

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05449

研究課題名(和文) 体液診断技術を応用した肉腫における新規バイオマーカーの開発と実用化への展開

研究課題名(英文) Identification of molecular targets for liquid biopsy in patients with bone and soft tissue sarcoma

研究代表者

尾崎 敏文(Ozaki, Toshifumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40294459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：血中の循環microRNAならびにexosome蛋白に着目し、骨軟部肉腫患者のモニタリングや治療奏功性を判断可能なバイオマーカーの開発を目指した。Ewing肉腫では、proteome解析からexosome表面蛋白を抽出し、細胞培養上清及び患者血清由来exosomeにおける発現を特定した。骨肉腫では、患者血清と細胞株を用いたmicroRNAの網羅的解析から、担癌状態および治療経過を反映する血清miR-25-3pを特定した。滑膜肉腫では、骨肉腫における手法を用いて血清miR-92-3pをリキッドバイオプシーの標的分子として特定し、その発現は治療経過を反映し、他の肉腫組織型との層別化を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部肉腫は、全身の骨や軟部組織から発生するまれな悪性腫瘍である。近年、患者体液を用いた体液診断技術が悪性腫瘍の新しい診療ツールとして開発されつつある。本研究では、骨軟部肉腫循環血中腫瘍由来exosomeや分泌型miRNAが特定され、治療経過や臨床病理学的な関連性が見出された。これらのマーカーが、化学療法抵抗性や転移の早期発見の新たな診断技術になれば、肉腫患者予後の改善に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lack of circulating biomarker is a crucial problem for bone and soft tissue sarcomas. To improve prognosis in patients, identification of sensitive circulating biomarkers is important, since current diagnostic modalities have limitations in monitoring tumor or drug sensitivity during/after treatments for bone and soft tissue sarcomas. In our study, we identified the circulating exosomal marker by proteomic analysis using Ewing sarcoma cell culture media and serum samples from Ewing sarcoma patients. In patients with osteosarcoma, we identified serum miR-25-3p as a circulating biomarker that is secreted from OS cells. Serum miR-25-3p levels reflected tumor response to chemotherapy and recurrence, and were significantly correlated with prognosis in patients. We also identified serum miR-92b-3p as a diagnostic target of liquid biopsy for synovial sarcoma. Overall, our data indicated promising diagnostic role of circulating miRNAs and exosomes for bone and soft tissue sarcomas.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：liquid biopsy 骨軟部肉腫 バイオマーカー エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、悪性腫瘍における liquid biopsy 技術の開発が世界的な注目を集めている。Liquid biopsy とは、腫瘍などの生体組織の一部を採取して行っていた生検と同等の性能かつ患者さんに負担の少ない検査を、血液や体液を用いて、主に分子遺伝学的な解析技術を組合わせて実現しようとするものである。本技術を基盤とした次世代のがんバイオマーカーとしての可能性が期待されている。腫瘍由来 exosome、血中循環 RNA および DNA、血中循環腫瘍細胞などの手法が試みられてきているが、近年、腫瘍由来 exosome および血中循環 miRNA を利用した方法が従来の方法よりも遙かに優れた感度・特異度を示すことが明らかにされた (Melo et al. Nature 2015, Schwarzenbach et al. Nature Reviews Clin. Oncol. 2014)。

(2) Exosome は、細胞内の小胞輸送を介して細胞外に放出される直径 30 ~ 100 nm ほどの細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV) の一種である。申請者らは、世界に先駆けてこの exosome を臨床に応用する試みを行い、exosome 自体の標識を可能とする技術を確認し、大腸がんにおける新規バイオマーカー技術を構築した (Yoshioka et al. Nature Communications 2014)。また、exosome の分泌を阻害することや (Kosaka et al. JBC 2010)、体液中 exosome を捕捉することで乳癌の遠隔転移を抑えることを見出した。さらに、これら一連の研究の中で、exosome に内包されている miRNA が重要な役割を担っていることを見出した。

(3) miRNA は、多段階の過程によって成熟し機能することが分かっており、この様々な段階における異常ががん発生と深く関与していることが明らかになっている。この課程において、がんにおいて発現亢進を示す miRNA (OncomiR) と発現低下を示す miRNA (Tumor-suppressor miRNA) が存在することが明らかになった。さらに近年、この miRNA が細胞外にも分泌されることが明らかにされ、新規バイオマーカーおよび新規治療標的としての可能性が注目されている。

