

令和元年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10035

研究課題名（和文）血清、髄液中microRNAを用いた横紋筋肉腫新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment strategy for rhabdomyosarcoma using serum and cerebrospinal fluid microRNA

研究代表者

宮地 充（Miyachi, Mitsuru）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40584983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：miR-206はmicroRNAという一本鎖RNAの一つである。本研究において、横紋筋肉腫症例の血清、髄液中のmiR-206を定量した。デジタルPCR法による測定結果は、リアルタイムPCR法による測定結果と相関関係を認めた。今後のリアルタイムPCR法とデジタルPCR法の両者の検討を合わせて、横紋筋肉腫において、血清中のmiR-206が多いほど予後が不良であるか、また、髄液中のmiR-206が検出されると後の中枢神経再発が多いかについて明らかとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、横紋筋肉腫において、血清microRNAの定量による治療層別化の実現可能性と、髄液microRNAの定量による傍髄膜症例の中枢神経浸潤危険群の同定の可能性が明らかとなる。また、microRNAの定量方法として、リアルタイムPCR法とデジタルPCR法のどちらが優れているか、あるいは予後を反映するかについての知見が明らかとなる。

研究成果の概要（英文）：miR-206 is one of single-stranded RNAs called microRNAs. In this study, miR-206 was quantified using serum and cerebrospinal fluid of rhabdomyosarcoma cases. The quantification results by the digital PCR method were correlated with the results by the real-time PCR method. In combination with future studies, correlation with serum miR-206 and prognosis and correlation with cerebrospinal fluid miR-206 and central nervous metastasis will be clarified.

研究分野：小児腫瘍学

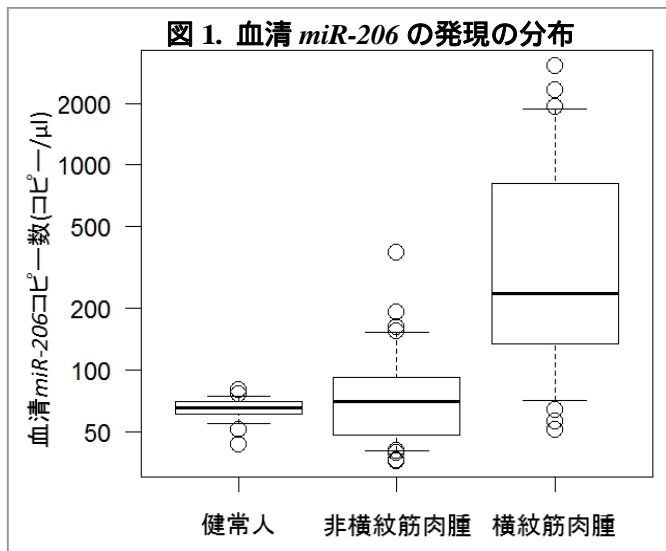
キーワード：横紋筋肉腫 microRNA liquid biopsy 血清 髄液

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

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫の予後の改善のためには、治療強化の必要のある再発の危険群を同定する新規の予後予測バイオマーカーが必要である。

近年、microRNA という non-coding RNA が発見され、血中で安定であるためにバイオマーカーとしての有用性が示されている。腫瘍においては、腫瘍特異的に発現している microRNA が腫瘍から分泌され、循環血中に移行し、これを定量することにより腫瘍マーカーとなることが報告されている (Mitchell PS, et al. PNAS. 2008)。我々は血清中の microRNA を定量し、横紋筋肉腫の診断に有用な血清腫瘍マーカーである *miR-206* を同定した (Miyachi M, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2010)。本マーカーは筋特異的 microRNA であり、筋原性の腫瘍で *miR-206* を高発現する横紋筋肉腫と、他の小児がんとの差異を利用したものである (図 1)。



検討を進める中で、我々は、限局例の横紋筋肉腫患者では血清中の *miR-206* の発現が低く、領域リンパ節転移例や遠隔転移例の横紋筋肉腫患者では血清中の *miR-206* の発現が高いことを明らかにした。そこで、血清 *miR-206* と予後との相関を後方視的に検討したところ、血清 *miR-206* コピー数高値の群では、低値の群に比較して予後が不良であることを明らかにした。

また、傍髄膜原発横紋筋肉腫症例の 10-20% は中枢神経再発をきたし、中枢神経再発例を救命しえた報告はいまだない。すなわち、傍髄膜原発症例において、初発時に中枢神経再発をきたす群を同

定し、治療強化を行うことで予後の改善が期待される。そこで、我々は、基礎検討として、傍髄膜原発例の中枢神経再発時に髄液の *miR-206* を定量し、高発現していることを明らかにした (Miyachi M, et al. 43rd Congress of the International Society of Pediatric Oncology. 2011)。

