

令和元年6月12日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16558

研究課題名(和文) がんと間質に特化した大腸がんマイクロRNAの解析に基づく免疫療法の効果予測

研究課題名(英文) Analysis of microRNA in the cancer cell and stromal tissue to explore predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer.

研究代表者

竹之内 寛子 (TAKENOUCHI, Hiroko)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：20749808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAの発現量と大腸がん患者に対するペプチドワクチン療法の効果との関係を探したところ、がん細胞および間質部のmiR-125b-1が低値の症例、ならびにmiR-378a低値の症例は、試験療法群(HLA-matched)において、本療法後の予後が良好であり、対象群(HLA-unmatched)では差が見られなかった。これにより、これらのマイクロRNAは免疫療法の効果と関連する有用なバイオマーカーとなり得る可能性がある。また、in situ hybridizationにより組織切片中の局在を解析したところ、miR-125b-1は間質の線維芽細胞と単核細胞で強い発現を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法は近年注目され、開発が進んでいる領域であるが、免疫療法は患者によって効果に個人差があり、治療前にその効果を適切に予測できる方法の開発が重要である。

本研究では、Laser capture microdissection法により、がん組織をがん細胞と間質細胞に切り分け、各々のマイクロRNA発現量と免疫療法の治療効果との関連を解析したことで、がん細胞および間質部のmiR-125b-1ならびにmiR-378aが、免疫療法の効果と関連する有用なバイオマーカーとなり得る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Many clinical trials of peptide vaccines have been conducted. However, these vaccines have provided clinical benefits in only a small fraction of patients. The purpose of this study was to explore microRNAs as novel predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer. We conducted microarray analysis of cancer tissues in a phase II study, in which peptide vaccines combined with chemotherapy were given. Subsequently, we carried out RT-PCR analysis of phase II cases, separating cancer tissues into cancer cells and stromal tissue using laser capture microdissection. Treatment effect in relation to overall survival (OS) and miRNA expression was analyzed. Three miRNA predictors were negatively associated with OS: miR-125b-1 in cancer cells, and miR-378a in both cancer cells and stromal cells. In conclusion, miR-125b-1 and miR-378a expression might be considered as novel biomarkers to predict the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer.

研究分野：腫瘍・免疫学

キーワード：マイクロRNA 癌微小環境 がん免疫療法 バイオマーカー

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

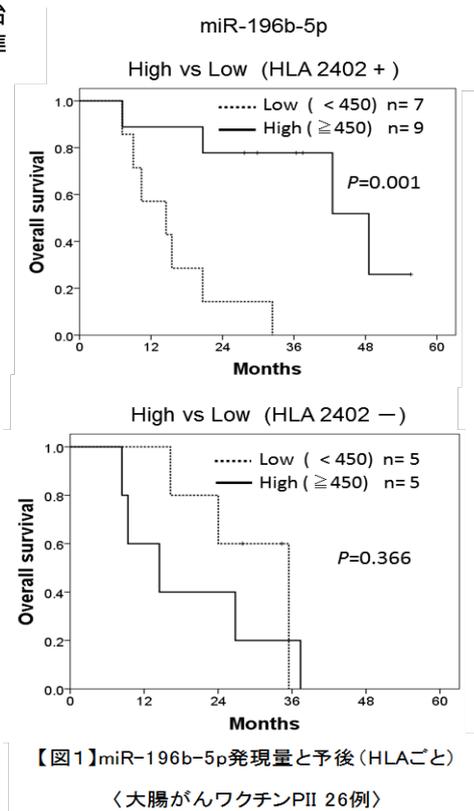
### 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA で、真核生物において遺伝子発現を転写後レベルで制御している noncoding RNA (タンパク質へ翻訳されない RNA) の一種である (Winter J, Nature Cell Biology, 2009)。マイクロ RNA は現在ヒトで約 2500 種類が同定されており、様々な遺伝子の発現を調節することで細胞機能の発現に大きく関与しているが、異常なマイクロ RNA 発現はがんや生活習慣病、感染症などの多くの疾患に関わっていることが最近明らかになっている (Moss EG. Curr Biol. 2002)。

