

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10590

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌におけるエクソソーム解析を用いた化学放射線療法耐性メカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanism of chemoradiotherapy resistance in esophageal squamous cell carcinoma using exosome analysis

研究代表者

古川 高意 (Furukawa, Takaoki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・専門研究員

研究者番号：00736530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：当院で治療を行った食道扁平上皮癌患者(ESCC)と健常者(HC)より採取した血清のmiR/isomiRの発現を次世代シーケンサーにて調査した。これらの症例を2群に分け、90%以上で検出可能、平均リード数が有意に2倍以上異なるものを診断バイオマーカーと定義し、両群間で再現性を確認した。その結果、多変量線形回帰解析にて1つの成熟したmiR(X)と2つのisomiR(Y, Z)が選択された。これらを用いた診断パネルによるインデックスはHCに比べてESCC症例にて有意に高値で、食道腺癌や高度異型性の症例でESCC群と比較して有意に低値であった。(miR/isomiRの名称は匿名としている。)

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーにより選択した1つの成熟miRNAと2つのisomiRを用いた診断パネルインデックスは食道扁平上皮癌の診断に高い精度を持ち、食道扁平上皮癌にて食道腺癌や高度異型性症例より有意に高値であることから、新しいバイオマーカーとして機能すると考えられる。これらを用いた食道扁平上皮癌術前化学放射線療法施行群での治療効果との関連の検証などへの発展が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：The expression of miR/isomiR in sera collected from esophageal squamous cell carcinoma patients (ESCC) and healthy control (HC) treated at our hospital was investigated by next-generation sequencing. These cases were divided into two groups, and diagnostic biomarkers were defined as those that were detectable in more than 90% of cases and that differed more than two-fold in the mean number of reads in predominance, and reproducibility between the two groups was confirmed. As a result, one mature miR(X) and two isomiRs(Y and Z) were selected in multivariate linear regression analysis. These diagnostic panel indices were significantly higher in ESCC cases than in HC and significantly lower in esophageal adenocarcinoma and highly atypical cases than in the ESCC group. (At present, the name of miR / isomiR are anonymous.)

研究分野：消化器外科学

キーワード：マイクロRNA IsomiR 食道扁平上皮癌 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道扁平上皮癌における治療抵抗性とエクソソームの関与

進行食道扁平上皮癌に対しては、術前化学療法・化学放射線療法後に手術が行われるが術前治療抵抗群では術後早期に再発をきたすことも多く、食道癌治療成績の向上には、化学療法・放射線療法耐性の克服が不可欠である。エクソソームとは、細胞膜の一部がエンドサイトーシスによって内在化し、エンドソームとの融合によって多胞性エンドソームへ成熟する際に形成される直径約 100nm の小胞体で、エンドサイトーシスによって細胞外に放出される。腫瘍細胞や免疫細胞から放出され、内部に広範囲の機能性タンパク質や mRNA、microRNA (miRNA) を含んでおり、細胞間のコミュニケーションツールとしての機能が注目されている。近年、エクソソームによる腫瘍を取り巻く微小環境の調節が、化学放射線療法耐性に重要な役割を果たすとの報告はあるが、食道癌治療抵抗性におけるエクソソームの働きは未解明な点が多い。