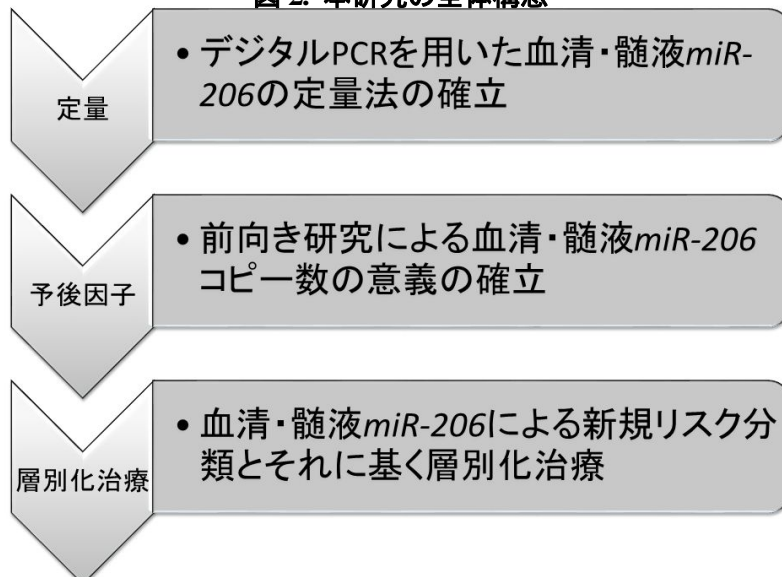
2. 研究の目的

我々は筋特異的に発現する microRNA である *miR-206* を用いた横紋筋肉腫の新規血清、髄液診断法を開発した。これは、腫瘍に発現している microRNA が、腫瘍から分泌され、血液、髄液に移行することを利用したものである。日本横紋筋肉腫研究グループ (JRSG) では、平成 28 年以降に開始される全リスク群の次期臨床試験において、血清、髄液中の *miR-206* を測定し、血清 *miR-206* の発現 (診断時、治療に伴う変化) と予後の相関、髄液 *miR-206* の発現 (傍髄膜原発例の診断時) と中枢神経再発頻度の相関、に関する解析を行う。本研究では、現在のリスク分類に血清・髄液 *miR-206* の発現を加えることの意義を明らかにし、血清・髄液

miR-206 の発現に基づいた横紋筋肉腫の新規治療戦略の構築を行うことを目的とする (図 2)。

本検討では従来のリアルタイム PCR 法による定量以外に、デジタル PCR 法による定量法も合わせて実施する。デジタル PCR 法は核酸の絶対定量に優れた PCR 法であり、特に低コピー数の核酸の検出に有用である。血清・髄液中の microRNA の定量をデジタル PCR にて行う方法を確立する。

図 2. 本研究の全体構想



3. 研究の方法

デジタル PCR を用いた血清・髄液 miR-206 定量の基礎検討

・リアルタイム PCR 法による定量

血清・髄液 200 μ l より、mirVanaPARIS kit を用いて total RNA を抽出し、TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit により逆転写反応を行い、cDNA 合成を行う。さらに、この cDNA を Taqman[®] microRNA assay、Applied Biosystems[®] の 7500 fast リアルタイム PCR システムを用いて、血清・髄液 1 μ l 当たりの RNA コピー数を定量する。定量は、RNA コピー数が既知である標準溶液を用いた検量線により、絶対定量を行う。

・デジタル PCR 法による定量

cDNA 合成までは上記のリアルタイム PCR 法と同様に実施する。この cDNA を Taqman[®] microRNA assay、QuantStudio[™] 3D デジタル PCR システムを用いて、PCR 反応液 1 μ l 当たりの cDNA コピー数を定量する。

