

平成30年 8月31日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10112

研究課題名(和文) 分泌型癌抑制microRNAを用いた消化器癌の抗癌剤感受性予測と核酸治療法の開発

研究課題名(英文) Depleted tumor suppressor microRNAs in body fluid contribute to poor outcomes and are novel therapeutic targets in digestive system cancers

研究代表者

小松 周平 (Komatsu, Shuhei)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：40578978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的データベース解析またはアレイ解析により、血中濃度による癌の悪性度や抗癌剤感受性診断が可能な分泌型の癌抑制microRNA候補を同定した。さらには分泌型の癌抑制型microRNAを用いた血液・体液を介した抗腫瘍効果や抗癌剤感受性回復効果を目的とした新たな癌核酸治療への応用の可能性をin vivoモデルを作成し世界に先駆けて検証した。この成果は、膵癌でmiR-107の有用性(Scientific Reports 2017)と胃癌でmiR-101の有用性(Oncotarget 2017)として英文誌に報告した。今回の解析結果を基盤に食道癌、胃癌、肝癌、膵癌の新たな核酸治療法の開発を進めている。

研究成果の概要(英文)：The development of minimally invasive biomarkers in body fluids, so-called 'liquid biopsy' have been required. Since the first report in gastric cancer in 2010, we have identified more than 20 candidate microRNAs for liquid biopsy in plasma of patients with digestive tract cancers, which could be useful in early cancer detection, monitoring disease status, and predicting malignant potential, prognosis and treatment sensitivity. During these processes, we also identified that a low level of some tumor suppressor microRNAs in plasma relates to tumor progression and poor outcomes of esophageal cancer in miR-375 (Expert Opin Biol Ther 2012) and miR-655 (In press 2018), pancreatic cancer in miR-107 (Sci Rep 2017), and gastric cancer in miR-101 (Oncotarget 2017) and miR-148a (In press 2018). Moreover, we demonstrated that the restoration and maintenance of these plasma microRNA levels may be a novel therapy for inhibiting tumor and metastatic progression in the in vivo analyses using mice.

研究分野：リキッドバイオプシー

キーワード：リキッドバイオプシー microRNA バイオマーカー 遊離核酸 エキソソーム 核酸治療

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子発現調節に関わるmicroRNAが、Argonaute2やHDLなどの特殊な蛋白と結合したり、エキソソームなどのvesicleに封入されたりして極めて高い安定性を獲得し、血液等の体液中に能動的に分泌され細胞間の情報伝達の重要なメディエーターとして働いていることが明らかとなっている。申請者は、従来の腫瘍マーカーへの限界を感じ、この分野での臨床応用を目指して血中microRNAを指標とした食道癌、胃癌、膵癌等の消化器癌の次世代のバイオマーカーの探索を行い20種類以上の候補の有用性を世界に先駆けて報告してきた(Br J Cancer 2010-2014, Gastroenterology 2012)。

これまで申請者らは、血中で高濃度に検出される癌遺伝子型miRNAを中心に解析を進め報告してきたが、癌組織で発現低下しているLet-7aやmiR-375など一部の癌抑制遺伝子型miRNAが、担癌患者の血中でも健常人より著しく濃度低下していることに早くから注目していた(Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S et al. Br J cancer 2010, Komatsu S et al. Br J Cancer 2011, Kawaguchi T, Komatsu S et al. Br J Cancer 2013)。しかし、一方で初期のステージの癌や、ステージが進行した癌でも予後の良い癌においては、これらの癌抑制型miRNAの血中濃度が有意に高いことにも注目した。(Komatsu S et al. Br J Cancer 2011, Komatsu S et al. Expert Opinion Biol Therapy 2012, Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S et al. Br J Cancer 2012)。

これらの結果から、“一部の癌抑制型miRNAは正常細胞からも癌細胞の増殖抑制を目的として血中に分泌されるが、それらが枯渇することで癌の増殖、浸潤、転移などの悪性化、抗癌剤への耐性化が導かれる可能性がある。枯渇した一部の癌抑制型miRNAを生体内に再導入し血中濃度を高く維持することで、抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果を得ることが

できる可能性がある”という仮説をたてた。

2. 研究の目的

今回、これまでの研究結果と解析手法を基盤に新たに癌抑制型microRNAに注目し、鋭敏な悪性度診断、抗癌剤感受性診断を可能とする血中の分泌型microRNAを網羅的に探索する。更にこれらのmicroRNAを用いて体液を介した強力な抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果の実現可能とする新たな癌治療法の構築を目的とした。

