

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19608

研究課題名(和文)大腸がん症例の制御性T細胞の血液中バイオマーカーになるmicroRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of microRNA as a serum biomarker for regulatory T cell in CRC cases.

研究代表者

三森 功士 (Mimori, Koshi)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：50322748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)を介した腫瘍免疫応答について、特に大腸癌局所および血液において客観的かつ経時的に評価しうる新しいシステムを構築するために研究を開始した。特に腫瘍浸潤リンパ球のうち、Effector Tregに関連するmiR群を同定しその生物学的意義を検証する。平成31年4月現在、14症例サンプル集積を完了。TIL分離し、症例番号1-11は多領域に採取した。また、症例番号10-14については血清およびPBMCも採取した。組織におけるmiRNA arrayの結果、染色体の再構成を制御する重要なSWI/SNF複合体の構成要素のひとつEZH2を抑制するmiRを鋭意解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は多様性のために難治であるが、免疫チェックポイント阻害剤(ICB)の登場により腫瘍免疫応答の賦活化により多様性を克服するという画期的な治療戦略が生まれた。しかし実臨床では解決すべき課題は多く、特にeffector T-regによるCTLの抑制機構の解明は重要である。このeffector T-regの賦活化を制御する機構を解明し、そのマーカーとなるmiRNAを明らかにすることは学術的意義が大きく、またICB剤のさらなる抗腫瘍効果の改善にも寄与することへの期待は社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We began a research work to establish the novel chronologic and objective system for evaluating tumor immune response mediated through regulatory T cell (Treg) in local tumor tissues and peripheral blood in colorectal cancer cases. In the current study, we have been disclosing the biological and clinical significance of miRNAs related to Treg among bunch of tissue infiltrating lymphocytes (TILs). At present (April 2019), we have collected tissue samples and blood samples from 14 cases. Sample of TIL fraction in multi-region were extracted from case #1-11, and serum and PBMC samples were collected from case #10-14. According to microRNA array in TIL, we are now focusing on and analyzing miRNA inhibiting EZH2 genes which consists of SWI/SNF complex to regulate chromatin remodeling in malignant tissues. Then, we will proceed an enrichment analysis by using of miEAA, an online tool.

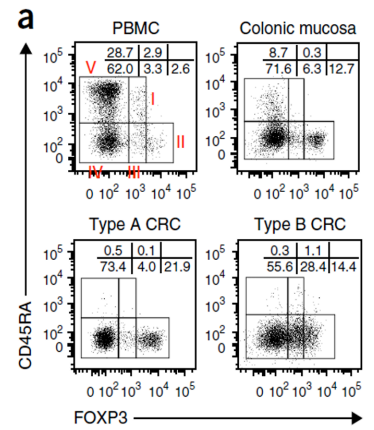
研究分野：消化器外科

キーワード：Treg FOXP3 microRNA Fr + EZH2 miEAA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんの転移再発と予後を決める要因として原発巣がん組織のゲノムレベルの多様性とがん免疫応答機構は重要である。近年、免疫チェックポイント因子 PD1 および PDL1 の様に免疫系恒常性の維持において重要な分子が注目されているが、制御性 T 細胞(Treg)は最も注視すべき腫瘍免疫制御機構のひとつである。特に腫瘍内局所浸潤(TIL) Treg はこれまでに多くのがん種において予後不良因子として報告されている。一方、図 a の様に大腸がんでは(Treg のマスター遺伝子である)FOXP3 陽性 T 細胞には **免疫抑制能を有する effector Treg(II 分画)優位の Type A** 大腸がんと **抑制能を有さない non-Treg(III 分画)優位の Type B** 大腸がんとがあり、**effector Treg の割合が低い Type B は A に比べて予後良好であることが報告された(Saito T.ら Nat Med 2016)。**



大腸がんにおいて Treg は上述した 2 つの type に区別され、これを規定する因子は免疫応答能の評価や予後予測のバイオマーカーとなる。あるいは Treg 阻害剤のコンパニオン診断マーカーとしての応用も期待できる。現在のところ組織の TIL を CD45RA と FOXP3 とで分離同定する事などの方法で Treg は 2 つの type に区別可能だが、実臨床においては本治療の適応となる高度進行がん症例は組織検体の採取が困難であり、低侵襲かつ簡便で精確な血液中のバイオマーカーが求められていた。近年の研究で miR は発がんやがん進展において重要な役割を担う事が明らかとなり、その安定性からバイオマーカーとしての臨床応用が期待されている。Treg に関する miRNA について複数報告されている。

