

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19878

研究課題名(和文) 血清エクソソームmiRNAによるテーラーメイド食道癌術前化学放射線療法への挑戦

研究課題名(英文) Exploratory research for chemoresistance related microRNA expression in patients with esophageal squamous cell cancer

研究代表者

丹羽 由紀子 (NIWA, Yukiko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50746401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：・術前化学療法の奏効例4例と非奏効4例の治療前血清にmiRNAの網羅的解析を行い、miR-193b-5p、miR-873-3p、およびmiR-23a-5pの3つを本研究における治療効果予測バイオマーカーの候補とした。

・シスプラチン+フッ化ピリミジン製剤の二剤を術前化学療法として施行した食道癌患者血清111検体に対し、上記のマイクロRNA3種類に対するPCRを行った結果、miR-193b-5pおよびmiR-873-3pは、術前化学療法不応群において有意に高発現していた。治療前血液中にmiR-193b-5pもしくはmiR-873-3pが高発現している患者では術前化学療法が奏効しない可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Six pretherapeutic plasma samples of each three different chemotherapy-sensitive and chemotherapy-resistant ESCC patients were selected for the 3D-GENE microarray analysis. Twenty-eight miRNAs have been reported to be upregulated in plasma of chemotherapy-resistant ESCC patients. We chose miR-193b-5p, miR-873-3p and miR-23a-5p of them as candidates for therapeutic effect predictive markers in this study.

The levels of miR-193b-5p, miR-873-3p and miR-23a-5p were examined for 111 plasma samples in ESCC patients who received neoadjuvant chemotherapy with cisplatin/5-FU. MiR-193b-5p and miR-873-3p were significantly highly expressed in plasma of chemotherapy-resistant ESCC patients than those of chemotherapy-sensitive patients ($P = 0.044$, $P = 0.025$). Hence, patients with high expression of miR-193b-5p or miR-873-3p in plasma will become to resistant chemotherapy with cisplatin/5-FU as the first line of ESCC in Japan.

研究分野：消化器外科学

キーワード：マイクロRNA エクソソーム 食道癌L1 テーラーメイド治療 NACRT

1. 研究開始当初の背景

食道癌はいまだ予後不良であるが、術前化学療法などの集学的治療が積極的に導入され、治療成績向上に寄与している。本邦における食道癌術後5年生存率は50%を越すようになり、その理由の一つとしてこうした術前治療の効果があげられよう。しかし、これらの術前治療の奏効度は必ずしも一定ではなく、著効例を認める一方で、治療不応例や、術後早期再発例も存在する。このようにいわゆる“heterogeneity”に満ちた食道癌においては、テーラーメイド治療の確立を追求した効果予測バイオマーカーの同定と、それが術前化学療法の治療効果を修飾するメカニズムの解明が不可欠と考えられる(図1)。

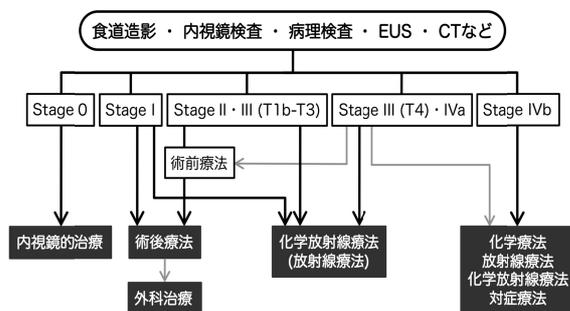


図1. 食道癌治療アルゴリズム

研究代表者らはこれまでに、食道癌における“tumor budding”という病理学的特徴に着目し、本現象が予後規定因子となり得ることを報告してきた(Koike M, Kodera Y. Ann Surg Oncol 2008)(Teramoto H, Koike M. J Surg Oncol 2013)。研究代表者らはこれらの研究を分子生物学的側面から見直し、近年、積極的に研究がなされている上皮間葉転換(Epithelial to mesenchymal transition; EMT)との相関について研究し、報告してきた(Niwa Y, Yamada S. J Surg Oncol 2014)。さらに、消化器癌領域において教室の臨床検体を活用し、EMTの臨床的意義に関する幾つかの報告もしてきた(Yamada S, Fuchs BC. Surgery 2013)(Murai T, Yamada S. J Surg Oncol 2014)(Yamada S, Fuchs BC. Ann Surg Oncol, 2013)(Mashita N, Yamada S. J Surg Oncol 2014)。