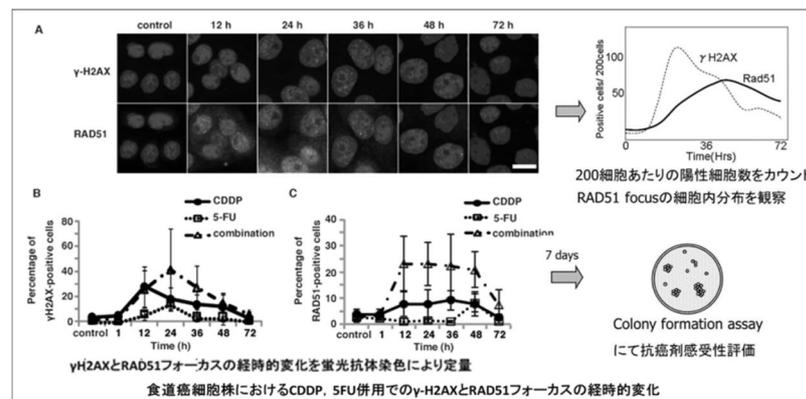
(2) 低酸素環境下でのエクソソームと腫瘍内血管新生

我々は非小細胞肺癌において、低酸素環境下に誘導される HIF1 (hypoxia inducible factor-1) や GLUT1 (glucose transporter-1) の発現が腫瘍の悪性度、予後に深く関与することを示した。同様に腫瘍は低酸素ストレスに適応するため、VEGF (vascular endothelial growth factor) シグナル経路による血管新生の促進を行う。VEGF に対しては分子標的療法が開発されているが、臨床上劇的な抗腫瘍効果は認められていないのが現状である。一方、エクソソームの放出は癌を取り巻く微小環境、その中でも中心的な要素となる低酸素環境下で増強されることが報告されている。また、乳癌や白血病ではエクソソーム中の miR-210 が腫瘍内血管新生に関与していることが示されている。食道扁平上皮癌において、低酸素環境下にて放出されるエクソソームの知見は乏しい。

(3) 細胞老化と DNA 修復機構の変化に伴う治療感受性

化学療法や放射線療法の治療原理は DNA 損傷によりアポトーシスを誘導させることであるが、DNA 損傷は様々な機構により修復され、治療抵抗性を示す。2 本鎖 DNA 切断の相同組換え修復機構 (homologous recombination repair; HR) において、その中心的役割を担っているのが RAD51 である。HR では、DNA 損傷部位近傍のヒストン H2AX がリン酸化され (γ -H2AX), そこに RAD51 などのゲノム修復タンパク質が核内フォーカスを形成し、損傷を修復する。RAD51 の発現亢進は種々の癌で認められ、抗癌剤に対する耐性や放射線治療に対する感受性低下と関連する。我々は、DSB の指標の γ -H2AX と、HR の中心的役割を担う RAD51 の量的・経時的変化を評価することで、DNA 損傷・修復機構がいかに抗癌剤感受性に関与しているかを解明してきた。

最近の研究では、細胞分裂を繰り返した老化細胞では、 γ -H2AX フォーカス形成が不完全で 2 本鎖 DNA 切断の修復能力が低下することが示唆されている。このような老化に伴う DNA 損傷修復機能の低下は、化学療法、放射線療法への感受性が年齢によって異なる可能性を示唆しており、細胞老化と DNA 損傷修復機能の関与の解明が最適な治療方針決定に繋がる可能性がある。食道扁平上皮癌における細胞老化に伴う DNA 損傷修復機能の変化と化学療法、放射線療法感受性への影響については解明されていない。



2. 研究の目的

化学放射線療法耐性に関与するエクソソーム内包 miRNA を、網羅的発現解析により明らかにすることである。治療耐性メカニズムを、低酸素環境下での腫瘍内血管新生、細胞老化と DNA 修復機構の観点から、それぞれに関与する候補 miRNA を次世代シーケンサーによる網羅的解析により同定し、術前化学放射線療法後に手術を施行した食道扁平上皮癌患者の血液サンプルで治療効果との相関を検証する。さらに候補 miRNA を標的とした食道扁平上皮癌に対する最適な新規治療戦略を探究する。

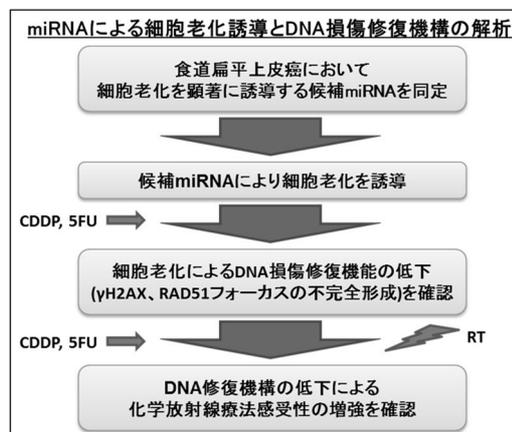
3. 研究の方法

(1) 低酸素環境下での miRNA による腫瘍内血管新生と治療抵抗性

- ・低酸素環境下にて食道癌細胞株より放出されたエクソソーム-H0 (hypoxia) を exoEasy Maxi Kit にて回収する。
- ・HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) にエクソソームを添加して tube formation assay にて血管新生増殖を解析する。
- ・食道扁平上皮癌においても低酸素環境下で放出されるエクソソーム-H0 による血管新生増強