前向き研究のための検体の収集、定量

前向き研究のための血清、髄液検体を収集し、リアルタイム PCR 法、デジタル PCR 法にて定量する。

血清・髄液 miR-206 発現と予後との相関

定量結果について、血清については無イベント生存との相関を、髄液については後の中枢神経再発との相関を検討する。

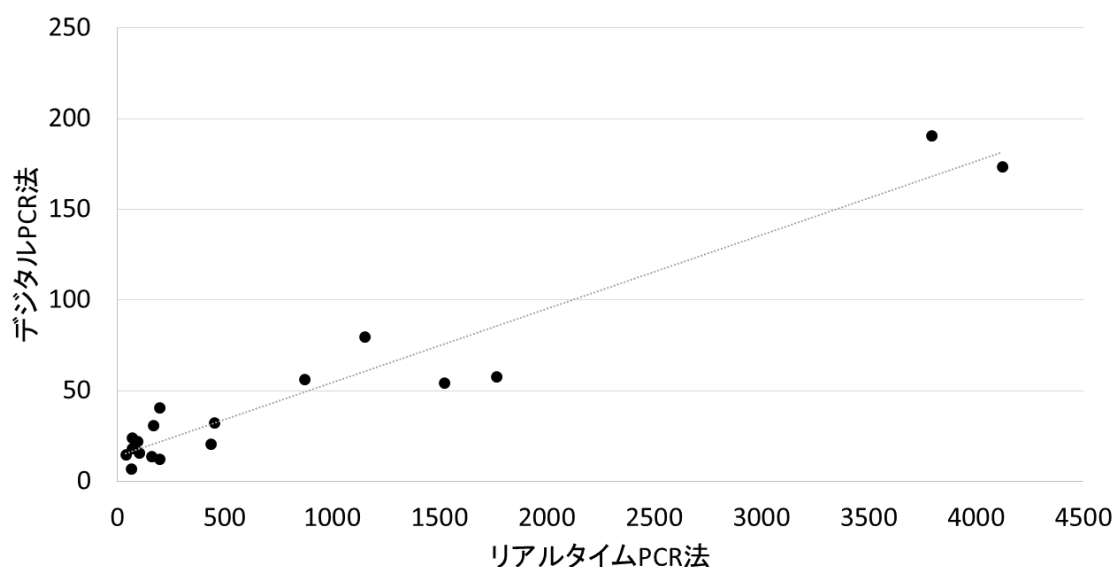
4. 研究成果

デジタル PCR を用いた血清・髄液 miR-206 定量の基礎検討

デジタル PCR の検討では cDNA レベルでのコピー数、リアルタイム PCR を用いた検討では RNA レベルのコピー数が算出されるため、数値が異なるという問題が生じた。そのため、RNA コピー数が既知の標準溶液を用いて、デジタル PCR 法によりコピー数を定量したところ、10000、2500、625、156 コピー/ μ l 血清の標準溶液に対して、506.76、125.77、27.188、5.764 コピー/ μ l PCR 反応液という結果であり、相関係数は 0.999 と相関を認めた。

次に、血清・髄液 18 検体について、リアルタイム PCR 法、デジタル PCR 法の両方で測定を行った。デジタル PCR 法での cDNA コピー数とリアルタイム PCR 法での RNA コピー数の間の相関係数は、0.966 と相関関係を認めた (図 3)。

図3. デジタルPCR法とリアルタイムPCR法のコピー数



デジタル PCR 法による測定は、リアルタイム PCR 法による測定と一定の相関関係を認めており、デジタル PCR 法による定量法が確立されたと考える。

前向き研究のための検体の収集、定量

研究期間内に、下記の四つの JRS-II 研究が実施され、37 例の登録があった。

・低リスク A 群 横紋筋肉腫低リスク A 群患者に対する VAC1.2 (ビンクリスチン、アクチノマイシン D、シクロホスファミド 1.2 g/m²) / VA 療法の有効性及び安全性の評価 第 II 相臨床試験

・低リスク B 群 横紋筋肉腫低リスク B 群患者に対する VAC1.2/VI (ビンクリスチン、イリノテカン) 療法の有効性及び安全性の評価 第 II 相臨床試験

・中間リスク群 横紋筋肉腫中間リスク群患者に対する VAC2.2 (ビンクリスチン、アクチノマイシン D、シクロホスファミド 2.2 g/m²) /VI 療法の有効性及び安全性の評価 第 II 相臨床試験

・高リスク群 横紋筋肉腫高リスク群患者に対する VI (ビンクリスチン、イリノテカン) / VPC (ビンクリスチン、ピラルピシン、シクロホスファミド) / IE (イホスファミド、エトポシド) / VAC (ビンクリスチン、アクチノマイシン D、シクロホスファミド) 療法の有効性及び安全性の評価 第 II 相臨床試験

低リスク A 群で 3 症例、8 検体、低リスク B 群で 2 症例、7 検体、中間リスク群で 2 症例 7 検体、高リスク群で 14 症例 40 検体の収集、定量を行った。定量結果に関しては、全症例の観察期間終了後に解析を行い公表する予定である。

血清・髄液 miR-206 発現と予後との相関

全症例の観察期間終了後に、予後との相関について解析を行い公表する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

宮地 充、細井 創. 日米欧における横紋筋肉腫のトランスレーショナルリサーチ ~小児がん治療医の視点から. 京都府立医科大学雑誌 128, 115-126, 2019. 査読なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 細井 創

ローマ字氏名: Hajime Hosoi

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20238744

研究分担者氏名: 家原 知子

ローマ字氏名: Tomoko Iehara

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 20285266

研究分担者氏名: 土屋 邦彦

ローマ字氏名: Kunihiko Tsuchiya

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 90381938

研究分担者氏名：菊地 顕
ローマ字氏名：Ken Kikuchi
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：大学院医学研究科
職名：特任助教
研究者番号(8桁)：40453104

研究分担者氏名：柳生 茂希
ローマ字氏名：Shigeki Yagyū
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：10572547

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。