以上の研究成果より、予後不良な食道癌治療のさらなる治療成績向上のためには、癌の浸潤・転移、EMTの制御こそが不可欠である一方、“heterogeneity”に満ちた食道癌の中で、術前に癌の持つ性質、悪性度を予測することにより、テーラーメイド治療を提供することが可能であると着想するに至った。

2. 研究の目的

マイクロRNA(miRNA)とは約22塩基

からなるタンパク質にコードされない non-coding RNA であり、標的遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制するものである。現在、ヒトにおいては約2,000種のmiRNAが同定されており、これらのmiRNAがタンパク質をコードする遺伝子の約3分の1の発現を制御していると推定されている。miRNAの発現異常は癌を含む様々な疾患と関連することが報告され、疾病の診断や治療効果の判定、治療方法の選択などのバイオマーカーとして非常に期待されている。また、近年の分子生物学的技術の向上により、これまでのように腫瘍だけでなく、血液内に分泌される“エクソソーム”内のmiRNAの発現が正確に測定できるようになり、術前血液サンプルにおいて高感度にmiRNAが測定可能となったため、診断に活用できる可能性が高まっている(Mitchell PS, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2008)。

われわれの教室では多くの術前化学療法症例を蓄積しているため、術前血液サンプルから症例の選別、治療効果予測について、上記のmiRNA診断技術を利用した研究に発展させることを着想した(図2)。

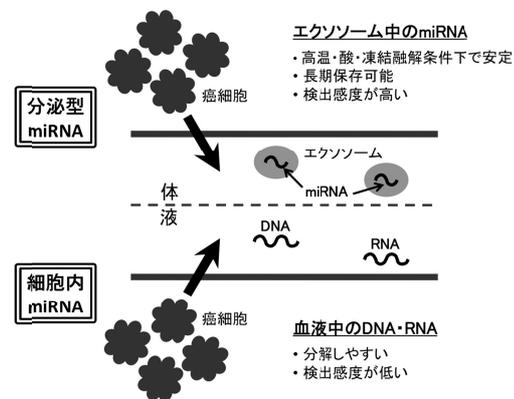


図2. 分泌型miRNAを利用した術前診断

食道癌治療において定着してきた術前化学療法ではあるものの、治療効果を予測し得るバイオマーカーはいまだ知られていない。本研究においては、国内でも有数の食道癌ハイボリュームセンターである当教室で蓄積してきた臨床検体(特に生検材料)、血液サンプルを用い、近年脚光を浴びている血清miRNA診断の手法を用い、術前化学療法の奏効例と非奏効例の治療前血液サンプルから網羅的なmiRNAの測定を行い、バイオマーカーとしての候補群をピックアップする。その後、教室の臨床検体、血液サンプルにおいてこれらの候補miRNA群の発現レベルを測定し、臨床データベースにおけるアウトカム等の情報との相関を解析、評価することにより、最も有望なバイオマーカーの同定を目指した。

本研究において期待される成果は、これまでに報告のない食道癌術前化学療法における効果予測バイオマーカーが、術前の血清中から同定されることである。血清検体

は幅広くスクリーニング可能である上に、非侵襲的、かつ、簡便に採取できる理想的な検体であると言える。従って、治療前に術前化学療法の奏効例と非奏効例を適切に選別し得る方法が提案されるため、食道癌患者の新たな集学的治療の選択基準となる可能性がある。例えば、術前化学療法の著効が期待される症例には本治療を導入し、一方、術前化学療法への抵抗性が予想される症例には術前化学療法を選択するなど、現在標準治療候補とされているいくつかの治療法のテーラード化が可能となる。