作用が認められる場合には、エクソソーム-HO 内包 miRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行う。

(2) DNA 修復機構と細胞老化、治療感受性の検討
 ・継代数の異なる食道扁平上皮癌細胞株の培養上清、および若年および高齢の食道癌患者の血液サンプルを用いてエクソソームの回収、食道扁平上皮癌における細胞老化に与える miRNAs を選出する。
 ・細胞老化を促進、抑制する miRNAs をそれぞれ食道扁平上皮癌細胞株に導入、またはノックダウンし、細胞老化に特徴的な細胞増殖速度の低下と細胞の扁平肥大化を観察し、老化を顕著に誘導する miRNA を同定する。
 ・miRNA による細胞老化誘導と DNA 損傷修復機構の解析



(3) 食道扁平上皮癌における治療感受性・抵抗性に関するエクソソーム内包 miRNA の同定
 ・術前化学放射線療法後に手術を施行した食道扁平上皮癌患者の、術前治療前の血液サンプルよりエクソソームの回収、miRNA の抽出を行う。同定した候補 miRNA の発現を qRT-PCR にて評価し、術前化学放射線療法の治療効果との相関を検証する。

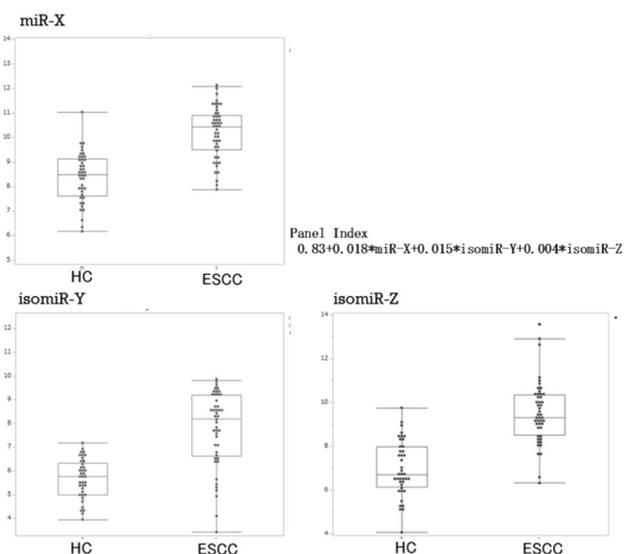
4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いた研究の発展により、miRNA の生成過程で成熟型 miRNA から末端側の数塩基の付加、欠失を認める isomiR の存在が明らかとなった。

isomiR は成熟型 miRNA 同様に組織内、血管内に安定して存在し、新規バイオマーカーとして期待されている。次世代シーケンス解析で検出される成熟型 miRNA と isomiR を組み合わせることで作成した食道扁平上皮癌の診断バイオマーカーの有用性を検討した。

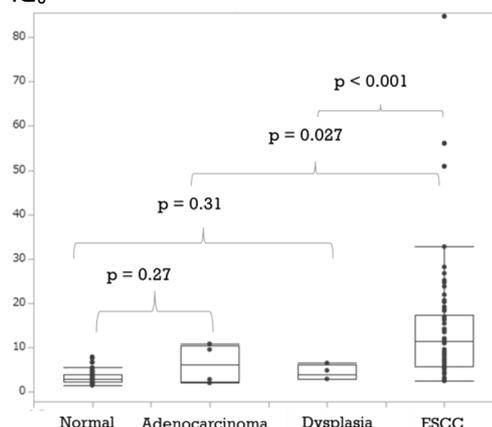


(2) 食道扁平上皮癌患者 (ESCC、n=48) と年齢と性別がマッチする健常者 (HC、n=42) より採取した血清サンプルから次世代シーケンサーを用いて miRNA と isomiR の発現を解析した。これらの症例を 2 群に分け、ESCC 群、HC 群でそれぞれ 90% 以上に検出され、平均リード数が有意に 2 倍以上異なるものを診断バイオマーカーとした。2 群で共通して診断バイオマーカーの基準を満たすものを候補とし、多変量線形回帰解析にて 1 つの成熟 miRNA (miR-X) と 2 つの isomiRs (isomiR-Y, Z) を選択した。



