

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07210

研究課題名(和文) 前立腺癌のリンパ節前転移ニッチ形成に関するmicroRNAの探索

研究課題名(英文) Exploratory research of microRNA related to pre-metastatic lymph node niche formation in prostate cancer.

研究代表者

金尾 健人 (Kanao, Kent)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20327620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺全摘除術及びリンパ節郭清術を施行した患者のうち、病理診断がGleason score 6の患者(Low risk群)、9以上の患者(High risk群)、リンパ節転移を認めた患者(N(+))群の切除リンパ節FFPE切片を収集した。切片のリンパ節組織(N(+))群では転移のあるリンパ節の転移のない部位)をマクロダイセクションし、miRNA-seqを行った。FDR値を<0.05、Fold ChangeをLog2<-0.5 or >0.5を閾値としたところ、High risk群とN(+))群の間で1個、Low risk群とN(+))群の間で7個、発現に有意差を認めるmiRNAを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回有意差を示したmiRNAについては、今後個別に定量PCRでもその差を明らかにしていく予定である。これらのmiRNAは本研究の目的であった、リンパ節の前転移ニッチ形成に関するmiRNAの候補となる。今後の検証により、前転移ニッチ形成に対する感度、特異度が高いmiRNAであれば、リンパ節転移を起こす準備段階の前立腺癌を診断することが可能となり、前立腺生検検体や血中からのmiRNA抽出により監視療法の適応患者選択や、監視療法中に治療介入を行うかどうかを判断するバイオマーカーの一つに利用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among patients who underwent total prostatectomy and lymph node dissection, patients with a Gleason score of 6 (Low risk group), patients with 9 or higher (High risk group), and patients with lymph node metastasis (N) (+) Group resected lymph node FFPE sections were collected. The lymph node tissue of the section (in the N (+) group, the site without metastasis of the lymph node with metastasis) was macrodissection and miRNA-seq was performed. When the FDR value was set to <0.05 and the FDR value was set to Log2 <-0.5 or> 0.5, we found one miRNA between the High risk group and the N (+) group, and 7 miRNA between the High risk group and the N (+) group that showed significant differences in expression.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前転移ニッチ エクソソーム microRNA リンパ節転移 前立腺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、癌細胞が分泌するエクソソームに内包される様々なタンパク質、mRNA、miRNA が原発巣と転移巣間のコミュニケーションツールとして、癌の転移に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。特に肺転移や骨転移に関しては、原発巣から分泌されるエクソソームが将来の転移先に取り込まれ、内包するタンパク質や miRNA によって、がん転移に適するニッチ(前転移ニッチ)を形成していることが明らかになっている。現在までに前転移ニッチの形成に関与するエクソソーム内の情報伝達物質として MET、MIF といったタンパク質や、miR-210 といった miRNA が報告されている。

(2) このようなエクソソーム内情報伝達物質と前転移ニッチに関する研究は主に血行性転移である骨転移や肺転移を対象に研究が進んできた。一方、エクソソームはリンパ液中にも分泌されることが示されているものの、リンパ液の採取が容易でないこともあり、リンパ節転移における前転移ニッチに関する研究はほとんど進んでおらず、リンパ節前転移ニッチに関与するエクソソーム内情報伝達物質も報告されていない。さらに、転移先となるリンパ節に含まれる miRNA と、原発巣に含まれる miRNA や、liquid biopsy の対象として重要となってくる原発巣から血液中に放出されるエクソソーム内の miRNA との関連も明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前立腺癌において、現在まで研究が進んでいないリンパ節の前転移ニッチ形成に関与する miRNA の候補を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌全摘除術における切除リンパ節検体からの miRNA の抽出

当施設で前立腺癌に対し、根治的前立腺全摘除術及び閉鎖リンパ節郭清術を施行した患者の中から、臨床的に前転移リンパ節ニッチの形成がないと考えられる、病理組織診断がグリーソンスコア 6 の低リスク前立腺癌患者 (Low risk 群)、病理組織学的にリンパ節転移はないものの前転移リンパ節ニッチを持っている可能性があるグリーソンスコア 9 以上の患者 (High risk 群)、病理組織学的にリンパ節転移を認めた患者 (N(+)) の、リンパ節ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片 (N(+)) 群では転移のあるリンパ節の転移のない部位) を、グループごとにそれぞれ 3 検体、サンプルとして収集した。miRNA の抽出はタカラバイオ株式会社の miRNA-Seq 解析に依頼した。

(2) 切除リンパ節サンプルの miRNA シーケンス

miRNA シーケンスはタカラバイオ株式会社の miRNA-Seq 解析に依頼し、miRNA の網羅的な定量解析を行った。解析には当施設所属のバイオインフォマティクスの協力を得ながら、各グループ間での miRNA の発現量を比較し、リンパ節前転移ニッチの形成に関与すると考えられる miRNA の候補を抽出した。