本研究結果に基づいた治療は、難治性癌の代表格である食道癌の治療におけるブレークスルーとなりうるが、血液サンプルからこれを実現し得るという観点からは独創的と言える。さらにまた、本研究はテーラード治療の提供のための診断的意義にとどまらず、同定された候補 miRNA の食道癌細胞における浸潤・転移メカニズムなどへの関与の解明により、新規分子標的治療へと応用できる可能性もある。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体における術前化学療法効果予測因子となる microRNA の選定

食道癌細胞株における NAC および NACRT (in vitro) 教室の食道癌細胞株を用い、抗腫瘍薬 (5-FU および CDDP) と放射線の単剤もしくは併用療法について、MTT assay による in vitro レベルでの解析を行い、本実験で、NACRT による感受性株と非感受性株を選定しておく。

当研究室が所有する食道癌治療前血液サンプルから術前化学療法 (シスプラチン + フッ化ピリミジン製剤) 施行患者のうち、組織学的奏効度判定を用い、治療効果が完全奏効もしくは著効した化学療法奏効例 4 検体および増悪を認めた化学療法不応例 4 検体の計 8 検体を、「高性能 DNA チップ基板 3D-Gene®」を用いマイクロ RNA の網羅的解析を行い、奏効例と非奏効例間に明確な発現量の差を認める候補 miRNA 群を抽出した。

(2) 選定 miRNA 群の発現解析

教室における食道癌症例のうち、142 例に術前療法を施行しており、これらの症例のうちシスプラチン + フッ化ピリミジン製剤の二剤を術前化学療法として施行した 111 検体に対し、(1) のマイクロ RNA 3 種類に対する定量 PCR 法を用い、食道癌取扱規約の化学療法治療効果の病理組織学判定基準を用い、著効群 (Grade2 および grade3) と不応群 (Grade0、Grade1a、および Grade1b) の二群における各マイクロ RNA の発現を t 検定を用いて解析し、候補群から最もバイオマーカーとして有力な

miRNA を同定した。

(3) 新規効果予測バイオマーカーの同定

次に、NACRT 完全奏効例、非奏効例および非施行例のそれぞれにおいて、NACRT 前、後、術後の血清を用い、同定した miRNA の発現分析を同様に行い、治療過程における血清中の発現変化を解析した。さらに、発現度と臨床病理学的因子、予後との相関を解析し、選定 miRNA の臨床的意義を検証した。上記過程により、食道癌に対する NACRT の新規効果予測バイオマーカーを同定した。

4. 研究成果

(1) 術前化学療法施行患者のうち、完全奏効例 4 検体および非奏効例 4 検体をマイクロ RNA で網羅的に解析し、奏効例と非奏効例間に明確な発現量の差を認める候補 miRNA 群を抽出した結果、変動遺伝子として、化学療法不応群と化学療法奏効群で差を認めさせていたマイクロ RNA の候補は以下の 27 種類であった。

miR-7641、miR-6895-5p、miR-873-3p、miR-1236-5p、miR-4638-5p、miR-4435、miR-6768-5p、miR-572、miR-3150b-5p、miR-4448、miR-193b-5p、miR-4459、miR-4648、miR-4443、miR-23a-5p、miR-1303、miR-7845-5p、miR-6820-5p、miR-4746-3p、miR-423-5p、miR-5739、miR-3185、miR-6798-5p、miR-4451、miR-6834-5p、miR-4486。

上記のうち、PCR を行うことができるための要件としてプライマーが市販されていること、また発現強度が比較的強いなどの条件を満たし、かつ他癌において薬剤耐性に関与している報告のある miR-193b-5p、miR-873-3p、miR-23a-5p の 3 つを本研究における治療効果予測バイオマーカーの候補とした。