(3) miR-X、isomiR-Y、Z のリード数を代入して導く診断パネルインデックスを作成し、3 つめのグループ (ESCC:18、HC:18) で検証したところ、ESCC 群で有意に高値であった (13.3 ± 8.9 対 3.1 ± 1.3 , $p < 0.001$)。

(4) 診断パネルインデックスを食道腺癌 4 症例、高度異型性 4 症例の血清を用いて検証したところ、食道腺癌 (6.2 ± 4.5)、高度異型性 (4.2 ± 1.7) であり食道扁平上皮癌症例で有意に高値であった。



(5) 診断パネルは高い正確性をもって食道扁平上皮癌患者と健常者の選別が可能であり、それにより算出される診断パネルインデックスは食道扁平上皮癌患者で食道腺癌や高度異型性患者より有意に高値であった。

(6) 現在までの結果を踏まえて、今後は食道扁

平上皮癌治療抵抗性症例での miR-X、isomiR-Y、Z を用いた診断パネルの治療前後での動向の検討、術前化学放射線療法施行群での治療効果との相関を検証していく。

(7) 低酸素環境下での miRNA および isomiR と腫瘍内血管新生と治療抵抗性の検討、miRNA、isomiR に誘導される細胞老化と DNA 損傷修復機構の解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furukawa T, Hamai Y, Hihara J, Emi M, Yamakita I, Ibuki Y, Kurokawa T, Okada M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Impact of Interval Between Neoadjuvant Chemoradiation and Surgery Upon Morbidity and Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of Thoracic Esophagus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 5239-5245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa T, Hamai Y, Hihara J, Tanabe K, Emi M, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M.	4. 巻 67-2
2. 論文標題 Minimally Invasive Surgery for Giant Oesophageal and Gastric Leiomyomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hiroshima J. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 41-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamai Y, Emi M, Ibuki Y, Murakami Y, Nishibuchi I, Nagata Y, Furukawa T, Kurokawa T, Ohsawa M, Okada M.	4. 巻 39(3)
2. 論文標題 Early Recurrence and Cancer Death After Trimodal Therapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1433-1440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamai Y, Yoshiya T, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Yamakita I, Ibuki Y, Okada M.	4. 巻 11(6)
2. 論文標題 Traditional Japanese herbal medicine rikkunshito increases food intake and plasma acylated ghrelin levels in patients with esophageal cancer treated by cisplatin-based chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis.	6. 最初と最後の頁 2470-2478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd.2019.05.67	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M.	4. 巻 42(7)
2. 論文標題 Treatment Outcomes and Prognostic Factors After Recurrence of Esophageal Squamous Cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Surg.	6. 最初と最後の頁 2190-2198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-017-4430-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Murakami Y, Nishibuchi I, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Nagata Y, Okada M.	4. 巻 42(5)
2. 論文標題 Evaluation of Prognostic Factors for Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Neoadjuvant Chemoradiotherapy Followed by Surgery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Surg.	6. 最初と最後の頁 1496-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-017-4283-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Emi M, Hihara J, Hamai Y, Furukawa T, Ibuki Y, Okada M.	4. 巻 104(6)
2. 論文標題 Clinicopathologic Features of Submucosal Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg.	6. 最初と最後の頁 1858-1864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2017.06.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamai Y, Hihara J, Emi M, Ibuki Y, Murakami Y, Nishibuchi I, Nagata Y, Aoki Y, Furukawa T, Okada M.	4. 巻 26(6)
2. 論文標題 Clinical Significance of 18F-Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography-Positive Lymph Nodes to Outcomes of Trimodal Therapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 1869-1878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07158-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamai Y, Hihara J, Emi M, Furukawa T, Ibuki Y, Yamakita I, Kurokawa T, Okada M.	4. 巻 37(10)
2. 論文標題 Effects of Neoadjuvant Chemoradiotherapy on Pathological TNM Stage and Their Prognostic Significance for Surgically-treated Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 5639-5646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.11999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古川高意
2. 発表標題 当院における末期食道がん患者に対する緩和ケア
3. 学会等名 第73回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浜井 洋一 (Hamai yoichi) (90423384)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
研究協力者	恵美 学 (Emi Manabu) (30464308)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教 (15401)	
研究協力者	伊富貴 雄太 (Ibuki Yuta) (40581369)	広島大学・病院(医)・医科診療医 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岡田 守人 (Okada Morihito) (70446045)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	