(4) 希少がんである骨軟部肉腫では、診断が困難な症例も少なくない。これらの肉腫に対する新たな診断・治療の創出とその臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。

2. 研究の目的

本研究は、exosome および分泌型 miRNA の測定技術を応用し、未だバイオマーカーの乏しい肉腫診療における新たな診断・治療を実用化させるための基盤研究およびその臨床応用を行うものである。

3. 研究の方法

(1) Ewing 肉腫 (2) 骨肉腫 (3) 滑膜肉腫について検討を行った (図 1-3)。①患者血液中腫瘍由来 miRNA または exosome の特定、②患者血液中腫瘍由来分泌型 miRNA の特定、③特定した miRNA の治療標的としての検証、④特定した exosome および分泌型 miRNA と患者臨床病理学的関連性の解析である。

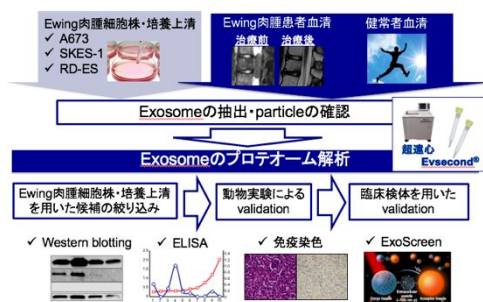


図 1 Ewing 肉腫の解析

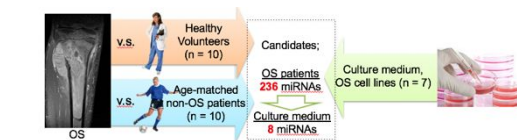


図 2 骨肉腫の解析

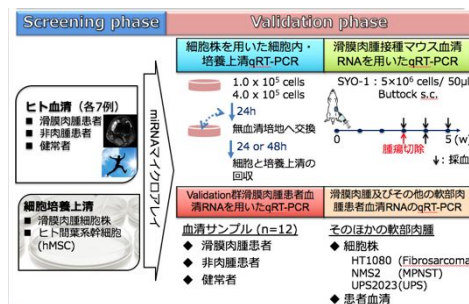


図 3 滑膜肉腫の解析

4. 研究成果

(1) Ewing 肉腫細胞株 3 種を用いて、プロテオーム解析により正常細胞で発現のない上位 15 種の候補遺伝子を選出した。次に western blot により cell lysate と exosome においてテトラスパニン蛋白と候補遺伝子の一つである CD99 の発現を確認した (図 4)。次に Ewing 肉腫担がんマウス血清由来 exosome における候補蛋白の発現を、EV-Second 法によって分離した exosome を用い、サンドイッチ ELISA により確認した (図 5)。同様の方法で Ewing 肉腫患者血清由来 exosome についても検討し、Ewing 肉腫に特徴的な CD99 が exosome 表面に存在することに加えて CD99 以外の候補蛋白 protein A を同定した。また、Ewing 肉腫担癌マウス血清由来 exosome における同定分子の発現を確認した (図 6)。さらに患者血清由来 exosome を用いて治療前後

での候補蛋白 proteinA の発現を確認したところ、治療後にその発現が有意に減少したことが明らかとなった(図7)。

図4

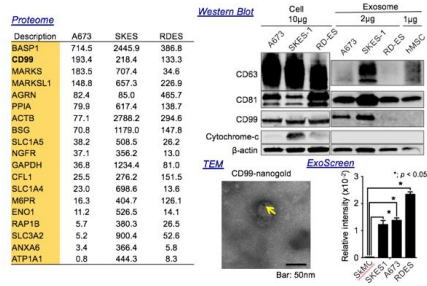


図5

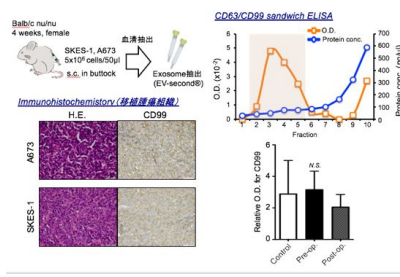


図4 Ewing 肉腫由来 exosome の proteome 解析と細胞株における CD99 発現
図5 Ewing 肉腫担がんマウス血清由来 exosome 中の CD99 発現

