

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08690

研究課題名(和文) 分泌型癌抑制microRNAを用いた消化器癌の治療感受性予測・核酸治療法の開発

研究課題名(英文) Development of microRNA-based liquid biopsy biomarkers and anticancer treatments in digestive system cancers

研究代表者

小松 周平 (Komatsu, Shuhei)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：40578978

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)：NCBIデータを用いて食道癌の癌抑制型microRNA候補群を網羅的に検索し、5種類の候補の解析から、食道癌患者血中で枯渇している癌抑制型miR-655に注目した。血中miR-655濃度低下は、食道癌患者の予後不良、リンパ節転移予測の新規バイオマーカーとして有用で、担癌マウスへのmiR-655皮下投与による血中miR-655の濃度回復で、腫瘍増殖・リンパ節転移抑制の抗癌核酸治療実現の可能性を示した(Molecular Cancer 2019)。また胃癌TS-1(5-FU)抗癌剤耐性の新規血中バイオマーカーmiR-1229-3pも同定し、Scientific Reports 2020に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現調節に関わるmicroRNAが体液中で安定していることに注目し、血中microRNAを指標とした消化器癌の次世代型バイオマーカー探索を行ってきた。今回、食道癌患者血中で枯渇している癌抑制型miR-655に注目し、予後、リンパ節転移予測の新規バイオマーカーとして有用であり、マウス皮下投与により血中miR-655の濃度回復で、腫瘍増殖・リンパ節転移抑制の抗癌核酸治療の可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Six candidates (miR-126, 133b, 143, 203, 338-3p, 655) of tumour suppressor miRNAs in ESCC were selected by a systematic review of NCBI database. Of these, miR-655 levels were significantly down-regulated in plasma of ESCC patients compared to healthy volunteers by test- and validation-scale analyses. Low levels of plasma miR-655 were significantly associated with lymphatic invasion, lymph node metastasis and advanced stage. Low level of plasma miR-655 was an independent risk factor of lymphatic progression and a poor prognostic factor. Overexpression of miR-655 in ESCC cells inhibited cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition. Increased plasma miR-655 levels by the subcutaneous injection significantly inhibited lymph node metastasis in mice. Low levels of miR-655 in plasma relate to lymphatic progression and poor outcomes, and the restoration of the plasma miR-655 levels might inhibit tumour and lymphatic progression in ESCC.

研究分野：リキッドバイオブシー、核酸治療

キーワード：microRNA リキッドバイオブシー バイオマーカー エキソソーム 遊離核酸 核酸治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現調節に関わる microRNA が、Argonaute2 や HDL などの特殊な蛋白と結合したり、エキソソームなどの vesicle に封入されたりして極めて高い安定性を獲得し、血液等の体液中に能動的に分泌され細胞間の情報伝達の重要なメディエーターとして働いていることが明らかとなっている。申請者は、従来の腫瘍マーカーへの限界を感じ、この分野での臨床応用を目指して血中 microRNA を指標とした、超早期診断、悪性度・予後診断、モニタリング診断、化学療法感受性診断に関わる食道癌、胃癌、膵癌、肝癌等の消化器癌の次世代のバイオマーカーの探索を行い 20 種類以上の候補の有用性を世界に先駆けて報告してきた (Br J Cancer 2010-2015、Gastroenterology 2012、Sci Rep 2020)。

これまで申請者らは、血中で高濃度に検出される癌遺伝子型 microRNA を中心に解析を進め報告してきたが、癌組織で発現低下している Let-7a や miR-375 などの一部の癌抑制遺伝子型 miRNA が、担癌患者の血中でも健常人より著しく濃度低下していることに早くから注目していた (Tsujiura M, Komatsu S et al. Br J cancer 2010, Komatsu S et al. Br J Cancer 2011, Kawaguchi T, Komatsu S et al. Br J Cancer 2013)。しかし、一方で初期のステージの癌や、ステージが進行した癌でも予後の良い癌においては、これらの癌抑制型 miRNA の血中濃度が有意に高いことにも注目した。(Komatsu S et al. Br J Cancer 2011, Komatsu S et al. Expert Opinion Biol Therapy 2012, Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S et al. Br J Cancer 2012)。

