は n=1 で行い, 各サンプルとも 1,000 万リード以上得られた. その結果, 1,366 個の miRNA が検出され, HEK293T と比較して WT-CLS1, G401 でともに高発現であったもののうち, 20 以上の発現変動倍率を示した 10 個の miRNA を抽出した(表 1). 発現変動倍率が WT-CLS1 vs HEK293T で 2140.82, G401 vs HEK293T で 1309.15 と, 腎ラブドイド腫瘍細胞株においてともに最も高発現であった miR-214-3p を腎ラブドイド腫瘍特異的 exosomal miRNA の候補とした.

各種細胞株における exosomal miR-214-3p の発現量比較

各種細胞株由来の exosomal miR-214-3p の発現量を比較するため、qRT-PCR を行った。WT-CLS1, G401 における発現量の差を考慮し、それぞれ個別にコントロール、神経芽腫細胞株との発現量を比較した。その結果、それぞれの腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401)において、コントロールの HEK293T, 神経芽腫細胞株(Kelly, SH-SY5Y)と比較し、exosomal miR-214-3p が有意に高発現であった(図 2)。

腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中の exosomal miR-214-3p の発現解析

in vivo で血清中の exosomal miR-214-3p が検出可能かを検討するため、腎ラブドイド腫瘍モデルマウスを作成した。腫瘍の生着率は WT-CLS1 群では 6/7 頭 (85.7%), G401 群では 4/7 頭 (57.1%)であった。腫瘍が生着したマウスについて、qRT-PCR により、その血清中の exosomal miR-214-3p の発現解析を行った。その結果、コントロール群 10 頭と比較し、腎ラブドイド腫瘍群 10 頭において血清中の exosomal miR-214-3p は有意に高発現であった(腫瘍群: 1.95 ± 1.04 vs. コントロール群: 1.13 ± 0.62 , $p < 0.05$) (図 3)。

<考察>

本研究では, **exosomal miR-214-3p** を腎ラブドイド腫瘍特異的 **exosomal miRNA** の候補として同定し, **HEK293T** や神経芽腫細胞株と比較し, 腎ラブドイド腫瘍細胞株において有意に高発現であることを確認した. また, 腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中の **exosomal miR-214-3p** が有意に高発現であることが示された. いくつかの小児悪性固形腫瘍において, **exosomal miRNA** がバイオマーカーとなりうることが報告されている(26-29)が, 腎ラブドイド腫瘍についての報告はない. 本研究の結果は, **exosomal miR-214-3p** の腎ラブドイド腫瘍における低侵襲な新規バイオマーカーとして可能性を持つことを示している.

腎ラブドイド腫瘍患者の予後は極めて不良であり, 適切な治療を選択するための正しい初期診断が必要である. しかし, 腎ラブドイド腫瘍を含む, 腎芽腫以外の小児腎腫瘍の約 25%において正確な病理診断が得られていないという報告もあり(30), その鑑別は困難である. **Exosomal miRNA** は体液から簡便かつ低侵襲に検出でき, 小児腎腫瘍の新たな診断ツールとしての可能性をもつ. 血清中の **exosomal miR-214-3p** を腎ラブドイド腫瘍の診断に用いることにより, 腫瘍生検による腫瘍散布のリスクを避けた上で, 適切な治療を選択することが可能となる. また, 腎ラブドイド腫瘍は高頻度かつ早期に再発を来すため(7), その予後改善のためには再発の早期発見による適切な治療介入が必要とされる. Xu らは, 鼻咽頭癌において, 血漿中の **miR-9-3p**, **miR-124-3p**, **miR-892b**, **miR-3676-3p** の経

時的な変化によって再発や転移をモニタリングできる可能性がある」と報告している(17). Exosomal miR-214-3p を腎ラブドイド腫瘍の病勢のモニタリングや再発の早期発見に利用できれば、予後の改善に繋がる可能性がある。

miR-214-3p は miR-214 と同義であり、遺伝子座 1q24.3 の Dynamin-3 遺伝子 (*DNM3*)の intron 14 に存在する miR-214 遺伝子にコードされている(31, 32). miR-214-3p がマウスの筋芽細胞において N-ras がん原遺伝子を標的として細胞周期からの逸脱を促進することにより筋の分化に関わるという報告(33)や、神経前駆細胞において *Quaking* を標的として神経発生を促進するという報告があり、筋発生や神経発生において重要な役割をもつ。腎ラブドイド腫瘍の起源は不詳であるが、Tsokos ら(34), Ota ら(35), Sugimoto ら(36)により、腎ラブドイド腫瘍細胞において、NSE, S-100, neurofilament といった神経マーカーや、筋のマーカーである myoglobin や desmin が検出されたことが報告されており、腎ラブドイド腫瘍が神経や筋を起源とする可能性が示唆されている。miR-214-3p が神経や筋の発生に関わっており、さらに、腎ラブドイド腫瘍が神経や筋を起源とする可能性があることを考慮すると、miR-214-3p が腎ラブドイド腫瘍において高発現であることは矛盾しない結果である。

miR-214-3p はがん促進因子やがん抑制因子として様々な腫瘍に関わっている(37-43). 例として、miR-214-3p は骨肉腫で高発現であり(43), *CADMI* 遺伝子を標