図6

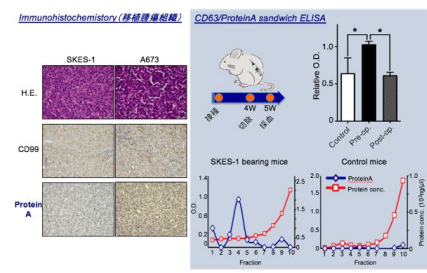


図7

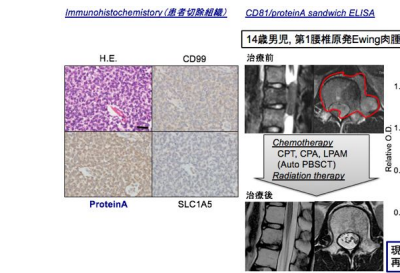


図6 Ewing 肉腫由来 exosome の候補蛋白の発現
図7 Ewing 肉腫患者血清 exosome の腫瘍モニタリング

(2) 骨肉腫患者および対照ヒト血清由来の miRNA および骨肉腫細胞株培養上清由来の miRNA を用いて網羅的解析を行い、患者群および骨肉腫細胞株で発現が高い miRNA として 8 種類の miRNA を選出した。そのうち、骨肉腫細胞株の培養上清内で細胞数および培養時間依存的に上昇する miRNA として miR-25-3p と miR-17-5p を特定した(図8)。独立したコホート群における骨肉腫患者と非骨肉腫患者および健康者由来血清における候補 miRNA の発現解析では、miR-25-3p はいずれの群よりも骨肉腫患者群で発現が高かった。ROC 曲線による解析では、AUC は ALP で 0.724 であったのに対し miR-25-3p では 0.868、miR-17-5p では 0.720 であり、miR-25-3p が既存のマーカーである ALP よりもより良い感度と特異度を示すことが明らかとなった(図9)。さらに、骨肉腫患者における治療経過に伴う腫瘍の状態を反映して血清中の miR-25-3p は変化した。この結果より、治療経過のモニタリングに使用できる可能性が示された(図10)。

図8

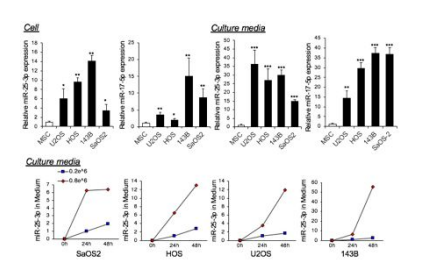


図9

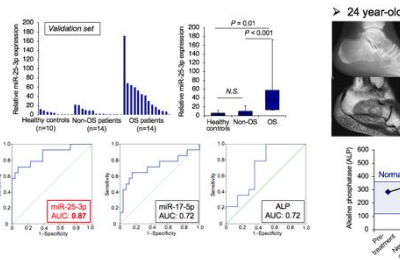


図10

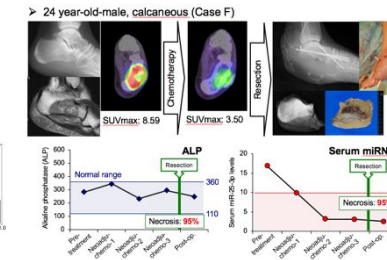


図8 骨肉腫細胞株の細胞内と培養上清中の miR-25-3p と miR-17-5p 発現の確認

図9 骨肉腫患者血清中 miR-25-3p の発現とマーカーとしての有効性の検討

図10 骨肉腫患者における血清 miR-25-3p を用いた腫瘍モニタリング

(3) 滑膜肉腫患者血清と滑膜肉腫細胞株上清を用いて miRNA の網羅的解析を行い、滑膜肉腫で高発現であった5つの miRNA を選出した(図11)。滑膜肉腫細胞株を用いた検討で、これらの中で miR-92b-3p が腫瘍細胞から分泌される miRNA であることを確認した(図12)。動物実験では、腫瘍増大および切除にしたがって血清中の miR-92b-3p が変化することが明らかとなった(図13)。更に独立したコホートのヒト血清を用いた検討では、健康者と比べて滑膜肉腫患者群で血清 miR-92b-3p の発現は有意に高値を示した。また、患者ごとの治療経過において血清中の miR-92b-3p の発現レベルは腫瘍動態を反映することが判明した。これらの結果から、血清 miR-92b-3p を用いた liquid biopsy により滑膜肉腫の臨床経過をモニタリングできる可能性が示唆された(図14)。