これらの結果から、“一部の癌抑制型 microRNA は正常細胞からも癌細胞の増殖抑制を目的として血中に分泌されるが、それらが枯渇することで癌の増殖、浸潤、転移などの悪性化、抗癌剤への耐性化が導かれる可能性がある。枯渇した一部の癌抑制型 microRNA を生体内に再導入し血中濃度を高く維持することで、抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果を得ることができる可能性がある”という仮説をたてた。この仮説に基づき、膵癌患者の血中の分泌型癌抑制 microRNA の網羅解析で、miR-107 が進行膵癌患者血中で枯渇し、予後予測の独立したバイオマーカーになることを報告した。また担癌マウスへの miR-107 の皮下投与により体液を介した抗癌核酸治療が可能であることも明らかにした。今回は他の消化器癌の血中癌抑制型 microRNA についても、知見が得られるか検証した。

### 2. 研究の目的

今回、これまでの研究結果と解析手法を基盤に新たに癌抑制型 microRNA に注目し、鋭敏な悪性度診断、抗癌剤感受性診断を可能とする血中の分泌型 microRNA を網羅的に探索する。更にこれらの microRNA を用いて体液を介した強力な抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果の実現可能とする新たな癌治療法の構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

以下の方法で、食道癌の新規の血中癌抑制型の同定を行った。

NCBI データを用いて食道癌の癌抑制型 microRNA 候補を網羅的に検索し、血中 microRNA の報告のない候補を選出した。

候補 miRNA 群の test scale 及び多数症例で validation study による悪性度、予後や転移形式の関与を評価した。

候補 miRNA の過剰発現により、食道癌細胞の増殖・遊走・浸潤抑制効果を評価した。

候補の癌抑制型 miRNA の機能解析として、リンパ節転移との関連に注目した。

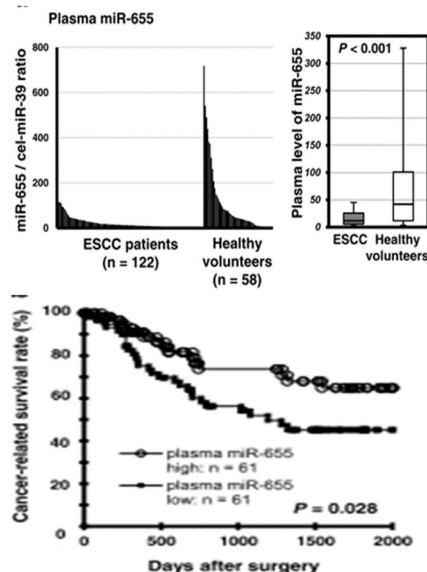
癌抑制型 miRNA を高濃度に血中・体液中で維持することによる抗腫瘍効果、リンパ節転移抑制効果を目的とした癌治療への応用にむけて、担癌マウスモデルで検証した。

### 4. 研究成果

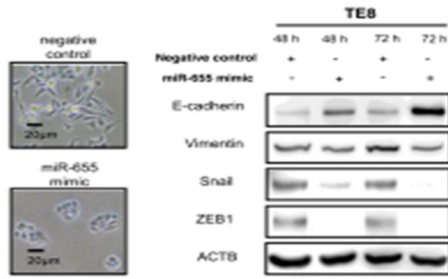
NCBI データベースによる網羅的解析により、miR-126, 133b, 143, 203, 338-3p, 655 の 5 種類の候補を選出した。