標準的ながん治療である手術・抗がん剤・放射線治療では効果が不十分な患者に対する療法として、標準化学療法との併用も視野に入れ、作用機序の異なる免疫療法の開発が世界的に進められている (Cremolini C, et al. Nat Rev Clin Oncol. 2015)。これら従来の治療と組み合わせ併用できるがん免疫療法は、がん特異的に働く樹状細胞ワクチン療法やペプチドワクチン療法といった比較的副作用が少ないものであるが、免疫療法は患者によって効果に個人差があり、治療前にその効果を適切に予測できる方法の開発が重要である。

近年、マイクロ RNA を測定することにより、がんを診断したり、その悪性度の評価を行う手法が開発されている (Thomas J, et al. Int J Mol Sci. 2015)。

研究代表者は、すでにごん組織のマイクロ RNA により、がんペプチド療法の効果が予測できる可能性があることを検討して報告してきた。【図 1】のようにペプチド療法群 (HLA-A\*2402+) のみ発現量の高低で予後に差が確認できたマイクロ RNA が同定され、これらのマイクロ RNA は、がんペプチドワクチン療法の効果を予測するバイオマーカーである可能性がある。しかしながら、がん細胞と間質細胞を Laser capture microdissection (LCM) 法により切り分けた解析や in situ hybridization (ISH) によるがん細胞と間質細胞の発現の差に関する研究はなされていない。



【図 1】miR-196b-5p 発現量と予後 (HLA ごと)  
〈大腸がんワクチン PII 26 例〉

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん局所微小環境に着目し、がん細胞並びに間質細胞におけるマイクロ RNA の発現を解析し、マイクロ RNA の局在やがん細胞と間質細胞のクロストークを解明し、より正確にがんペプチド療法の有効症例を予測するバイオマーカーを同定することである。

### 3. 研究の方法

大腸がんペプチドワクチン療法第 II 相試験として進行・再発性大腸がんに対する化学療法と免疫療法の併用療法を施行した患者 68 症例を対象とした。本臨床試験は、HLA-A の結果をブラインドにした上で、HLA-A\*2402 陽性症例と陰性症例の双方に、化学療法 (mFOLFOX6) に上乗せして HLA-A\*2402 拘束性の 5 種類のペプチドを投与した。

ペプチドワクチン療法前のがん組織 (新鮮凍結組織) (n=26) から、total RNA を抽出し、腫瘍組織における約 1400 種類のマイクロ RNA の発現量を

マイクロアレイ解析により測定した。本療法に対して、「長期生存 (3 年以上) の患者」と「短期生存 (2 年以内) の患者」の 2 群間で、がん組織に発現しているマイクロ RNA の発現量を比較し、Fisher 比により順位化し、Log2 Ratio が高いマイクロ RNA を選定した (表 1)。さらに、ペプチド療法群 (HLA-A\*2402+:16 例) 対照群 (HLA-A\*2402-:10 例) で、それぞれの症例を RNA 発現量の高低により 2 群に分け、Kaplan-Meier 法により全生存率を求め、2 群の全生存期間の差を log-rank 検定により比較検討した。その結果、試験療法群 (HLA-A\*2402+) でのみ発現量の高低で予後に差が確認されたマイクロ RNA が複数個選定され、これらのマイクロ RNA はペプチド療法の効果を予測するバイオマーカーであることが予測された。