図 1 1

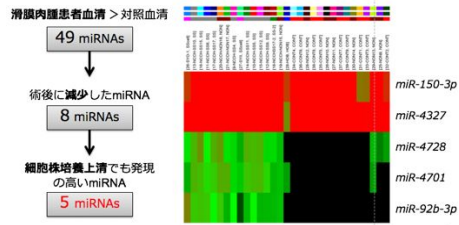


図 1 1 滑膜肉腫患者血清における miRNA の網羅的解析

図 1 2

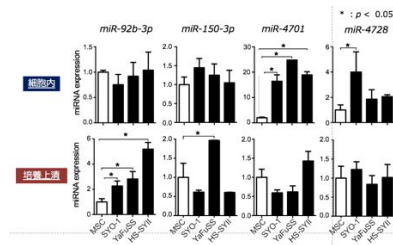


図 1 2 滑膜肉腫細胞株者における細胞内と培養上清の miR-92b-3p の発現

図 1 3

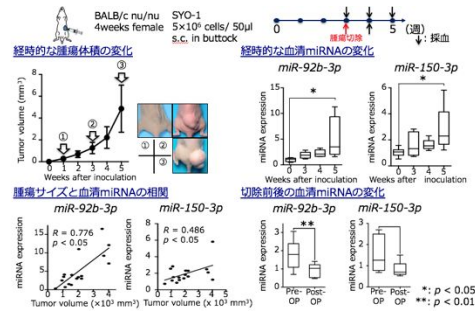


図 1 3 滑膜肉腫担がんマウス血清における miR-92b-3p の発現変化

図 1 4

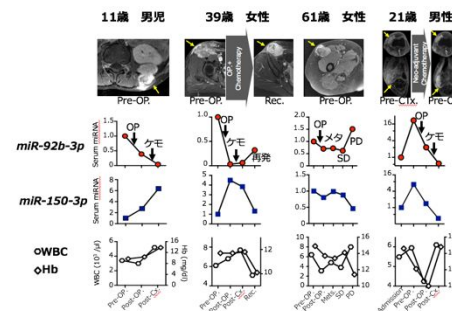


図 1 4 滑膜肉腫患者における血清 miR-92b-3p を用いた腫瘍モニタリング

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yoshida A, Fujiwara T, Uotani K, Morita T, Kiyono M, Yokoo S, Hasei J, Nakata E, Kunisada T, Ozaki T. Clinical and Functional Significance of Intracellular and Extracellular microRNA-25-3p in Osteosarcoma. Acta Med Okayama, 査読有, 2018, 72(2): 165-174, DOI:10.18926/AMO/55857.

Uotani K, Fujiwara T, Yoshida A, Iwata S, Morita T, Kiyono M, Yokoo S, Kunisada T, Takeda K, Hasei J, Numoto K, Nezu Y, Yonemoto T, Ishii T, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T. Circulating MicroRNA-92b-3p as a Novel Biomarker for Monitoring of Synovial Sarcoma. Scientific reports, 査読有, 7(1) 14634, 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-12660-5

Omori T, Fujiwara T, Kunisada T, Takeda K, Hasei J, Yoshida A, Yanai H, Ozaki T. A rare manifestation of extraskeletal myxoid chondrosarcoma with a huge expanding hematoma. J Orthop Sci, 査読有, 2017, DOI: 10.1016/j.jos.2016.12.011.

Fujiwara T, Uotani K, Yoshida A, Morita T, Nezu Y, Kobayashi E, Yoshida A, Uehara T, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Takeda K, Kunisada T, Kawamura M, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. Oncotarget, 査読有, 2017, 7, 33375-33392, DOI: 10.18632/oncotarget.16498.

Yamakawa Y, Tazawa H, Hasei J, Osaki S, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Uotani K, Fujiwara T, Yoshida A, Kunisada T, Urata Y, Kagawa S, Ozaki T, Fujiwara T. Role of zoledronic acid in oncolytic virotherapy: Promotion of antitumor effect and prevention of bone destruction. Cancer Sci, 査読有, 2017, 108, 1870-1880. DOI: 10.1111/cas.13316.