機能	miRNA
Treg を促進	21, 141
Treg を抑制	15b, 16, 17, 31, 100, 125a, 155, 545

2. 研究の目的

免疫応答機構は大腸がんの転移再発と予後を決める要因として重要であると考えられるため、大腸がんにおける免疫応答と腫瘍細胞の反応機序の解明は重要な課題である。特に、非侵襲的に腫瘍免疫応答を予測するための方法として、安定したリキッドバイオプシー・ツールとして知られる血液中の miRNA を測定することは重要である。今回われわれは大腸がん 10 例の腫瘍内浸潤 Treg を第 II 分画と第 III 分画にわけて exosome 内包 miR を抽出。両者を比較検討し、type A と B とを区別可能な miR profile を同定する。大腸がん症例において経時的に採血された検体を利用して、そのバイオマーカーとしての意義を明らかにする。

3. 研究の方法

予備実験として、大阪大学免疫学フロンティア研究センターにて大腸がん臨床検体から細胞分離を実施した。代表的な大腸がん症例の原発巣より 5 か所からサンプリングした。それぞれ 1cm 片程度である。検体を -4℃ で保管し、可及的速やかに TIL の分離を開始した。RNA-seq についてはできるだけ新鮮な標本を採取し、 1×10^7 cells 程度必要であることを予備実験で確認した。分離した TIL からは -80℃ で凍結したため、RNA-seq することは困難であったが、DNA-seq および追加の FACS 解析は可能であり実施した。

今回、臨床検体の保存時間としては比較的長かったが、 $5.0 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^7$ cells の検体を採取しえた。 2×10^5 cells あれば FACS 解析可能であった。組織からの TIL の採取に引き続き FACS 解析を施行した。用いた抗体は CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7 等、細胞内染色として FOXP3, Ki67 とした。当初予定していた TGFβ, IL12 については stimulus が必要であり実施しなかった。FACS 解析の結果については、5ヶ所で e Treg と non-Treg の割合に大きな違いはなかったが、傾向を述べるにはさらなる症例の追加が必要であると考えられた。

平成 31 年 4 月現在、14 症例サンプル集積を完了。TIL 分離し、症例番号 1-11 は多領域に採取した。また、症例番号 10-14 については血清および PBMC も採取。FACS にて sorting し、miRNA array を提出した。

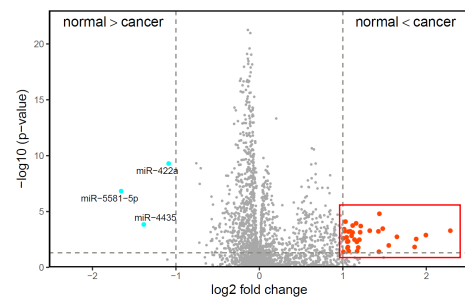
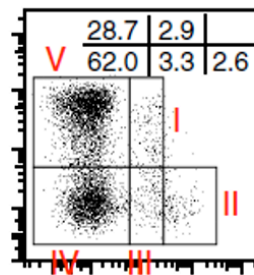
4. 研究成果

Cell sorter にて Type A, B に分類し、Fr I + III と Fr II に sort → miRNA array。

癌患者血清で発現量が 2 倍以上で有意差のある miRNA → 59 miRNAs 確認した。パスウ

エイ解析、GO 解析等を含む包括的な miRNA tool である miEAA を実施した(Backes C. Nucleic Acids Res. 2016)。その結果、関連するパスウェイ等の情報が網羅的に表記される。P < 0.05: 1297 項目。さらに P < 0.01: 242 項目に絞られた。すなわちがん患者の血清で高発現の miRNA 群で低下し、Neoplasms で発現上昇している種々の発癌に関与するパスウェイ等に関与する。

これまでの結果 SWI/SNF complex の EZH2 遺伝子に注目しており、現在もお鋭意解析を進めている。また今後 online の miRNA tool である miEAA を用いて、Enrichment 解析を施行する。



Diseases (miRWalk, published studies)	p-value	Pathways (miRWalk)	p-value
Neoplasms (miRWalk)	2.E-05	Endocytosis	4.E-04
Infection (miRWalk)	6.E-03	Cytokine cytokine receptor interaction	6.E-04
colon cancer upregulated	3.E-03	Angiogenesis	2.E-03
		TGF beta signaling pathway	2.E-03
		Wnt signaling pathway	2.E-03
		Cell cycle	2.E-03
		TGF beta Signaling Pathway2	2.E-03
		Ubiquitin mediated proteolysis	3.E-03
		Cadherin signaling pathway	5.E-03
		Notch signaling pathway	5.E-03
		Kit receptor signaling pathway	5.E-03
		TGF beta Signaling Pathway1	5.E-03
		DNA damage response	5.E-03
		p53 signaling pathway	5.E-03
		mTOR signaling pathway	5.E-03
		Apoptosis	5.E-03
		Jak STAT signaling pathway	5.E-03
		Colorectal cancer	5.E-03
	