的として腫瘍の増殖, 遊走, 浸潤を促進している(37). 一方で, 子宮体癌では低発現であり, 腫瘍の増大, 遊走や浸潤を促進する *NEAT1* 遺伝子と負の相関をもつ(38). *miR-214-3p* は腎ラブドイド腫瘍において高発現であることから, 骨肉腫などと同様にがん促進因子として作用していると予想されるが, その腎ラブドイド腫瘍における標的遺伝子や機能は明らかではなく, 現在当研究室で検討中である.

体液中の *miR-214-3p* は肝細胞癌(44), 乳癌(45), 上咽頭癌(46), 膀胱癌(47), 前立腺癌(48), 骨肉腫(49)において, 診断, 予後の新規バイオマーカーとしての可能性が報告されている. *miR-214-3p* が高発現である腫瘍(44-47, 49)と低発現である腫瘍(48)があり, また, 高発現である腫瘍においてその発現量は腫瘍の進展度や所属リンパ節転移の広がりとは相関する(45, 46). 臨床応用には課題が残るが, *miR-214-3p* は腎ラブドイド腫瘍を含む様々な悪性腫瘍のバイオマーカーとして有用となりうる.

本研究の **limitation** として, まず, 細胞株の入手が困難であり, 腎芽種をはじめとした他の小児腎腫瘍との **exosomal miR-214** の発現量比較が行えていない点が挙げられる. 他の小児腎腫瘍と比較して **exosomal miR-214-3p** が高発現であることを確認するため, さらなる検討が必要である. さらに, 患者の血清サンプルを用いて **exosomal miR-214-3p** の発現解析を行えていないことが挙げられる. 腎ラ

ブドイド腫瘍が極めて稀な疾患であり、統計学的解析に十分な数の患者サンプルを得ることが困難であるため、腫瘍モデルマウスを用いて検討を行った。本研究では腎ラブドイド腫瘍モデルマウス群において血清中の **exosomal miR-214-3p** が有意に高発現であったが、このことは、腫瘍モデルマウスを用いた検討が希少癌の新規バイオマーカーについての研究に有用であることを示している。しかしながら、本研究を礎として、**exosomal miR-214-3p** の腎ラブドイド腫瘍のバイオマーカーとしての臨床的な有用性を示すためには、患者血清サンプルを用いた、感度や特異度を考慮した適切なカットオフ値の検討が必要である。

本研究により、**exosomal miR-214-3p** が腎ラブドイド腫瘍細胞株において有意に高発現であり、さらに腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中においても有意に高発現であることが示された。これらの結果により、**exosomal miR-214-3p** が腎ラブドイド腫瘍の新規バイオマーカーとしての可能性を持つことが示唆された。臨床応用に向けて、患者血清サンプルを用いたさらなる検討が必要である。

<まとめ>

細胞株を用いて、腎ラブドイド腫瘍特異的な **exosomal miRNA** として **miR-214-3p** を同定した。腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清を用いた解析において、**exosomal miR-214-3p** が有意に高発現であることを確認した。以上より、**exosomal miR-214-3p** が腎ラブドイド腫瘍の新規バイオマーカーとしての可能性を持つことが示唆された。

<謝辞>

本研究に関して、ご指導を賜りました日本大学医学部外科学系小児外科学分野
越永従道 教授, 上原秀一郎 准教授, 長崎瑛里 先生に深謝いたします.

本研究を行うにあたりまして、多大なるご協力をいただきました日本大学医学
部外科学系小児外科学分野の医局員の皆様に深謝いたします.