〔学会発表〕(計 11 件)

Yoshida A, Fujiwara T, Uotani K, Morita T, Kiyono M, Yokoo S, Hasei J, Nakata E, Kunisada T, Ozaki T, Clinical And Functional Significance Of Single Circulating And Cellular Microrna Dysregulation In Osteosarcoma, ORS 2019, 2019/2

Demiya K, Tazawa H, Kure M, Mochizuki Y, Hasei J, Kunisada T, Urata Y, Fujiwara T, Ozaki T, p53-armed Oncolytic Virotherapy Promotes Immunogenic Cell Death In Human Osteosarcoma, ORS 2019, 2019/2

Hasei J, Yoshida A, Nakata E, Kunisada T, Ozaki T, ABC Transporter Expressions In Doxorubicin Resistant Osteosarcoma Cell, And The Potential Prognosis Biomarkers And Therapeutic Targets For osteosarcoma Patients, ORS 2019, 2019/2

Kiyono M, Fujiwara T, Yoshida A, Mochizuki Y, Yokoo S, Demiya K, Hasei J, Nakata E, Kunisada T, Ozaki T, The Role Of Exosomes In Osteosarcoma Cell Migration, Invasion And Lung Metastasis, ORS 2019, 2019/2

Mochizuki Y, Tazawa H, Demiya K, Komatsubara T, Sugi K, Hasei J, Kunisada T, Urata Y, Ozaki T, Fujiwara T, Telomerase-specific oncolytic virotherapy promotes therapeutic efficacy of PD-1 blockade in murine osteosarcoma, AACR 2018, 2018/4

尾崎 敏文, 骨腫瘍の治療アップデート, 第 129 回中部日本整形外科学会災害外科学会・学術集会, 2017/10

尾崎 敏文, 癌と四肢機能再建, 第 1 回日本リハビリテーション医学会, 大阪, 2017/10

尾崎 敏文, Functional Reconstruction of Large Bone Defect after Tumor Excision, 第 14 回日独リウマチ外科研究会, 2017/8

清野 正普, 藤原 智洋, 魚谷 弘二, 吉田 晶, 森田 卓也, 杉生 和久, 小松原 将, 望月 雄介, 長谷井 嬢, 国定 俊之, 尾崎 敏文, 骨肉腫細胞内と分泌エクソソーム内における microRNA 発現プロファイリングの相違と患者循環エクソソーム内の発現評価, 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 2017/7

森田 卓也, 藤原 智洋, 魚谷 弘二, 吉田 晶, 清野 正普, 杉生 和久, 小松原 将, 望月 雄介, 長谷井 嬢, 国定 俊之, 尾崎 敏文, 悪性骨・軟部腫瘍転移制御への道 粘液線維肉腫における分泌型 microRNA は腫瘍の浸潤性と関連しているか, 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 2017/7

魚谷 弘二, 藤原 智洋, 吉田 晶, 岩田 慎太郎, 森田 卓也, 清野 正普, 長谷井 嬢, 国定 俊之, 吉岡 祐亮, 植田 幸嗣, 落谷 孝広, 尾崎 敏文, Ewing 肉腫における腫瘍由来 exosome を標的とした liquid biopsy 法の確立, 第 50 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 2017/7

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 藤原 智洋

ローマ字氏名: (FUJIWARA, Tomohiro)

所属研究機関名: 岡山大学

部局名: 医歯薬学総合研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80639211

研究分担者氏名: 魚谷 弘二

ローマ字氏名: (UOTANI, Koji)

所属研究機関名: 岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：30708087

研究分担者氏名：森田 卓也

ローマ字氏名：(MORITA, Takuya)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：10743007

研究分担者氏名：杉原 進介

ローマ字氏名：(SUGIHARA, Shinsuke)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構四国がんセンター（臨床研究センター）

部局名：その他部局等

職名：医長

研究者番号（8桁）：60314671

研究分担者氏名：清野 正普

ローマ字氏名：(KIYONO, Masahiro)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：60756097

研究分担者氏名：國定 俊之

ローマ字氏名：(KUNISADA, Toshiyuki)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80346428

研究分担者氏名：横尾 賢

ローマ字氏名：(YOKOO, Suguru)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：00781204

(2)研究協力者

研究協力者氏名：落谷 孝広

ローマ字氏名：(OCHIYA, Takahiro)

研究協力者氏名：吉岡 裕亮

ローマ字氏名：(YOSHIOKA, Yusuke)

研究協力者氏名：植田 幸嗣

ローマ字氏名：(UEDA, Koji)

研究協力者氏名：上原 健敬

ローマ字氏名：(UEHARA, Takenori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。