

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10573

研究課題名(和文) 血漿マイクロRNAを用いた大腸癌肝転移Precision Medicineの構築

研究課題名(英文) Detection of Circulating MicroRNAs with Ago2 Complexes to Monitor the Tumor Dynamics of Colorectal Liver Metastasis Patients during Chemotherapy

研究代表者

榎田 祐三 (Umeda, Yuzo)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10573735

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)：血漿中の循環miRNAはArgonaute2蛋白質に結合したAgo2-miRNAと細胞外小胞体に含有されるEV-miRNAの形態で存在し、我々は血漿からAgo2-miRNAを分離測定する技術を構築した。大腸癌原発巣・肝転移巣においてmiR-21/-200cが発現していた。Ago2-miR-21を能動的放出と細胞溶解、Ago2-miR-200cを細胞溶解のバイオマーカーとして、健常人と大腸癌肝転移患者の血漿を用いて評価した。Ago2-miR-21発現量より大腸癌の存在診断が可能で、化学療法中のAgo2-miR-21/-200cの推移から治療に対する腫瘍応答を予測できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、循環Ago2-miRNAを対象としたLiquid Biopsyによる非侵襲的かつ簡便に遺伝子変異情報を把握する新しい臨床検査法が確立され、癌スクリーニングや進行癌におけるダイナミックな腫瘍病勢のモニタリングが可能となった。

本研究手法によって、精緻な個別化医療が叶えば、今後の本邦の大腸癌治療成績を飛躍的に発展させるだけでなく、無用な補助療法を回避する等、患者側面のみならず診療費削減といったCost benefitにも十分に寄与し得る。また同手法は、他の肝癌に対する肝移植や他の消化器悪性疾患の外科治療にも応用できる可能性があり、本臨床医学研究の意義は極めて深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined Two different forms of circulating miRNAs in plasma: Argonaute2 (Ago2)-miRNAs and extracellular vesicles (EVmiRNAs). Ago2-miR-21 could be released into the extracellular fluid by active export from viable cancer cells and cytolysis in vitro. As miR-21 and miR-200c were expressed in both liver metastasis and primary lesions, we evaluated Ago2-miR-21 as a candidate biomarker of both active export and cytolysis while Ago2-miR-200c as a biomarker of cytolysis in a series of plasma obtained from colorectal cancer (CRC) patients with liver metastasis who received systemic chemotherapy. Ago2-miR-21 allowed us to distinguish CRC from subjects without CRC. The trend in Ct values for Ago2-miR-21 and miR-200c during chemotherapy could predict tumor response to ongoing treatment. Thus, capturing circulating Ago2-miRNAs from active export can screen patients with tumor burdens, while capturing them from passive release by cytolysis can monitor tumor dynamics during chemotherapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：Precision medicine 大腸癌肝転移 Liquid Biopsy マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の治療予後の向上には、進行大腸癌が高率に転移を来す肝転移の治療成績向上が鍵を握っている。我々は、大腸癌は Genetic/Epigenetic 変異情報に基づいた腫瘍悪性度の分類が可能であることを証明し、これら遺伝子変異情報を治療戦略に応用することを提唱してきた。しかしながら、この基盤となる体細胞変異は原発巣のみの解析であり、転移巣や化学療法施行中における獲得変異などの継時的な新規体細胞変異情報または Epigenetic 変異を考慮することが不可能である。更に精緻な個別化医療の実現のために、より簡便に遺伝子変異情報を把握し、腫瘍病勢といった“時間軸”の概念をも踏まえた新規治療戦略を構築する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、循環 miRNA を用いた Liquid Biopsy により、非侵襲的かつ簡便な遺伝子変異情報の把握と腫瘍病勢評価を可能とする診断法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Genetic/Epigenetic 解析：既に確立した解析システムを基に、原発巣・肝転移巣を対象に解析を行い、約 300 例の遺伝子変異情報に関する遺伝子データバンクを作成する。
- (2) miRNA を対象とした Liquid Biopsy：大腸癌肝転移症例の術前・術後経過において末梢血を経時的に採血し、miRNA を抽出し、EVs-miRNA/AGO2-miRNA の推移と臨床転帰を踏まえ解析する。