<表>

miRNA	miRbase No.	WT-CLS1 vs. HEK293T (Fold Change)	G401 vs. HEK293T (Fold Change)
miR-214-3p	MIMAT0000271	2140.82	1309.15
miR-432-5p	MIMAT0002814	963.33	40.30
miR-127-3p	MIMAT0000446	280.46	29.86
miR-199b-3p	MIMAT0004563	188.25	56.10
miR-199a-3p	MIMAT0000232	145.19	55.58
miR-4301	MIMAT0016850	96.60	30.75
miR-409-5p	MIMAT0001638	38.87	73.14
miR-365b-5p	MIMAT0022833	28.20	73.14
miR-887-3p	MIMAT0004951	27.44	28.36
miR-5003-3p	MIMAT0021026	20.58	25.38

表 1 : 腎ラブドイド腫瘍細胞株(WT-CLS1, G401)において HEK293T と比較し高
発現(発現変動倍率; fold change>20)であった miRNA

< 図 >

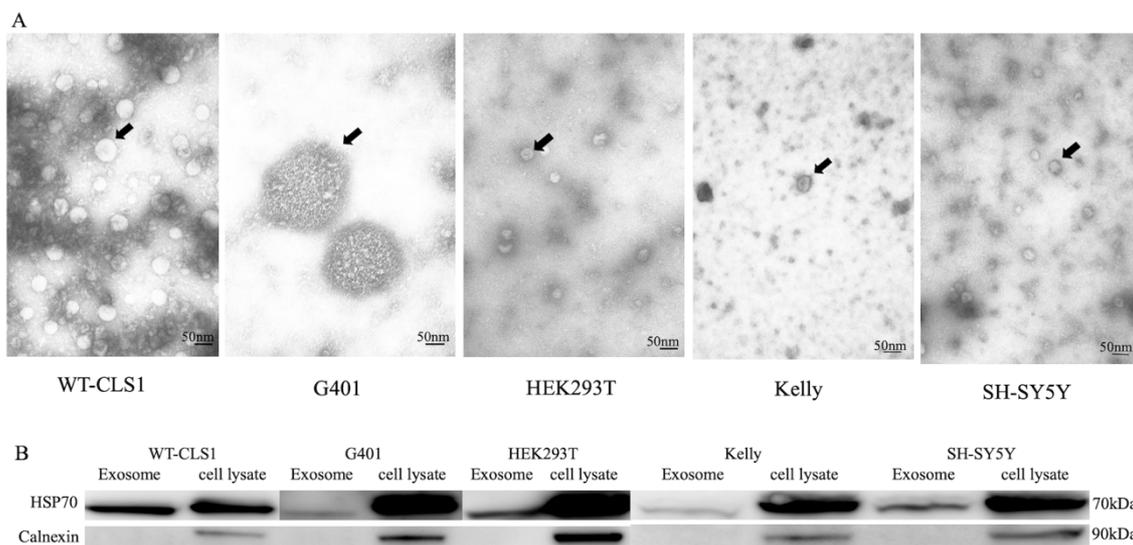


図 1：各種細胞株培養上清から抽出した exosome の電子顕微鏡像(A), Western blotting による exosome マーカーの検出(B)

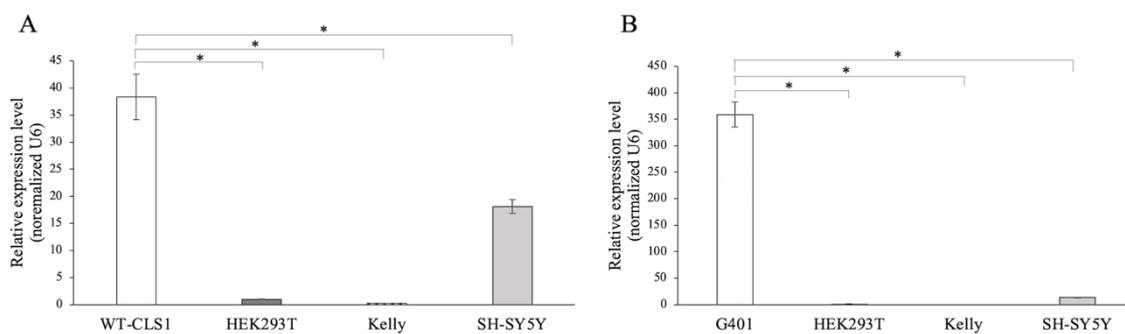


図 2：腎ラブドイド腫瘍細胞株と神経芽腫細胞株における exosomal miR-214-3p の発現解析

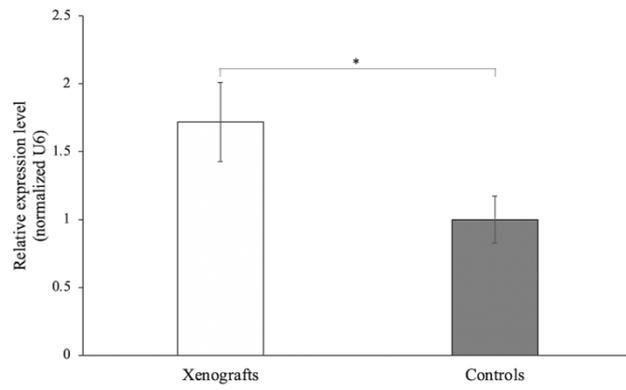


図 3：腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中の exosomal miR-214-3p の発現解析