Organs (miRWalk)	p-value	Others	p-value
Lymphocytes	2.E-03	age dependent	6.E-06
Stem Cells	1.E-02	positively correlated with age	6.E-05
Colon	1.E-02	CD14 expressed	7.E-06
Brain	2.E-02	CD15 expressed	7.E-06
Prostate	2.E-02	CD3 expressed	1.E-04
Breast	3.E-02	CD56 expressed	1.E-04
Blood	3.E-02	CD19 expressed	4.E-02
Fibroblasts	4.E-02
Plasma	4.E-02		

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 36 件)

1. Sato K, ... Mimori K. (12 名中 12 番) Novel oncogene 5MP1 reprograms c-Myc translation initiation to drive malignant phenotypes in colorectal cancer. *EBioM.* 2019.
2. Yumimoto K, ... Mimori K. (4 名中 3 番) The potentials of CCL2-CCR2 blockers including propagermanium as anticancer agents. *Cancer Sci.* 2019.
3. Muto Y, ... Mimori K. (12 名中 9 番). Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis. *J Exp Med.* 216(4):950-965. 2019.
4. Hayashi N, ... Mimori K. (11 名中 11 番) A clinical trial of somatic and germline analyses for healthy longevity in a postoperative cancer patient. *Surg Today.* 2019.
5. Kohsaka S, ... Mimori K. (39 名中 27 番) Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Cancer Sci.* 110(4):1464-1479. 2019.
6. Kurashige J, ... Mimori K. (15 名中 15 番) Plastin3 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in gastric cancer. *Oncol Lett.* 17(2):2393-2399. 2019.
7. Yokoyama A, ... Mimori K. (40 名中 33 番) Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature.* 565(7739):312-317. 2019.

8. Shimizu D,...Mimori K.(9名中9番)CRMP5-associated GTPase (*CRAG*) Is a Candidate Driver Gene for Colorectal Cancer Carcinogenesis. *Anticancer Res.* 39(1):99-106. 2019.
9. Sato K, ...Mimori K. (10名中10番)Multiregion Genomic Analysis of Serially Transplanted Patient-derived Xenograft Tumors. *Cancer Genomics Proteomics.* 16(1):21-27. 2019.
10. Hu Q, Mimori K. ASO Author Reflections: ARL4C and Peritoneal Dissemination in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018.
11. Wakiyama H,... Mimori K.(10名中10番) Cytolytic Activity (CYT) Score Is a Prognostic Biomarker Reflecting Host Immune Status in Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Anticancer Res.* 38(12):6631-6638. 2018.
12. Mimori K., Saito T, Niida A, Miyano S. Cancer evolution and heterogeneity. *Ann Gastroenterol Surg.* 2(5):332-338. 2018.
13. Ito S,...Mimori K.(13名中13番) Prognostic Impact of Immune-Related Gene Expression in Preoperative Peripheral Blood from Gastric Cancer Patients. *Ann Surg Oncol.* 25(12):3755-3763. 2018.
14. Sugimachi K,...Mimori K.(13名中13番) Serial mutational tracking in surgically resected locally advanced colorectal cancer with neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer.* 119(4):419-423. 2018.
15. Masuda T,...Mimori K.(12名中12番) Circulating Pre-microRNA-488 in Peripheral Blood Is a Potential Biomarker for Predicting Recurrence in Breast Cancer. *Anticancer Res.* 38(8):4515-4523. 2018.
16. Saito T,...Mimori K.(41名中41番) A temporal shift of the evolutionary principle shaping intratumor heterogeneity in colorectal cancer. *Nat Commun.* 9(1):2884. 2018.
17. Shimizu D,... Mimori K.(9名中9番)Overexpression of *FGFR1* Promotes Peritoneal Dissemination *Via* Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 15(4):313-320. 2018.
18. Iguchi T,...Mimori K.(20名中20番) Identification of UHRF2 as a Negative Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Clinical Significance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology.* 95(3):179-187. 2018.
19. Nishio M,...Mimori K., Suzuki A.(6名中5番) The Hippo Signaling Pathway: A Candidate New Drug Target for Malignant Tumors. In: Nakao K, Minato N, Uemoto S, editors. Innovative Medicine: Basic Research and Development [Internet]. Tokyo: Springer; 2015.
20. Niida A,... Mimori K.(4名中4番) Understanding intratumor heterogeneity by combining genome analysis and mathematical modeling. *Cancer Sci.* 109(4):884-892. 2018.
21. Hu Q,...Mimori K.(14名中14番) Identification of ARL4C as a Peritoneal Dissemination-Associated Gene and Its Clinical Significance in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 25(3):745-753. 2018.
22. Nambara S,... Mimori K.(17名中17番) Antitumor effects of the antiparasitic agent ivermectin via inhibition of Yes-associated protein 1 expression in gastric cancer. *Oncotarget.* 8(64):107666-107677. 2017.
23. Takano Y,...Mimori K.(17名中17番) Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *Oncotarget.* 8(45):78598-78613. 2017.