4. 研究成果

- (1) 大腸癌原発巣・肝転移サンプル解析、および Genetic/Epigenetic 解析：これまで岡山大学病院 消化管外科・肝胆膵外科にて手術された進行大腸癌・転移性肝癌の切除標本より抽出した DNA サンプルの Genetic/Epigenetic 解析を行った。
- (2) 循環 miRNA の産生形態を証明するための実験アッセイ確立：ヒト大腸がん細胞株 HT29 を用いた実験で、Ago2-miR-21 が癌細胞からの能動的な放出のみならず抗癌剤投与による細胞死に伴って細胞外に放出されることを実証した。EVs に内包される miRNA は Ago2-miR-21 よりも微量であり、また能動的な EV-miR-31/200c の放出は認められなかった。さらに大腸癌患者の血漿サンプルより Ago2-miRNA を回収し、miRNA PCR アレイ/マイクロアレイを用いて包括的発現を評価した。
- (3) Liquid biopsy:大腸癌原発巣および肝転移の両切除標本において miR-21 と miR-200c が豊富に発現していたことから Ago2-miR-21、Ago2-miR-200c を測定した。その結果、Ago2-miR-21 は原発および転移部位の両方で高度に発現され、能動的放出と受動的放出が行われているのに対して、Ago2-miR-200c は原発巣よりも転移部位に発現が高く主に細胞溶解により放出されていた。また miR-451 が Ago2 複合体と結合して血漿中で安定して発現する miRNA であることも示されたことから、循環 miRNA 発現を正規化する方法として Ago2-miR-451 を Ago2-miRNA の内部対照として選択した。これらをバイオマーカー候補として、全身化学療法を受けた肝転移を有する大腸癌患者の治療前ならびに治療中の血液を用いて評価した。血漿 Ago2-miR-21 発現量は、大腸癌を有する患者と有さない患者を区別することが可能であり、化学療法中の血漿 Ago2-miR-21 および miR-200c の発現量の推移は治療に対する腫瘍応答を予測する可能性が示唆された。能動的に放出される循環 Ago2-miRNA を測定することは腫瘍を有する患者をスクリーニングすることができ、細胞溶解により受動的に放出される Ago2-miRNA を測定することは化学療法中の腫瘍動態・病勢を精緻に監視できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 32 件)

主要論文を抜粋

Fuji T, Umeda Y, Fujiwara T, Nagasaka T, et al (2/11). Detection of circulating microRNAs with Ago2 complexes to monitor the tumor dynamics of colorectal cancer patients during chemotherapy.

Int J Cancer. 2019 May 1;144(9):2169-2180. doi: 10.1002/ijc.31960. (査読あり)

Takeda S, Umeda Y, Nagasaka T, Fujiwara T, Goel A, et al (8/16). Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer.

Cancer Lett. 2019 Mar 1;444:127-135. doi: 10.1016/j.canlet.2018.12.009. (査読あり)

Saragai Y, Umeda Y, Fujiwara T, et al (3/24). A subclinical high tricuspid regurgitation pressure gradient independent of the mean pulmonary artery pressure is a risk factor for the survival after living donor liver transplantation.
BMC Gastroenterol. 2018 May 15;18(1):62. doi: 10.1186/s12876-018-0793-z. (査読あり)
 Mori Y, Umeda Y, Fujiwara T, Nagasaka T, et al (14/17). Clinical outcomes of women with ovarian metastases of colorectal cancer treated with oophorectomy with respect to their somatic mutation profiles.
Oncotarget. 2018 27;9(23):16477-16488. doi: 10.18632/oncotarget.24735. (査読あり)
 Morikawa T, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (7/10). BRAF V600E mutation is a predictive indicator of upfront chemotherapy for stage IV colorectal cancer.
Oncology Letters. 2018 Feb;15(2):2195-2201. doi: 10.3892/ol.2017.7553. (査読あり)
 Inada R, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (8/9). Comparison of outcomes between symptomatic and asymptomatic patients with colorectal cancer: a propensity score-matched analysis of surgical invasiveness, medical costs and oncological outcomes.
BMJ Open Gastroenterol. 2017 3;4(1):e000146. doi: 10.1136/bmjgast-2017-000146. (査読あり)
 Onishi T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (10/14). Tumor-specific delivery of biologics by a novel T-cell line HOZOT.
Scientific Report. 2016 Nov 30;6:38060. doi: 10.1038/srep38060. (査読あり)
 Yoshida K, Nagasaka T, Umeda Y, Yagi T, Fujiwara T, et al (3/13). Expansion of epigenetic alterations in EFEMP1 promoter predicts malignant formation in pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms.
J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Jul;142(7):1557-69. doi: 10.1007/s00432-016-2164-x. (査読あり)

