

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08675

研究課題名(和文)食道癌特異的分泌型エクソソームを標的とした多目的バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of the multipurpose biomarker which targetted specific secretor exosome in esophageal cancer

研究代表者

大井 正貴 (Ohi, Masaki)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40418752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌は死亡者数、罹患数ともに未だ減少せず、医療需要の高い疾患である。しかし食道癌根治手術後の食事摂取量低下、体重減少、下痢、逆流症状など患者のQOLを著しく損なうこと多く、内視鏡治療可能な早期の段階で非侵襲的に診断が可能となれば、国民の健康に貢献する点でも医療費の観点からも極めて意義深い。本研究は、食道癌特異的に分泌されるExosomeに特異的に発現する蛋白Xを同定することで、いくつかの臨床的意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌特異的に分泌されるExosomeに特異的に発現する蛋白Xを同定し、その蛋白X陽性Exosomeに包埋された遺伝子情報を解析することで、食道癌診断特異的パネルを作成し、非侵襲的なLiquid biopsyによる食道癌患者の診断から治療にわたる戦略を検証し、低侵襲的な治療の適応や予後因子などを予測できれば、内視鏡治療、低侵襲手術などの適応を早期に決定でき、国民の予後改善、治療後のQOLを改善する点でも医療費の観点からも極めて学術的意義や社会的意義は高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：Esophageal cancer is a disease with high medical demand because the number of mortality and morbidity do not decrease even after the development of treatment. However, after radical surgery for esophageal cancer, the QOL of patients is often impaired, such as decreased food intake, weight loss, diarrhea, and reflux symptoms. It is extremely significant from the viewpoint of medical expenses as well as contributing to the health of the patient. In this study, we identified protein X that is specifically expressed in Exosome that is secreted specifically for esophageal cancer, and clarified some clinical significance.

研究分野：消化管外科

キーワード：食道癌 パネル 内視鏡治療 低侵襲手術

1. 研究開始当初の背景

わが国の国民医療費は平成 25 年には 40 兆 610 億円と初めて 40 兆円を超え、一人当たりも 31 万 4700 円で、いずれも過去最大だった。高齢化と医療技術高度化が主要因とされ、特に高齢者の国民医療費は全体に占める割合は 57.8%と前年度より拡大し、高齢者における癌対策がより一層重要性を増している。

食道癌はアジアや南米に多い疾患であり、2015 年度の本邦食道癌死者数は男性で第 7 位、女性で第 16 位と依然、死亡者数の多い疾患である。治療成績の向上した現在でも死亡者数、罹患数ともに依然として減少せず、医療需要の高い疾患といえる。一方、内視鏡技術の進捗に伴い、食道癌において内視鏡的粘膜切除術 (EMR)、内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) を行うことで、多くの早期食道癌は手術治療を回避し、治療可能となってきた。食道癌根治手術のもたらす患者のデメリットは大きく、術後は食事摂取量低下、体重減少、下痢、逆流症状など QOL を著しく損なうこと多く、患者 QOL のみならず、医療費の観点からも、内視鏡治療可能な早期の段階で非侵襲的に診断が可能となれば、国民の健康に貢献できるだけでなく、食道癌治療に関わる医療費の削減も期待でき、極めて意義深い。

現在わが国では、食道癌の検診は主に上部消化管の X 線検査および内視鏡検査が行われている。しかしながら X 線検査に伴う被ばくの問題や微小早期癌発見の困難さ、内視鏡検査の侵襲性、煩雑さやコスト面など、そしていずれの検査においても多数人数の検診を行うには時間を要する点など、改善点も多いと考えられる。一方、血液検査で一次検診可能となったことに関するインパクトは大きく、受診におけるコンプライアンスの向上、ひいては前立腺癌の早期発見、予後改善に寄与するであろう。今後、医療費の削減を念頭に置いた場合、食道癌による死亡率を減少させることのみならず、ごく早期の食道癌を発見できる血液を用いたスクリーニング方法の確立は急務であると考えられる。