(2) NACRT 前血清検体における 3 つの候補 miRNA 群の発現につき、定量 PCR 法によって個別に測定し、臨床データベースと照らし合わせ、候補群から最もバイオマーカーとして有力な miRNA を同定した結果、miR-23a-5p では発現において有意差を認められなかった ($P=0.507$) (図 3) が、miR-193b-5p および miR-873-3p は、不応群において有意に高発現していた (それぞれ $P=0.044$ 、 $P=0.025$) (図 4、5)。

(3) NACRT 完全奏効例、非奏効例および非施行例において、NACRT 前、後、術後の血清を用い、各 miRNA の発現分析を行い、治療過程における血清中の発現変化を解析した結果、治療前血液中に miR-193b-5p もしくは miR-873-3p が高発現している患者では本邦の食道癌治療の 1st line であるシ

スプラチン + 5-FU レジメンに対し治療抵抗性を示す可能性があると考えられた。

図3

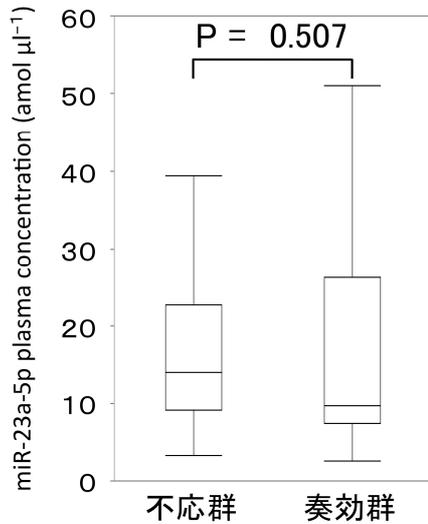


図4

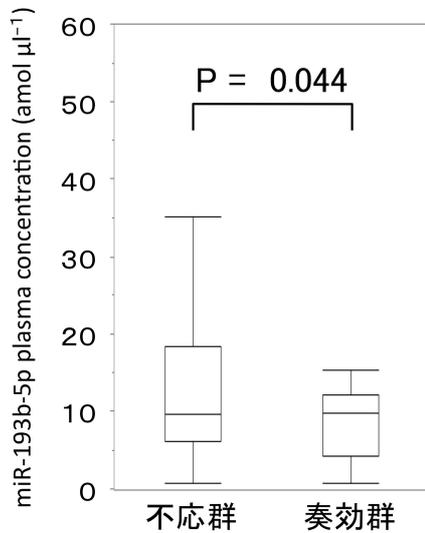
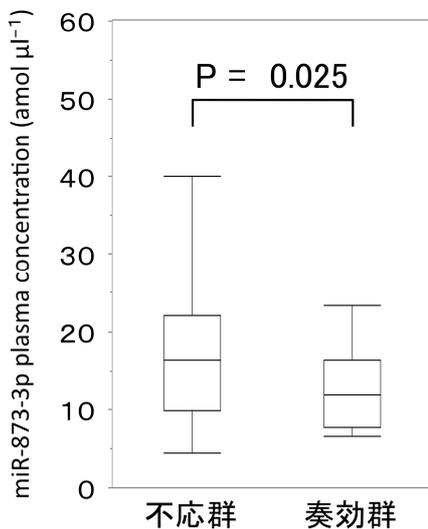


図5



以上の結果より、miR-193b-5p もしくは miR-873-3p は、食道癌の治療 strategy を個々に検討するテーラーメイド治療を実践する上で有用な効果予測バイオマーカーとなり得ると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

栗本景介, 林 真路, 小池聖彦, 神田光郎, 岩田直樹, 丹羽由紀子, 高見秀樹, 小林大介, 田中千恵, 山田 豪, 中山吾郎, 杉本博行, 藤原道隆, 藤井 努, 小寺泰弘. 食道癌における PAX5 遺伝子メチル化の意義とバイオマーカーとしての可能性. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016 年 4 月 16 日. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市北区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 由紀子 (NIWA, Yukiko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号: 5 0 7 4 6 4 0 1