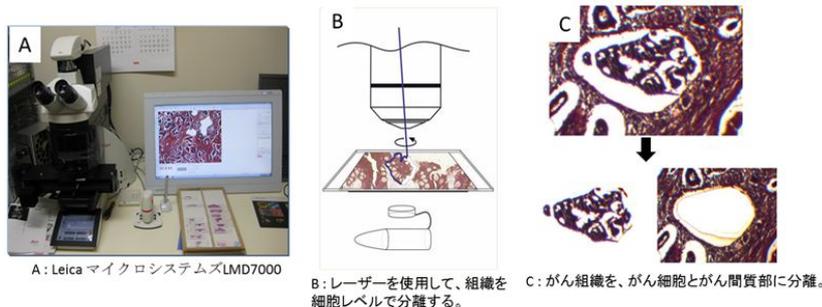
【表 1】大腸がんワクチン PII 試験  
長期生存群と短期生存群でのマイクロ RNA 発現量の比較  
Fisher 比 Top10

Rank	microRNA Name	HLA-A*2402				Log2 Ratio (Long/Short)	Fisher 比
		長期生存 (n = 5)		短期生存 (n = 8)			
		Avg.	SD	Avg.	SD		
1	hsa-miR-1184	586.7	139.4	1510.0	647.7	-1.4	5.0
2	hsa-miR-18a-5p	260.5	97.7	123.3	31.2	1.1	4.6
3	hsa-miR-20b-5p	1304.3	911.6	302.9	165.3	2.1	4.6
4	hsa-miR-196b-5p	1475.9	1156.7	388.6	161.1	1.9	4.3
5	hsa-miR-1298	1070.5	338.7	2716.4	1217.3	-1.3	4.1
6	hsa-miR-659-3p	1080.5	366.7	2916.7	1742.9	-1.4	3.6
7	hsa-miR-18b-5p	716.2	355.0	270.9	118.8	1.4	3.4
8	hsa-miR-135b-5p	1192.4	514.1	470.5	370.8	1.3	3.4
9	hsa-miR-224-5p	710.9	509.0	252.1	144.1	1.5	3.3
10	hsa-miR-23c	2251.7	898.2	1073.1	430.4	1.1	3.3

これらの結果を踏まえて、本研究では 68 例へと症例数を増やし、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から、Laser capture microdissection (LCM) 法を用いて、がん細胞とがん間質細胞を別々に採取し、それぞれから抽出した total RNA から cDNA を合成し、マイクロアレイ解析により候補に挙げられたマイクロ RNA について、定量的 PCR 法によりマイクロ RNA の増幅・検出を行い、マイクロ RNA の発現量と免疫療法の効果との関連を検討した。

( 1 ) がん組織の切離

ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて 15 μm の厚さの切片を RNase-Free フォイル付きスライド上に作成する。H.E. 染色を行った後、Leica マイクロシステムズ LMD7000 を用いて、Laser capture microdissection (LCM) 法によりがん組織をがん細胞と間質細胞に分



【図2】 Laser capture microdissection (LCM)によるサンプル回収の様子

離・採取する【図2】。採取した組織は、PCR 用チューブに入れて-80 フリーザーで保存する。

( 2 ) 全 RNA 抽出

採取した組織から、miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN 社) を使用して全 RNA を抽出する。

( 3 ) 定量的 PCR

抽出した全 RNA から、TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher 社) を使用して、逆転写反応を行い cDNA を合成する。実際には、RT master mix を精製し、全 RNA と混和し、それぞれのマイクロ RNA に特異的な RT プライマーと試薬を加え、サーマルサイクラー (マスターサイクラー ep グラジェント S : Eppendorf 社) にて逆転写する。その後、合成した cDNA に TaqMan プローブを加えて、Light Cycler® 480 software によりリアルタイム PCR を行い、マイクロ RNA の増幅・検出を行う。