2. 研究の目的

R Kalluri らは、患者血清やマウスモデルにおいて、Glypican-1 は多くの癌種由来の血清 Exosome Marker であり、Glypican-1 陽性 Exosome の定量により癌診断が可能であることを報告している。またその中 Exosome 内に含有される KRAS の変異情報は原発腫瘍と完全に一致したと極めて興味深い報告がなされた。つまり、癌から分泌することが示された血清中 Glypican-1 陽性 Exosome 内はすでに原発腫瘍の遺伝子情報を極めて安定に包埋していることになる。一方で、癌原発巣における miRNAs 発現は癌種特異的プロファイリングをもつことが知られている。本研究の Primary endpoint は食道癌特異的な分泌型 Exosome 発現蛋白 X を同定し、その蛋白 X を用いて血清中蛋白 X 陽性 Exosome 量を用いることで早期癌診断が可能かどうか、さらに Secondary endpoint としてその血清中蛋白 X 陽性 Exosome のみを分離し、そこに包埋されている miRNAs 発現プロファイリングが原発巣のそれに代用できるかを検証することである。これが証明されれば、食道癌を含むあらゆる固形癌の非侵襲的な liquid biopsy による存在診断が可能となることが期待される。さらに本研究の Third endpoint として、これらのデータを利用し、食道癌内視鏡的切除後の癌遺残の有無を、蛋白 X 陽性 Exosome 量、もしくは血清蛋白 X 陽性 Exosome 包埋 miRNA 発現情報を用いて診断可能かを検証することである。この仮説が立証されれば、liquid biopsy による食道癌に対する低侵襲治療を提供することが可能となり、臨床的意義は計り知れないと考えている。

本研究は、食道癌特異的に分泌される Exosome に特異的に発現する蛋白 X を同定し、その蛋白 X 陽性 Exosome に包埋された遺伝子情報を解析することで、非侵襲的な Liquid biopsy による食道癌患者の診断から治療にわたる戦略を検証することである。まず癌特異的に分泌する蛋白を網羅的プロテオミクスから同定し、蛋白 X 陽性 Exosome 内の microRNAs プロファイリングを行い、癌種識別 Panel を作成することで、すべての固形癌種の正確な診断が可能だが、本研究は消化器癌の中でも食道癌診断特異的パネルを作成することを目的とする。さらに患者血清中から分離された血清蛋白 X 陽性 Exosome および Exosome 包埋 microRNA プロファイリングを用いて、内視鏡治療後の追加外科切除の可否を判定することを目指す。

3. 研究の方法

エキソソーム抽出

食道癌細胞株 (KYSE70, KYSE150, KYSE410, KYSE510, TE3)、食道正常細胞株 (Het 1A)、血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、その培養上清を回収、exosome 抽出キット (Wako) を用いて exosome の抽出を行った。

蛋白網羅的解析 (IP profiling)

上記にて食道癌細胞株 (KYSE70, KYSE150, KYSE410, KYSE510, TE3)、食道正常細胞株 (Het 1A)、血管内皮細胞 (HUVEC) 上清より抽出した exosome 由来蛋白を IP profiling にて網羅的解析を行い、その結果から、in silico で食道癌特異的かつ、その発現が細胞膜に局在している 14 種類

の候補蛋白を同定した。

免疫染色

候補蛋白に対し、食道がん切除標本を用いて免疫染色を行い、その局在と臨床的意義を評価した。

ELISA

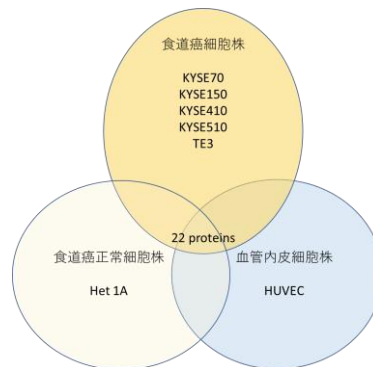
上記候補蛋白を標的とした ELISA キットを購入し、食道癌と健常人の術前血清を用いてその診断マーカーとしての意義を検討した。