<図説>

図 1：各種細胞株培養上清から抽出した exosome の電子顕微鏡像(A), Western blotting による exosome マーカーの検出(B)

透過型電子顕微鏡による観察, Western blotting による exosome マーカーの検出により, 各種細胞株培養上清からの抽出産物が exosome であることを確認した. 透過型電子顕微鏡によって, 抽出産物中に直径 40 – 200 nm の exosome に矛盾しない小胞を確認した(A). Western blotting では, 抽出産物において exosome マーカーである HSP70 が検出され, calnexin が検出されなかったことより, 抽出産物が exosome であり, 細胞内小器官の混入がないことを確認した(B).

図 2：腎ラブドイド腫瘍細胞株と神経芽腫細胞株における exosomal miR-214-3p の発現解析

腎ラブドイド腫瘍細胞株と神経芽腫細胞株の培養上清中 exosomal miR-214-3p の発現解析のため, qRT-PCR を行った. WT-CLS1 (A), G401 (B)それぞれにおいて, コントロールの HEK243T, 神経芽腫細胞株の Kelly, SH-SY5Y と比較し, exosomal miR-214-3p が有意に高発現であることを確認した(* $p < 0.01$).

図 3：腎ラブドイド腫瘍モデルマウス血清中の exosomal miR-214-3p の発現解析

腎ラブドイド腫瘍モデルマウスとコントロールマウスの血清中 exosomal miR-214-3p の発現解析のため, qRT-PCR を行った. 腎ラブドイド腫瘍群 10 頭(WT-

CLS1:6頭, G401:4頭)とコントロール群 10頭を比較し, 腎ラブドイド腫瘍群において exosomal miR-214-3p が有意に高発現であった(* $p<0.05$).

<引用文献>

1. Dome JS, Fernandez CV, Mullen EA, Kalapurakal JA, Geller JI, Huff V, Gratias EJ, Dix DB, Ehrlich PF, Khanna G, Malogolowkin MH, Anderson JR, Naranjo A, Perlman EJ, Committee COGRT. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: renal tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(6):994-1000.
2. Pastore G, Znaor A, Spreafico F, Graf N, Pritchard-Jones K, Steliarova-Foucher E. Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*. 2006;42(13):2103-14.
3. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017;17(4):369-86.
4. Koshinaga T, Takimoto T, Oue T, Okita H, Tanaka Y, Nozaki M, Tsuchiya K, Inoue E, Haruta M, Kaneko Y, Fukuzawa M. Outcome of renal tumors registered in Japan Wilms Tumor Study-2 (JWiTS-2): A report from the Japan Children's Cancer Group (JCCG). *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(7):e27056.

5. Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*. 1998;394(6689):203-6.
6. Dähnert W. Radiology review manual, 8th edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2017. pp 1264.
7. van den Heuvel-Eibrink MM, van Tinteren H, Rehorst H, Coulombe A, Patte C, de Camargo B, de Kraker J, Leuschner I, Lugtenberg R, Pritchard-Jones K, Sandstedt B, Spreafico F, Graf N, Vujanic GM. Malignant rhabdoid tumours of the kidney (MRTKs), registered on recent SIOP protocols from 1993 to 2005: a report of the SIOP renal tumour study group. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(5):733-7.
8. Tomlinson GE, Breslow NE, Dome J, Guthrie KA, Norkool P, Li S, Thomas PR, Perlman E, Beckwith JB, D'Angio GJ, Green DM. Rhabdoid tumor of the kidney in the National Wilms' Tumor Study: age at diagnosis as a prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7641-5.
9. Amar AM, Tomlinson G, Green DM, Breslow NE, de Alarcon PA. Clinical presentation of rhabdoid tumors of the kidney. *J Pediatr Hematol Oncol*.

2001;23(2):105-8.

10. Mayes LC, Kasselberg AG, Roloff JS, Lukens JN. Hypercalcemia associated with immunoreactive parathyroid hormone in a malignant rhabdoid tumor of the kidney (rhabdoid Wilms' tumor). *Cancer*. 1984;54(5):882-4.
11. Papadakis V, Vlachopapadopoulou EA, Levine L. Rhabdoid tumor of the kidney with humoral hypercalcemia and parathyroid hormone-related protein production. *Med Pediatr Oncol*. 1995;24(2):133-6.
12. Sun L, Li D, Song K, Wei J, Yao S, Li Z, Su X, Ju X, Chao L, Deng X, Kong B, Li L. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. *Sci Rep*. 2017;7(1):2552.
13. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for exosome investigation. *Methods*. 2015;87:31-45.
14. Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, Sekhon K, Majid S, Shahryari V, Dahiya R, Tanaka Y, Saini S. microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate

- Cancer. *Cancer Res.* 2018;78(7):1833-44.
15. Valentino A, Reclusa P, Sirera R, Giallombardo M, Camps C, Pauwels P, Crispi S, Rolfo C. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(6):651-7.
16. Shen J, Hu Q, Schrauder M, Yan L, Wang D, Medico L, Guo Y, Yao S, Zhu Q, Liu B, Qin M, Beckmann MW, Fasching PA, Strick R, Johnson CS, Ambrosone CB, Zhao H, Liu S. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. *Oncotarget.* 2014;5(14):5284-94.
17. Xu X, Lu J, Wang F, Liu X, Peng X, Yu B, Zhao F, Li X. Dynamic Changes in Plasma MicroRNAs Have Potential Predictive Values in Monitoring Recurrence and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7329195.
18. Ye ZQ, Zou CL, Chen HB, Jiang MJ, Mei Z, Gu DN. MicroRNA-7 as a Potential Biomarker for Prognosis in Pancreatic Cancer. *Dis Markers.* 2020;2020:2782101.
19. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles.* 2016;5(1):31292.

20. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
21. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6328-33.
22. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17442-52.
23. Stroup EK, Yeu Y, Budhipramono A, Hwang TH, Rakheja D, Erdreich-Epstein A, Laetsch TW, Amatruda JF, Chen KS. WT-CLS1 is a rhabdoid tumor cell line and can be inhibited by miR-16. *Cancer Reports*. 2018;2(3):e1110.
24. Garvin AJ, Re GG, Tarnowski BI, Hazen-Martin DJ, Sens DA. The G401 cell line, utilized for studies of chromosomal changes in Wilms' tumor, is derived from a

- rhabdoid tumor of the kidney. *Am J Pathol.* 1993;142(2):375-80.
25. Nagasaki-Maeoka E, Ikeda K, Takayama KI, Hirano T, Ishizuka Y, Koshinaga T, Tsukune N, Takayama T, Inoue S, Fujiwara K. Polyethylene glycol derivative 9bw suppresses growth of neuroblastoma cells by inhibiting oxidative phosphorylation. *Cancer Sci.* 2020;111(8):2943-53.
26. Galardi A, Colletti M, Di Paolo V, Vitullo P, Antonetti L, Russo I, Di Giannatale A. Exosomal MiRNAs in Pediatric Cancers. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
27. Morini M, Cangelosi D, Segalerba D, Marimpietri D, Raggi F, Castellano A, Fruci D, de Mora JF, Canete A, Yanez Y, Viprey V, Corrias MV, Carlini B, Pezzolo A, Schleiermacher G, Mazzocco K, Ladenstein R, Sementa AR, Conte M, Garaventa A, Burchill S, Luksch R, Bosco MC, Eva A, Varesio L. Exosomal microRNAs from Longitudinal Liquid Biopsies for the Prediction of Response to Induction Chemotherapy in High-Risk Neuroblastoma Patients: A Proof of Concept SIOPEN Study. *Cancers (Basel).* 2019;11(10).
28. Liu W, Chen S, Liu B. Diagnostic and prognostic values of serum exosomal microRNA-21 in children with hepatoblastoma: a Chinese population-based study.

Pediatr Surg Int. 2016;32(11):1059-65.

29. Kurahashi R, Kadomatsu T, Baba M, Hara C, Itoh H, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Terada K, Araki K, Eto M, Schmidt LS, Kamba T, Linehan WM, Oike Y. MicroRNA-204-5p: A novel candidate urinary biomarker of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2019;110(6):1897-908.
30. Huang CC, Cutcliffe C, Coffin C, Sorensen PH, Beckwith JB, Perlman EJ, Renal Tumor Committee of the Children's Oncology G. Classification of malignant pediatric renal tumors by gene expression. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46(7):728-38.
31. Shu P, Fu H, Zhao X, Wu C, Ruan X, Zeng Y, Liu W, Wang M, Hou L, Chen P, Yin B, Yuan J, Qiang B, Peng X. MicroRNA-214 modulates neural progenitor cell differentiation by targeting Quaking during cerebral cortex development. *Sci Rep.* 2017;7(1):8014.
32. Penna E, Orso F, Taverna D. miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions. *J Invest Dermatol.* 2015;135(4):960-9.
33. Liu J, Luo XJ, Xiong AW, Zhang ZD, Yue S, Zhu MS, Cheng SY. MicroRNA-214

promotes myogenic differentiation by facilitating exit from mitosis via down-regulation of proto-oncogene N-ras. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26599-607.