[学会発表](計 47 件)

主要学会発表を抜粋

Toshima T, Umeda Y, Fujiwara T, Nagasaka T, et al (3/8). Liquid Biopsy has a potential to predict the colorectal cancer patients with destiny for recurrence after curative surgery.
ESMO Asia 2018, Singapore, 2018
 Yoshida K, Umeda Y, Fujiwara T, Yagi T, et al (2/9). De novo Malignancies after Liver Transplantation and a proposal for establishment of cancer screening.
Asian Transplantation Week 2018, Busan, Korea, 2018 (Travel grant)
 吉田一博, 榎田祐三, 八木孝仁, 藤原俊義, 他(3/12). 大腸癌における新規 oncogenic small nucleolar RNA (oncSNOR) の探求.
第 29 回 日本消化器癌発生学会総会, 2018
榎田祐三, 八木孝仁, 藤原俊義, 他(1/10). 大腸癌多発肝転移に対する治療戦略 -遺伝子変異解析を踏まえた術前化学療法の適応選別-
第 73 回 日本消化器外科学会総会 2018
 Yasui K, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (9/12). Gene expression profiles in BRAF V600E mutant colorectal cancer and association with SFRP2 methylation status.
AACR Annual Meeting 2017, Washington, D.C. 2017
榎田祐三, 永坂岳司, 八木孝仁, 藤原俊義, 他(1/11). 遺伝子変異情報に基づいた大腸癌肝転移の治療戦略—原発巣の左右局在と RAS/RAF 変異の意義—
第 117 回 日本外科学会定期学術集会, 横浜, 2017
 Mori Y, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al(10/11). Ovarian metastasectomy in colorectal cancer may improve the clinical outcomes of patients with metastatic colorectal cancer regardless of BRAF or KRAS mutational profiles.
ESMO Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Spain 2017
榎田祐三, 八木孝仁, 永坂岳司, 藤原俊義, 他(1/10). 大腸癌多発肝転移における RAS/RAF 変異の意義 ~ 生物学的悪性度から術前化学療法適応を見極める ~
第 72 回 日本消化器外科学会総会, 2017
 Yasui K, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (11/13). Gene expression signatures in BRAF V600E mutant colorectal cancer in relation to WNT signaling cascade.
ESMO 2017 Congress, Madrid, 2017
Nagasaka T, Umeda Y, Yagi T, Fujiwara T, et al (10/13). Heterogeneity of epigenetic and EMT marks observed in hepatocellular carcinoma with keratin 19 proficiency.
ESMO 2017 Congress, Madrid, 2017
 Toshima T, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (10/12). A novel circulating cell free DNA-based assay can predict tumor response to systematic chemotherapy.

ESMO 2017 Congress, Madrid, 2017

Fushimi T, Umeda Y, Fujiwara T, Yagi T, et al (2/10). Prediction of salvage liver transplantation for hepatocellular carcinoma recurrence.

Asian Transplantation Week 2017, Incheon, 2017 (Travel Grant, Best abstract Gold)

Mori Y, Nagasaka T, Umeda Y, Fujiwara T, et al (4/8). MGMT Inactivation Arrest Tumor Growth and Serves As a Promising Predictive Biomarker for Treatment Response in Colorectal Cancer.

Digestive Disease Week (DDW), San Diego, 2016

〔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 俊義

ローマ字氏名：FUJIWARA Toshiyoshi

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：00304303

研究分担者氏名：八木 孝仁

ローマ字氏名：YAGI Takahito

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：教授

研究者番号(8桁)：00304353

研究分担者氏名：永坂 岳司

ローマ字氏名：NAGASAKA Takeshi

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30452569

(2)研究協力者

研究協力者氏名：藤 智和

ローマ字氏名：FUJI Tomokazu

研究協力者氏名：母里 淑子

ローマ字氏名：MORI Yoshiko

研究協力者氏名：安井 和也

ローマ字氏名：YASUI Kazuya

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。