3. 研究の方法

以下の方法で解析を行った。

消化器癌患者血中で著しく濃度低下のみられる癌抑制型のmiRNA候補群のmicroRNAアレイを用いた網羅的探索

候補miRNA群のtest scale 及び多数症例で validation studyによる悪性度、予後への関与の評価

候補miRNAの過剰発現により、腫瘍への増殖・遊走・浸潤抑制効果の極めて強いmiRNA候補の絞り込み

候補の癌抑制型miRNAの機能解析

癌抑制型miRNAを高濃度に血中・体液中で維持することによる抗腫瘍効果を目的とした癌治療への応用

4. 研究成果

今回、膵癌患者血漿中の癌抑制型microRNA(miRNA)の発現を解析し、バイオマーカー、さらには抗がん核酸治療への応用の可能性を探索した。網羅的miRNAアレイ解析により健常人に比して膵癌患者の血漿で高度に低下していた6種類の癌抑制型miRNAを選出した。qRT-PCRによるTest-scale解析、Validation解析により、健常人に比し膵癌患者で最も有意に低下しているmiR-107を同定した。膵癌患者においてmiR-107低濃度はT因子、N因子の進行と相関し、独立した予後不良因子であった(p=0.042,

HR=2.95)。膵癌細胞株においてmiR-107過剰発現はp21の発現誘導、G1/S arrestを伴う著しい細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が認められた。miR-107過剰発現はNotch2タンパク発現を抑制し、標的として発現制御を行なっていることが示唆された。膵癌細胞株を皮下移植したSCIDマウスにmiR-107を腫瘍周囲に皮下投与したところ、コントロール群に比して有意な腫瘍抑制効果と血中濃度の上昇が認められた。血漿中miR-107は、膵癌のバイオマーカーとしてのみならず抗がん核酸治療への応用も期待できることを明らかにした。本結果をScientific Reports 2017に報告した。同手法で胃癌ではmiR-101(Oncotarget 2017)、食道癌ではmiR-655(解析中)の解析を行った。他の候補についても、次年度以降の科学研究費のもと解析をすすめる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)(全て査読あり)

1. Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Kiuchi J, Nishibeppu K, Kosuga T, Konishi H, Shiozaki A, Okamoto K, Fujiwara H, Otsuji E. Low plasma levels of miR-101 are associated with tumor progression in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017 Sep 13;8(63):106538-106550. doi: 10.18632/oncotarget.20860.
2. Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Kiuchi J, Nishibeppu K, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Ochiai T, Okamoto K, Taniguchi H, Otsuji E. Depleted tumor suppressor miR-107 in plasma relates to tumor progression and is a novel therapeutic target in pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2017 Jul 18;7(1):5708. doi: 10.1038/s41598-017-06137-8.
3. Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Tsujiura M, Takeshita H, Hirajima S, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Imamura T, Kiuchi J, Konishi H, Shiozaki A, Okamoto K, Otsuji E. Circulating MicroRNAs: A Next-Generation Clinical Biomarker for Digestive System Cancers. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 1;17(9). pii: E1459. doi: 10.3390/ijms17091459.
4. Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Okamoto K, Otsuji E. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol*. 2016 Jul 7;22(25):5627-41. doi:10.3748/wjg.v22.i25.5627.
5. Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Takeshita H, Miyamae M, Ohashi T, Okajima W, Imamura T, Kiuchi J, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Plasma microRNA profiles: identification of miR-23a as a novel biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):62034-62048. doi: 10.18632/oncotarget.11500.
6. Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Kawaguchi T, Hirajima S, Ohashi T, Imamura T, Kiuchi J, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Okamoto K, Taniguchi H, Itoh Y, Otsuji E. Circulating microRNA profiles in plasma: identification of miR-224 as a novel diagnostic

biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function. *Oncotarget*. 2016 Aug 16;7(33):53820-53836. doi: 10.18632/oncotarget.10781.

7. Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Imamura T, Kiuchi J, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating miR-21 as an independent predictive biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2016 Jul 1;6(7):1511-23. eCollection 2016.
8. Miyamae M, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Hirajima S, Okajima W, Ohashi T, Imamura T, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Ikoma H, Ochiai T, Okamoto K, Taniguchi H, Otsuji E. Plasma microRNA profiles: identification of miR-744 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015 Nov 17;113(10):1467-76. doi: 10.1038/bjc.2015.366.