34. Tsokos M, Kouraklis G, Chandra RS, Bhagavan BS, Triche TJ. Malignant rhabdoid tumor of the kidney and soft tissues. Evidence for a diverse morphological and immunocytochemical phenotype. *Arch Pathol Lab Med.* 1989;113(2):115-20.

35. Ota S, Crabbe DC, Tran TN, Triche TJ, Shimada H. Malignant rhabdoid tumor. A study with two established cell lines. *Cancer.* 1993;71(9):2862-72.

36. Sugimoto T, Hosoi H, Horii Y, Ishida H, Mine H, Takahashi K, Abe T, Ohta S, Sawada T. Malignant rhabdoid-tumor cell line showing neural and smooth-muscle-cell phenotypes. *Int J Cancer.* 1999;82(5):678-86.

37. Cai H, Miao M, Wang Z. miR-214-3p promotes the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting CADM1. *Oncol Lett.* 2018;16(2):2620-8.

38. Wang J, Zhao X, Guo Z, Ma X, Song Y, Guo Y. Regulation of NEAT1/miR-214-3p on the growth, migration and invasion of endometrial carcinoma cells. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;295(6):1469-75.

39. Xu C, He T, Li Z, Liu H, Ding B. Regulation of HOXA11-AS/miR-214-3p/EZH2 axis on the growth, migration and invasion of glioma cells. *Biomed Pharmacother.* 2017;95:1504-13.
40. Zhan M, He K, Xiao J, Liu F, Wang H, Xia Z, Duan X, Huang R, Li Y, He X, Yin H, Xiang G, Lu L. LncRNA HOXA11-AS promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing miR-214-3p. *J Cell Mol Med.* 2018;22(8):3758-67.
41. Wang X, Li H, Shi J. LncRNA HOXA11-AS Promotes Proliferation and Cisplatin Resistance of Oral Squamous Cell Carcinoma by Suppression of miR-214-3p Expression. *Biomed Res Int.* 2019;2019:8645153.
42. Yang Y, Li Z, Yuan H, Ji W, Wang K, Lu T, Yu Y, Zeng Q, Li F, Xia W, Lu S. Reciprocal regulatory mechanism between miR-214-3p and FGFR1 in FGFR1-amplified lung cancer. *Oncogenesis.* 2019;8(9):50.
43. Wang Z, Cai H, Lin L, Tang M, Cai H. Upregulated expression of microRNA-214 is linked to tumor progression and adverse prognosis in pediatric osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(2):206-10.

44. Jin Y, Wong YS, Goh BKP, Chan CY, Cheow PC, Chow PKH, Lim TKH, Goh GBB, Krishnamoorthy TL, Kumar R, Ng TP, Chong SS, Tan HH, Chung AYF, Ooi L, Chang JPE, Tan CK, Lee CGL. Circulating microRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):10464.
45. Schwarzenbach H, Milde-Langosch K, Steinbach B, Muller V, Pantel K. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(3):933-41.
46. Wang J, Xu Y, Wang J, Ying H. Circulating miR-214-3p predicts nasopharyngeal carcinoma recurrence or metastasis. *Clin Chim Acta.* 2020;503:54-60.
47. Kim SM, Kang HW, Kim WT, Kim YJ, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ. Cell-Free microRNA-214 From Urine as a Biomarker for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Korean J Urol.* 2013;54(11):791-6.
48. Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioke J, Marian C, Oermann EK, Uhm S, Kim JS, Chen LN, Li X, Berry DL, Kallakury BV, Chauhan SC, Collins SP, Suy S, Kumar D. MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PLoS One.* 2013;8(10):e76994.

49. Allen-Rhoades W, Kurenbekova L, Satterfield L, Parikh N, Fuja D, Shuck RL, Rainusso N, Trucco M, Barkauskas DA, Jo E, Ahern C, Hilsenbeck S, Donehower LA, Yustein JT. Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring, and prognosis in osteosarcoma. *Cancer Med.* 2015;4(7):977-88.

研 究 業 績

山岡 敏

I	発表	①一般発表	32
		②特別発表	なし
II	論文	①原著論文	1 (共 1)
		②症例報告	2 (共 2)
		③総説	なし
III	著書		なし

以上

I 発表

①一般発表

1. 大橋研介, 越永従道, 上原秀一郎, 古屋武史, 金田英秀, 川島弘之, 後藤俊平, 吉澤信輔, 星 玲奈, 石塚悦昭, 菅原大樹, 山岡 敏 : Sutureless enterostomy は本当に有効か?, 第 115 回東京小児外科研究会, 2017 年 6 月, 東京
2. 山岡 敏, 後藤俊平, 菅原大樹, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 腹痛を契機に発見された小児副脾捻転の 1 例, 第 52 回日本小児外科学会関東甲信越地方会, 2017 年 10 月, 茨城
3. 菅原大樹, 山岡 敏, 石塚悦昭, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 外科的切除を施行した乳児片側性女性化乳房の 1 例, 第 52 回日本小児外科学会関東甲信越地方会, 2017 年 10 月, 茨城
4. 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 石塚悦昭, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 上原秀一郎, 越永従道 : 当科における短腸症候群の中期的問題点, 第 33 回日本小児外科学会秋季シンポ