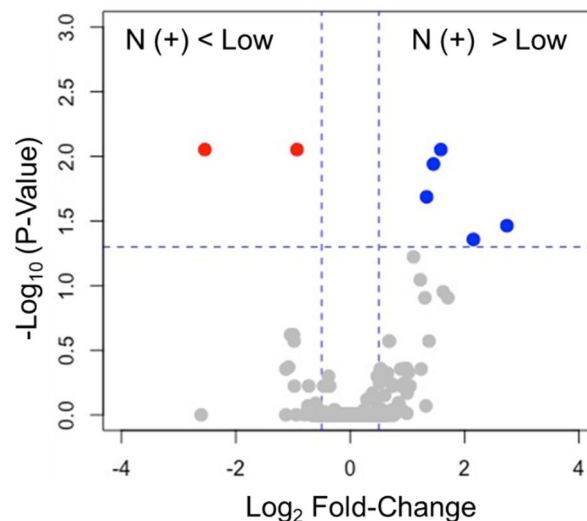
4. 研究成果

(1) RNA 抽出および品質検定

TapeStation または BioAnalyzer (Agilent Technologies) を用いた検定では、十分な量の RNA が回収できていることが明らかとなり、分解度についても、FFPE 由来のサンプルとして妥当な結果が得られた。

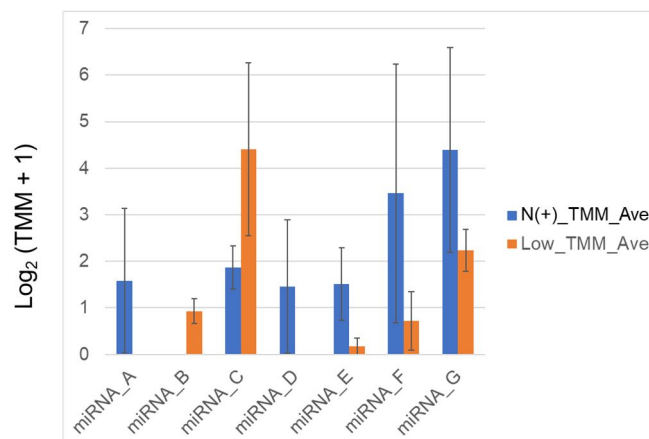
(2) 切除リンパ節サンプルの miRNA シーケンス

Low risk 群, High risk 群, N (+) 群それぞれ 3 検体ずつを用い、miRNA-seq を行った。それぞれのデータで 2 群間解析を行った結果、FDR 値を < 0.05 、Fold Change を $\text{Log}_2 < -0.5$ or > 0.5 を閾値としたところ、Low risk 群 vs High risk 群では有意差を示す miRNA は見出されなかったが、Low risk 群 vs N (+) 群では 7 個、Low risk 群 vs N (+) 群では 1 個の miRNA について有意差が認められた。(図 1) に Low risk 群 vs N (+) 群の Volcano Plot を示す。有意差のあった 7 個の miRNA のうち、Low risk 群で発現が上昇する miRNA は 2 個で、N (+) 群で発現が上昇する miRNA は 5 個であった。



(図 1) Low risk 群 vs N (+) 群の Volcano Plot

次に、Low risk 群 vs N (+) 群で有意差を示した miRNA について個別に示す。



今回有意差を示した 7 個 miRNA については、特許出願を予定しており、A-G の略字で代用した。

(3) 今後の展望

今回有意差を示した miRNA については、今後個別に定量 PCR でもその差を明らかにしていく予定である。これらの miRNA は本研究の目的であった、リンパ節の前転移ニッチ形成に關与する miRNA の候補となる。また、今回は予算の制限から、計画していた患者の血清中に存在するエクソソーム中の miRNA の解析は行えなかったが、今回の miRNA と共通の miRNA があれば liquid biopsy で検出できるリンパ節転移を予測するバイオマーカーの候補になりえると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masahito Watanabe, Kent Kanao, Susumu Suzuki, Hiroyuki Muramatsu, Singo Morinaga, Keishi Kajikawa, Ikuo Kobayashi, Genya Nishikawa, Yoshiharu Kato, Kenji Zennami, Kogenta Nakamura, Toyonori Tsuzuki, Kazuhiro Yoshikawa, Ryuzo Ueda, Makoto Sumitomo	4. 巻 79
2. 論文標題 Increased Infiltration of CCR4-positive Regulatory T Cells in Prostate Cancer Tissue Is Associated With a Poor Prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 1658-1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.23890	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 Kent Kanao, Toshiki Ito, Kiyoshi Takahara, Ryosuke Ando, Takahiro Yasui, Ryoichi Shiroki, Hideaki Miyake, Makoto Sumitomo	4. 巻 49
2. 論文標題 Prostate-specific Antigen Response Patterns During Cabazitaxel Therapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1043-1048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz110	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0件

〔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
研究分担者	都築 豊徳 (Tsuzuki Toyonori) (70627645)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------