〔学会発表〕(計 30 件)

1. エクソソーム中のマイクロ RNA を介した胃組織型混在癌の悪性化機構の解明(英語) 今村 泰輔(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本癌学会総会 76 回 (2017.09)
2. 肝胆膵腫瘍患者の血中 microRNA を指標とした Liquid Biopsy による新たな診断・治療の可能性(英語) 小松 周平(京都府立医科大学 消化器外科)他 日本癌学会総会 76 回 (2017.09)
3. 食道扁平上皮癌患者血漿における癌抑制型 miRNA-655 の発現解析と抗がん核酸

治療への応用(英語) 木内 純(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本癌学会総会 76 回 (2017.09)

4. 胃癌患者血漿における癌抑制型 microRNA の発現解析と抗癌核酸治療への応用 今村 泰輔(京都府立医科大学附属病院 消化器外科), 小松 周平他 日本消化器外科学会総会 72 回 (2017.07)
5. 臨床応用を目指した消化器外科領域の基礎研究・橋渡し研究 食道扁平上皮癌患者における血中の癌抑制型 microRNA の発現解析と抗がん核酸治療への応用 木内 純(京都府立医科大学 医学部消化器外科学), 小松 周平他 日本消化器外科学会総会 72 回 (2017.07)
6. 血中癌抑制 miRNA を用いた食道癌の新たな抗がん剤感受性診断と核酸治療法の開発 木内 純(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本食道学会学術集会 71 回 (2017.06)
7. 食道扁平上皮癌患者血漿における癌抑制型 miRNA の発現解析と抗がん核酸治療への応用 木内 純(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本外科学会定期学術集会 117 回 (2017.04)
8. 胃癌患者血漿における癌抑制型 miR-148a の発現解析と抗がん核酸治療への応用(Depleted tumor suppressive miR-148a in plasma as a treatment target in gastric cancer)(英語) 小松 周平(京都府立医科大学 消化器外科)他 日本胃癌学会総会記事 89 回 (2017.03)
9. 胃癌患者血漿における癌抑制型 miRNA の発現解析と抗がん核酸治療への応用(英語) 小松 周平(京都府立医科大学 消化器外科)他 日本癌学会総会 75 回 (2016.10)
10. 膵癌患者血漿における癌抑制型 miRNA の発現解析と抗がん核酸治療への応用 今村 泰輔(京都府立医科大学附属病院 消

- 化器外科), 小松 周平他 日本消化器外科学会総会 71 回 (2016.07)
11. 外科における基礎的研究 セレンディピティーを求めて 肝機能に影響を受けない血中の新規肝細胞癌診断マーカー miR224 の同定 岡島 航(京都府立医科大学 附属病院 消化器外科), 小松 周平他 日本消化器外科学会総会 71 回 (2016.07)
 12. 膵腫瘍患者における血中 miR-223 を用いた新たな悪性度診断 木内 純(京都府立医科大学 附属病院 消化器外科), 小松 周平他 日本消化器外科学会総会 71 回 (2016.07)
 13. マイクロ RNA と消化器疾患 膵癌における癌抑制型 microRNA を指標とした新規バイオマーカーの開発と治療応用の可能性の検討 今村 泰輔(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本消化器病学会 (2016.09)
 14. 肝疾患バイオマーカーの新知見 背景肝に拠らない新たな肝疾患バイオマーカー Plasma miR-224 の新知見 岡島 航(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本消化器病学会大会 (2016.09)
 15. ゲノム研究が外科診療にもたらしたものの 血中遊離核酸を用いた Liquid Biopsy による消化器がんの新たな外科診療の可能性 小松 周平(京都府立医科大学 消化器外科) 他 日本外科学会定期学術集会 116 回 SY-15-4(2016.04)
 16. 膵腫瘍における血漿中 microRNA を用いた早期診断マーカーの開発 宮前 真人(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本外科学会定期学術集会 116 回 (2016.04)
 17. 肝胆膵外科治療におけるバイオマーカーの意義と展望 肝細胞癌における次世代型の新規血中バイオマーカー miR-224 の同定 岡島 航(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本外科学会定期学術集会 116 回 WS-2-2(2016.04)
 18. 膵癌患者血漿における癌抑制型 miRNA の発現解析と抗がん核酸治療への応用 今村 泰輔(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本外科学会定期学術集会 116 回 (2016.04)
 19. 消化器癌患者の血中遊離核酸を用いた Liquid Biopsy による新たな癌診療の可能性 小松 周平(京都府立医科大学 医学部消化器外科) 他 日本分子腫瘍マーカー研究会 36 回 (2016.09)
 20. 膵癌患者における血漿中 miR-744 濃度を指標とした癌存在診断・予後・抗がん剤感受性予測 宮前 真人(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本肝胆膵外科学会・学術集会 28 回 (2016.06)
 21. 膵癌患者血漿における癌抑制型 miRNA の発現解析と抗がん核酸治療への応用 (Down-regulation of plasma tumor suppressive miRNA contributes poor outcomes in pancreatic cancer)(英語) 今村 泰輔(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本肝胆膵外科学会・学術集会 28 回 (2016.06)
 22. 肝機能から独立した肝細胞癌における新規血漿バイオマーカー Micro RNA-224(Circulating microRNA profiles in plasma: identification of miR-224 as a novel diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function)(英語) 岡島 航(京都府立医科大学 消化器外科), 小松 周平他 日本肝胆膵外科学会・学術集会 28 回 (2016.06)
 23. 血球成分由来 exosome の癌形質への影響について 有田 智洋(京都府立医科大学 消化器外科), 市川 大輔, 小西 博貴, 小松 周平, 塩崎 敦, 大辻 英吾 日本