ジウム, 2017年10月, 神奈川

5. 石塚悦昭, 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 上原秀一郎, 越永従道 : 保険外・未承認治療を要する超短腸症候群の1例, 第33回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2017年10月, 神奈川

6. 星 玲奈, 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 石塚悦昭, 橋本 真, 吉澤信輔, 後藤俊平, 金田英秀, 古屋武史, 上原秀一郎, 越永従道 : 直腸尿道瘻・直腸会陰皮膚瘻を合併した分類不能型直腸肛門奇形の1例, 第74回直腸肛門奇形研究会, 2017年10月, 神奈川

7. 金田英秀, 山岡 敏, 菅原大樹, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 合併症ゼロを目指した手術(小児) 小児におけるリアルタイム超音波ガイド下中心静脈カテーテル留置法の検討, 第79回日本臨床外科学会総会, 2017年11月, 東京

8. 古屋武史, 山岡 敏, 菅原大樹, 石塚悦昭, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 小児

Common disease の最適治療 当科における膿瘍形成性小児急性虫垂炎
の治療戦略, 第 79 回日本臨床外科学会総会, 2017 年 11 月, 東京

9. 川島弘之, 古屋武史, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 浅井 陽, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 単孔式リンパ管温存腹腔鏡下内精索動静脈結紮術を施行した小児精索静脈瘤の 3 例, 第 79 回日本臨床外科学会総会, 2017 年 11 月, 東京

10. 石塚悦昭, 金田英秀, 上原秀一郎, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 越永従道 : WAGR 症候群の経過観察中に発生した片側性 Wilms 腫瘍に対する腎温存手術を施行した 1 例, 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 愛媛

11. 山岡 敏, 金田英秀, 菅原大樹, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 小児副脾捻転の 1 例, 第 548 回日本大学医学会例会, 2018 年 1 月, 東京

11. 吉澤信輔, 金田英秀, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 腎悪性

腫瘍との鑑別に難渋した後腹膜奇形腫の1例, 第548回日本大学医学会
例会, 2018年1月, 東京

12. 川島弘之, 古屋武史, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊
平, 浅井 陽, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児精索静
脈瘤に対する単孔式リンパ管温存腹腔鏡下内精索動静脈結紮術の有用
性, 第548回日本大学医学会例会, 2018年1月, 東京

13. 古屋武史, 山岡 敏, 菅原大樹, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤
信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児虫
垂炎におけるSSIへの対策, 第548回日本大学医学会例会, 2018年1月,
東京

14. 山岡 敏, 金田英秀, 菅原大樹, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤
信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 術前診
断に難渋した小児副脾捻転の1例, 第55回日本小児外科学会学術集会,
2018年5月, 新潟

15. 菅原大樹, 上原秀一郎, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉
澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 越永從道 : 合併奇

形をともしなわぬ十二指腸閉鎖症に胆道閉鎖症を合併した 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟

16. 川島弘之, 上原秀一郎, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 今津博雄, 越永従道 : 胆管炎を繰り返す胆道閉鎖症I-cyst 型長期生存例に内視鏡治療が有用であった 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟

17. 金田英秀, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 小児卵巣腫瘍 60 例の検討, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟

18. 大橋研介, 越永従道, 上原秀一郎, 古屋武史, 金田英秀, 川島弘之, 吉澤信輔, 石塚悦昭, 星 玲奈, 松川加奈子, 菅原大樹, 山岡 敏 : 超低出生体重児の腹部単純 X 線 gasless 像は腸管の未熟性を示す, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟

19. 吉澤信輔, 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星

- 玲奈, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 上原秀一郎, 越永從道 : 腸管逆回転症に脾臓低形成を伴った 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
20. 古屋武史, 金田英秀, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 当科で経験した小児精巣腫瘍 10 例の臨床的検討, 第 27 回日本小児泌尿器科学会学術集会, 2018 年 6 月, 石川
21. 大橋研介, 越永從道, 上原秀一郎, 古屋武史, 金田英秀, 川島弘之, 吉澤信輔, 星 玲奈, 石塚悦昭, 松川加奈子, 菅原大樹, 山岡 敏 : 超低出生体重児の腹部単純 X 線 gasless 像は腸管の未熟性を示す, 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2018 年 7 月, 東京
22. 石塚悦昭, 大橋研介, 山岡 敏, 菅原大樹, 門脇加奈子, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 上原秀一郎, 越永從道 : 中腸軸捻転を伴わない新生児腸回転異常症の検討, 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2018 年 7 月, 東京
23. 山岡 敏, 小倉道一, 高田武蔵, 杉山順子, 康 祐大, 君塚 圭, 大原守