24. Masuda T,...Mimori K.(6名中6番) MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 9(9). pii: E124. 2017.
25. Takahashi Y,...Mimori K.(19名中19番) Japanese genome-wide association study identifies a significant colorectal cancer susceptibility locus at chromosome 10p14. *Cancer Sci*. 108(11):2239-2247. 2017.
26. Ito S,... Mimori K.(10名中9番) Diagnostic laparoscopy for pneumatosis intestinalis in a very elderly patient: A case report. *Ann Med Surg (Lond)*. 21:109-113. 2017.
27. Nambara S,... Mimori K.(10名中10番) Clinical significance of *ZNF750* gene expression, a novel tumor suppressor gene, in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 14(2):1795-1801. 2017.
28. Sudo T,...Mimori K. (6名中6番) Significance of CD47 expression in gastric cancer. *Oncol Lett*. 14(1):801-809. 2017.
29. Ito S,... Mimori K., Mori M.(12名中11番) Long-term outcome of adipose-derived regenerative cell-enriched autologous fat transplantation for reconstruction after breast-conserving surgery for Japanese women with breast cancer. *Surg Today*. 47(12):1500-1511. 2017.
30. Uchi R, ...Mimori K. (41名中41番)Correction: Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet*. 13(5):e1006798. 2017.
31. Sasaki S,... Mimori K.(8名中8番)DDR2 Expression Is Associated with a High Frequency of Peritoneal Dissemination and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 37(5):2587-2591. 2017.
32. Sato K,...Mimori K.(18名中18番) Phosphoserine Phosphatase Is a Novel Prognostic Biomarker on Chromosome 7 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 37(5):2365-2371. 2017.
33. Ueda M,...Mimori K.(15名中15番) Up-regulation of *SLC9A9* Promotes Cancer Progression and Is Involved in Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 37(5):2255-2263. 2017.
34. Matsui Y,...Mimori K.(6名中4番) phyC: Clustering cancer evolutionary trees. *PLoS Comput Biol*. 13(5):e1005509. 2017.
35. Sugimachi K,...Mimori K.(14名中14番) Altered Expression of Hippo Signaling Pathway Molecules in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Oncology*. 93(1):67-74. 2017.
36. Sudo T,...Mimori K. (12名中5番) Clinical Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 24(12):3763-3770. 2017.

〔学会発表〕（計 9 件）

1. 三森功土. 大腸発がんから進行がんに至る過程のゲノムレベル進化について. 第3回がんゲノム・エピゲノムセミナー. 2017. 10. 7 札幌
2. 三森功土. 消化器がん転移再発診断と治療評価法に関する ctDNA 解析の臨床的有用性と今後の課題. 第55回日本癌治療学会学術集会. 2017. 10. 20 横浜
3. 三森功土. 大腸の発がんと進展における「進化のシフト」について. 金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム. 2017. 10. 26 金沢
4. 三森功土. 大腸がんにおける新たな進化と多様性創出機構について. Translational research seminar. 2017. 12. 5 奈良

5. Koshi Mimori. Evolution of Colorectal Cancer via Genomic Alterations Hampering the Tumor Immune Responses. The 33rd Nagoya International Cancer Treatment Symposium. 2018. 2. 11 名古屋
6. 三森功士. がん進化論からみた腫瘍免疫療法の有効性についての考察. 第73回日本消化器外科学会総会. 2018. 7. 12 鹿児島
7. 三森功士. 術後再発大腸がん患者において ctDNA 変異検出と腫瘍免疫応答について. 第27回日本がん転移学会学術集会・総会. 2018. 7. 19 横浜
8. 三森功士. 大腸発がんから進行がんとなり難治性を呈するまでの新たな大腸がんモデル. 公益財団法人高松宮妃癌研究基金 第49回国際シンポジウム. 2018. 11. 7 東京
9. 三森功士. 消化器がんにおける様々な進化機構について ～新たな大腸がん進化機構の解明～. 第44回北里大学医学会総会. 2018. 11. 17 相模原市

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。