In vitro 解析

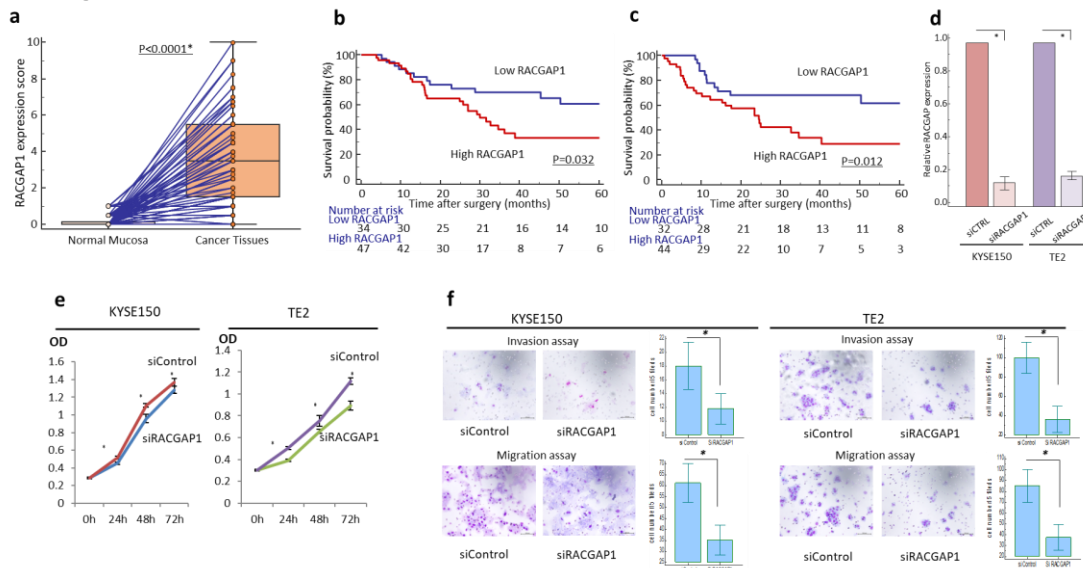
食道癌細胞株を使用し、候補蛋白を siRNA transfection で遺伝子発現抑制を行ったうえで、MTT assay、Invasion assay、migration assay などをおこない、遺伝子発現調節による phenotype の変化を評価した。

4. 研究成果

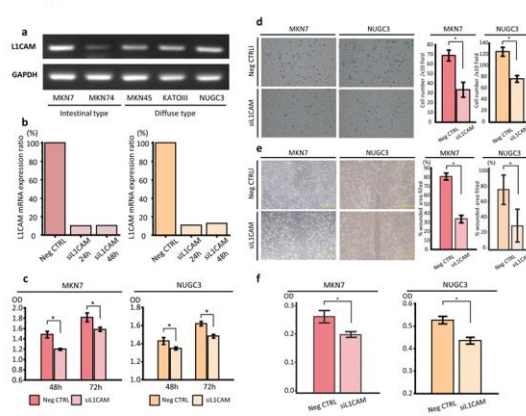
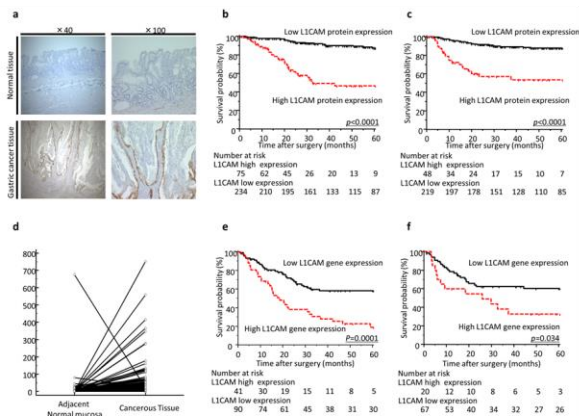
食道癌細胞株 (KYSE70, KYSE150, KYSE410, KYSE510, TE3)、食道正常細胞株 (Het 1A)、血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、その培養上清を回収、exosome 抽出キット (Wako) を用いて exosome の抽出を行った。またそれを用いて、網羅的蛋白解析 (IP profiling) を施行し、そのうえで、食道癌細胞株特異的に発現上昇する蛋白 22 蛋白を同定した。またさらに UniPlot などの In silico での解析を行い、その局在が細胞膜に存在しているものみに焦点を当て 14 蛋白を同定した。その 14 蛋白に対して、ELISA キットを使用し、血清濃度の測定を食道癌 100 例の術前血清を用い、こころみだが、残念ながら有意な結果は得られなかった。