( 4 ) in situ hybridization

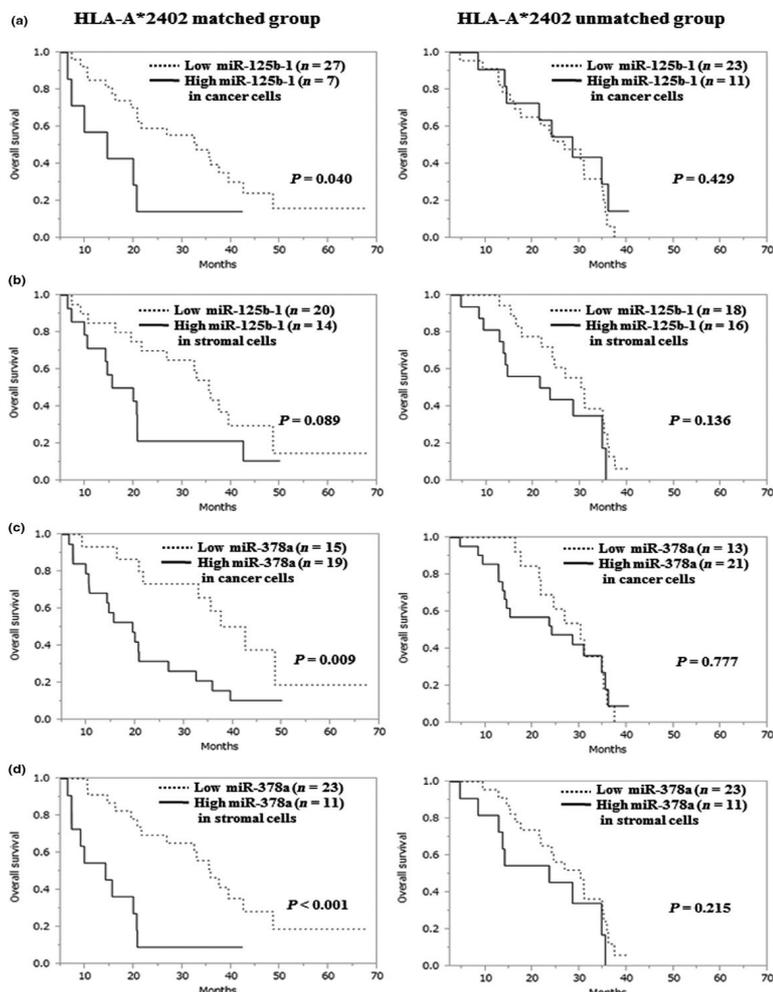
バイオマーカー候補として最も効率の良いものについて、in situ hybridization (ISH) による、がん細胞と間質細胞の発現の差について画像的に解析する。

( 5 ) データ解析

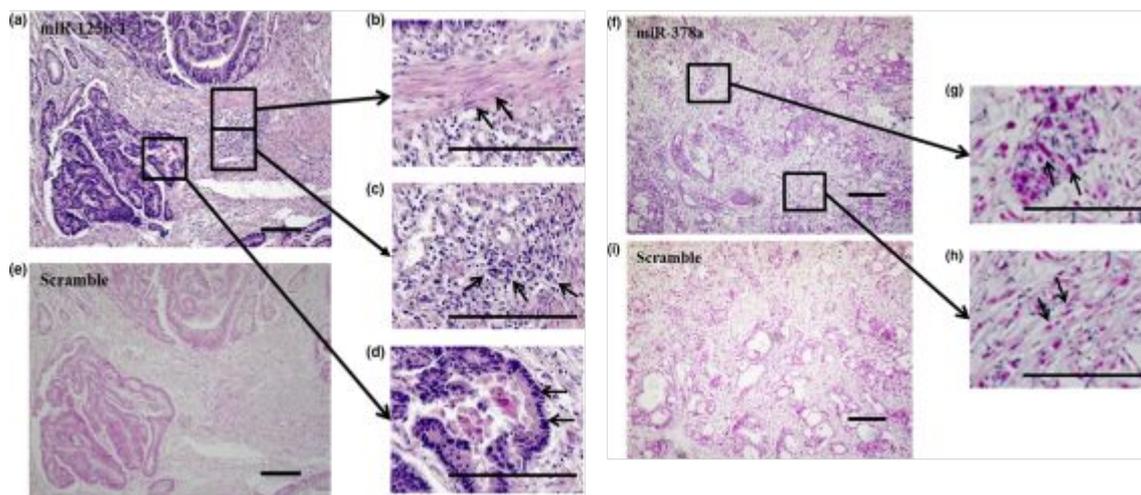
長期生存と短期生存の患者の 2 群間で、がん細胞並びにがん間質部のマイクロ RNA の発現量を比較し予後との関連を検討する。