貴, 三宅洋 : 腹腔鏡下回盲部切除術を施行した虫垂子宮内膜症の症例,
第 46 回埼玉県東部消化器外科研究会, 2018 年 8 月, 埼玉

24. 山岡 敏, 小倉道一, 高田武蔵, 杉山順子, 康 祐大, 大原守貴, 三宅
洋 : 大腸癌を合併し腹腔鏡下結腸亜全摘術を施行した Cronkhite-Canada
症候群の 1 例, 第 31 回日本内視鏡外科学会総会, 2018 年 12 月, 福岡
25. 高田武蔵, 山岡 敏, 小倉道一, 康 祐大, 杉山順子, 大原守貴, 三宅
洋 : 単孔式腹腔鏡補助下 S 状結腸切除術を施行した S 状結腸過長症の
3 例, 第 31 回日本内視鏡外科学会総会, 2018 年 12 月, 福岡
26. 小倉道一, 山岡 敏, 高田武蔵, 杉山順子, 康 祐大, 大原守貴, 三宅
洋 : 腹腔鏡下にドレナージ手術を施行した *Klebsiella Pneumoniae* によ
る化膿性肝膿瘍破裂の 1 例, 第 31 回日本内視鏡外科学会総会, 2018 年
12 月, 福岡
27. 大原守貴, 小倉道一, 山岡 敏, 高田武蔵, 杉山順子, 康 祐大, 三宅
洋 : 腹腔鏡内視鏡合同手術(LECS)により切除した十二指腸 NET の一
例, 第 31 回日本内視鏡外科学会総会, 2018 年 12 月, 福岡
28. 山岡 敏, 小倉道一, 高田武蔵, 杉山順子, 康 祐大, 君塚 圭, 大原守

貴, 三宅 洋 : Virchow リンパ節転移を伴った大腸癌の症例, 第 47 回埼玉県東部消化器外科研究会, 2019 年 2 月, 埼玉

29. Yamaoka B, Nagasaki E, Uekusa S, Hidaka A, Hijikata K, Katoh R, Fujiwara K, Koshinaga T, Uehara S : 腎ラブドイド腫瘍エクソソーム由来 miR-214-3p のバイオマーカーとしての有用性, 第 62 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2020 年 11 月, オンライン開催

30. 山岡 敏, 長崎瑛里, 植草省太, 日高綾乃, 土方浩平, 加藤礼保納, 藤原恭子, 越永從道, 上原秀一郎 : 腎ラブドイド腫瘍における Exosomal miR-214-3p の新規バイオマーカーとしての有用性, 第 121 回日本外科学会定期学術集会, 2021 年 4 月, オンライン開催

31. 山岡 敏, 金田英秀, 金澤剛二, 谷ヶ崎博, 上原秀一郎, 越永從道 : 肝芽腫治療後, 1 年 4 ヶ月後に悪性黒色腫を発病した 1 例, 第 58 回日本小児外科学会学術集会, 2021 年 4 月, 神奈川

32. 山岡 敏, 長崎瑛里, 植草省太, 日高綾乃, 土方浩平, 加藤礼保納, 藤原恭子, 越永從道, 上原秀一郎 : 第 58 回日本小児外科学会学術集会, 2021

年 4 月，神奈川

②特別発表

なし

II 論文

①原著論文

1. Yamaoka B, Nagasaki-Maeoka E, Uekusa S, Hidaka A, Hijikata K, Kato R, Fujiwara K, Koshinaga T, Uehara S : Exosomal miR-214-3p as a potential novel biomarker for rhabdoid tumor of the kidney, Pediatric Surgery International, Published online, September 7, doi : <https://doi.org/10.1007/s00383-021-04989-w>, 2021.

②症例報告

1. 山岡 敏, 上原秀一郎, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 越永従道 : 術前診断に難渋した小児大網内副脾捻転の 1 例, 日本小児外科学会雑誌, 56(1):100-104, 2020.
2. 菅原大樹, 上原秀一郎, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 越永従道 : 先天性十二指腸閉鎖症術後に胆道閉鎖症を発症した 1 例, 日本小児外科学会雑誌, 57(1):33-37, 2021.

③総説

なし

Ⅲ 著書

なし