- 外科学会定期学術集会 115 回 (2015.04)
24. 基礎研究・移植再生 消化器癌患者の血中遊離 microRNA を用いた次世代型高感度バイオマーカーの網羅的探索 小松周平(京都府立医科大学 消化器外科), 他 日本外科学会定期学術集会 115 回 (2015.04)
25. 肝胆膵 肝癌患者血漿における microRNA を指標とした新規バイオマーカー探索 岡島 航(京都府立医科大学 消化器外科), 小松周平他 日本外科学会定期学術集会 115 回 (2015.04)
26. 肝胆膵 膵癌患者における血漿中 miR-744 濃度を指標とした癌存在診断・予後・抗がん剤感受性予測 宮前 真人(京都府立医科大学 消化器外科), 小松周平他 日本外科学会定期学術集会 115 回 (2015.04)
27. 肝細胞癌における新規血漿中バイオマーカー-micro RNA 224 の臨床的意義(英語) 岡島 航(京都府立医科大学 消化器外科), 小松周平他 日本癌学会総会 74 回 (2015.10)
28. 膵癌患者血中 microRNA の網羅解析により、患者血中で枯渇した癌抑制型 miR-107 は不良な予後に関連する(英語) 今村 泰輔, 小松周平他 日本癌学会総会 (2015.10)
29. 膵腫瘍患者の血中 miR-223 濃度を指標とした新たな悪性度診断(英語) 木内 純(京都府立医科大学 消化器外科), 小松周平, 市川 大輔他 日本癌学会総会 (2015.10)
30. 肝細胞癌における血漿中 micro RNA 224 の臨床的意義 岡島 航(京都府立医科大学 医学部消化器外科学), 小松周平他 日本消化器外科学会総会 70 回 (2015.07)

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
京都府立医科大学消化器外科
http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/dgstv-surg/information/research/research_b.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 周平 (Komatsu Shuhei)
京都府立医大学・医学研究科・特任講師
研究者番号：40578978

(2)研究分担者

市川 大輔 (Ichikawa Daisuke)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：20347446

大辻 英吾 (Otsuji Eigo)
京都府立医大学・医学研究科・教授
研究者番号：20244600

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

宮前 真人 (Miyamae Mahito)
京都府立医大学・医学研究科
岡島 航 (Okajima Wataru)
京都府立医大学・医学研究科
大橋 拓馬 (Ohashi Takuma)
京都府立医大学・医学研究科
今村 泰輔 (Imamura Taisuke)
京都府立医大学・医学研究科
木内 純 (Kiuchi Jun)
京都府立医大学・医学研究科
西別府 敬士 (Nishibeppu Keji)
京都府立医大学・医学研究科
谷口 弘毅 (Taniguchi Hiroki)
京都第二赤十字病院
藤堂 桃子 (Todo Momoko)
京都第二赤十字病院
近藤 裕 (Kondo Yutaka)
京都第二赤十字病院