4 . 研究成果

がん細胞および間質部の miR-125b-1 が低値の症例、ならびに miR-378a 低値の症例は、HLA-matched 症例において、本療法後の予後が良好であり、HLA-unmatched 症例では差が見られなかった【図3】。これにより、これらのマイクロ RNA は免疫療法の効果と関連する有用なバイオマーカーとなり得る可能性があると判断した。さらに、in situ hybridization により、組織切片中の局在について解析したところ、miR-125b-1 は間質部の線維芽細胞と単核細胞で強い発現を示すことが確認できた【図4】。



【図3】 Cancer cells並びに Stromal cellsにおける miR-125b-1 , miR-378a の発現量と予後



【図4】 miR-125b-1, miR-378aの発現 (In situ hybridization)

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

Iida M, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, **Takenouchi H**, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Tomochika S, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Suzuki N, Takeda S, Ueno T, Yamamoto S, Yoshino S, Fujita K, Kuroda M, Nagano H. Overexpression of miR 221 and miR 222 in the cancer stroma is associated with malignant potential in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2018 Sep;40(3):1621-1631. doi: 10.3892/or.2018.6575. 査読有り.

Tanaka Hironori, Hazama Shoichi, Iida Michihisa, Tsunedomi Ryouichi, **Takenouchi Hi roko**, Nakamura Yusuke, Nagano Hiroaki, et al. Cancer Science. MiR-125b-1 and miR-378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer. 2017 Nov;108(11): 2229-2238. doi: 10.1111/cas.13390. 査読有り.

Shindo Yoshitaro, Hazama Shoichi, Nakamura Yusuke, Inoue Yuka, Kanekiyo Shinsuke, Suzuki Nobuaki, **Takenouchi Hi roko**, Tsunedomi Ryouichi, Nakajima Masao, Ueno Tomio, Takeda Shigeru, Yoshino Shigefumi, Okuno Kiyotaka, Fujita Yusuke, Hamamoto Yoshihiko, Kawakami Yutaka, Oka Masaaki, Nagano Hiroaki. MiR-196b, miR-378a and miR-486 are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2017 Aug;14(2): 1355-1362. doi: 10.3892/ol.2017.6303. 査読有り.

Kijima T, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, **Takenouchi H**, Kanekiyo S, Inoue Y, Nakashima M, Iida M, Sakamoto K, Suzuki N, Takeda S, Ueno T, Yamamoto S, Yoshino S, Okuno K, Nagano H. MicroRNA-6826 and -6875 in plasma are valuable noninvasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2017 Jan;37(1):23-30. doi: 10.3892/or.2016.5267. 査読有り.

### 〔学会発表〕(計1件)

**竹之内寛子**、中島千代、碓彰一、兼清信介、中島正夫、松井洋人、北原正博、田中宏典、桑原太一、友近忍、飯田通久、徳久善弘、鈴木伸明、武田茂、山本滋、吉野茂文、荻原宏是、浜本義彦、上野富雄、永野浩昭  
血清タンパク質網羅的解析による大腸癌新規予後マーカーの探索  
第39回癌免疫外科研究会、2018年

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

### 〔その他〕

特記事項無し

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：裕 彰一

ローマ字氏名：HAZAMA, Shoichi

研究協力者氏名：鈴木 伸明

ローマ字氏名：SUZUKI, Nobuaki

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。