また血清のみならず、がん組織に着目し、この研究に付随して、食道癌組織 81 例を用いた免疫染色解析を進め、そのなかで、Rac GTPase-Activating Protein 1 (RACGAP1) は食道癌組織特異的に発現上昇し、その高発現群は全生存期間・無再発生存期間における独立予後不良因子となることに加え、機能解析を行い、増殖能や浸潤能・遊走能、アノイキス抵抗性に関与することを明らかにした。



また本研究に付随して、胃癌での研究にも着手し、他癌腫でリンパ節転移に関連すると報告されている細胞接着分子 L1 cell adhesion molecule (L1CAM) に着目して、その発現解析を約 300 例の切除標本を用いた免疫染色で行うと、胃癌組織における L1CAM 高発現は、深達度やリンパ節転移、遠隔転移進展と相関し、また全生存期間、無再発生存期間における独立後不良因子となることを明らかにした。またこの結果は、fresh frozen sample を用いた遺伝子発現解析においても同様の臨床的意義を持つことが確認されたため、その機能解析を siRNA transfection を用いて行った。L1CAM 発現抑制した胃癌細胞株では、増殖能、遊走能、浸潤能が有意に抑制され、またアノイキス抑制性を解除することを明らかにした。また in vivo 解析においても L1CAM 抑制が、腹膜播種進展を抑制することが明らかとなり、有用な予後マーカーとなるのみならず、治療標的となりうる可能性を報告した (Ichikawa T, Okugawa Y, **Ohi M**, et al. Br J Cancer.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ichikawa Takashi, Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Tanaka Koji, Yin Chengzeng, Kitajima Takahito, Kondo Satoru, Shimura Tadanobu, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 121
2. 論文標題 Clinical significance and biological role of L1 cell adhesion molecule in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0646-8	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 Okugawa Y, Toiyama Y, Yamamoto A, Omura Y, Kusunoki K, Yin C, Ide S, Kitajima T, Koike Y, Fujikawa H, Yasuda H, Okita Y, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Araki T, Kusunoki M	4. 巻 50(3)
2. 論文標題 Modified neutrophil-platelet score as a promising marker for stratified surgical and oncological outcomes of patients with gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 223-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01873-y	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 Ohi M, Toiyama Y, Kitajima T, Shigemori T, Yasuda H, Okugawa Y, Fujikawa H, Okita Y, Yokoe T, Hiro J, Araki T, Kusunoki M	4. 巻 49(12)
2. 論文標題 Laparoscopic esophagogastrectomy using a knifeless linear stapler after proximal gastrectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 1080-1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01836-3	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 Yin Chengzeng, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Shigemori Tsunehiko, Yamamoto Akira, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Okita Yoshiki, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Yao Li, Kusunoki Masato	4. 巻 97
2. 論文標題 Rac GTPase-Activating Protein 1 (RACGAP1) as an Oncogenic Enhancer in Esophageal Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000500592	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 Ohi M, Toiyama Y, Omura Y, Ichikawa T, Yasuda H, Okugawa Y, Fujikawa H, Okita Y, Yoshiyama S, Hiro J, Araki T, Kusunoki M.	4. 巻 49(2)
2. 論文標題 Risk factors and measures of pulmonary complications after thoracoscopic esophagectomy for esophageal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today.	6. 最初と最後の頁 176-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-018-1721-0.	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 Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Narumi A, Ichikawa T, Ide S, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Araki T, Kusunoki M.	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 876-883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-018-07112-x	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大井正貴、市川 崇、安田裕美、吉山繁幸
2. 発表標題 食道癌手術における食道胃管吻合の縫合不全の検討と吻合法の標準化
3. 学会等名 .第72回日本胸部外科学会定期学術集会、京都
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大井正貴、市川 崇、今岡裕基、北嶋貴仁、安田裕美、横江 毅、藤川裕之、大北喜基、廣 純一郎、問山裕二、楠 正人
2. 発表標題 胸部食道癌に対するロボット支援下食道切除術における手技の工夫
3. 学会等名 第32回日本内視鏡外科学会総会、横浜
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
研究分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員 (14101)	
研究分担者	吉山 繁幸 (Yoshiyama Shigeyuki) (60444436)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	
研究分担者	安田 裕美 (Yasuda Hiromi) (60586767)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	
研究分担者	荒木 俊光 (Araki Toshimitsu) (70343217)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

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
---------	---------