qRT-PCR による Test-scale 解析、Validation 解析により、健常人に比し膵癌患者で最も有意に低下している miR-655 を同定した

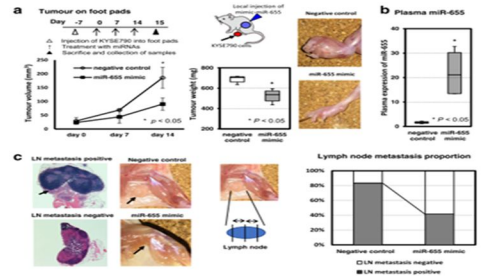
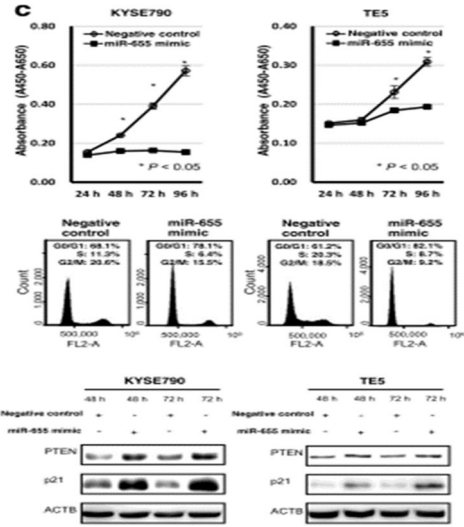
食道癌患者において miR-655 低濃度はリンパ節転移、リンパ管浸潤と有意に相関し、N 因子の進行と相関し、独立したリンパ節転移のリスク因子となった ( $P=0.001$ , OR 3.25)。また、独立した予後不良因子であった ( $p=0.021$ , HR=2.34)。



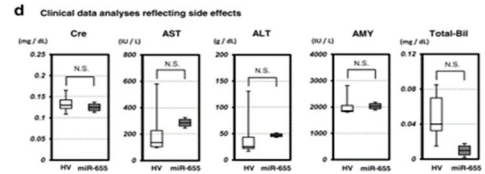
食道癌細胞株でmiR-655過剰発現はp21の発現誘導、G1/S arrestを伴う著しい細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が認められた。間葉上皮転化 (MET) を認めた。



食道癌細胞株を足底部に皮下移植したマウスに miR-655 を皮下投与したところ、コントロール群に比し有意な腫瘍抑制効果と血中濃度上昇が認められた。また、膝窩リンパ節への転移の抑制が認められた。

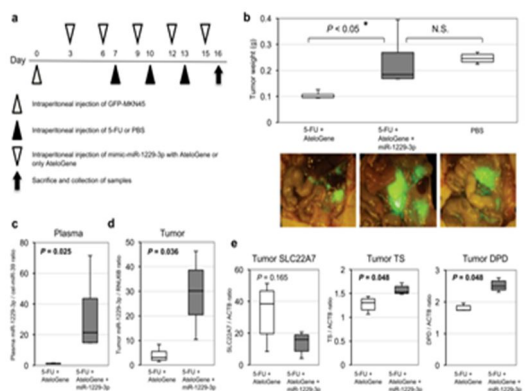
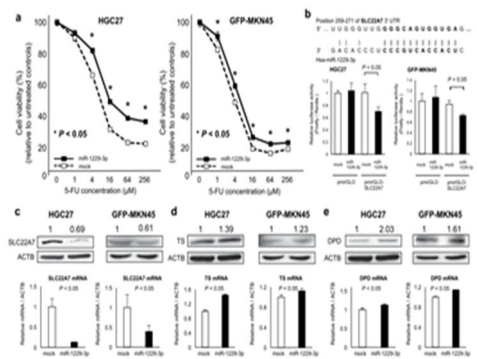
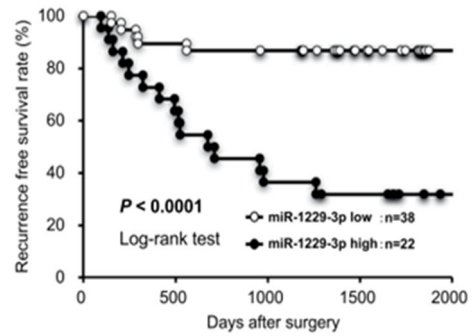
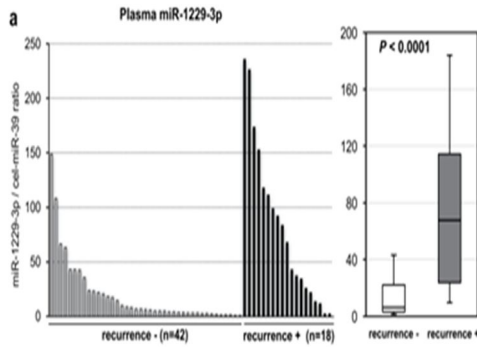


皮下投与モデルの副作用について評価したところ、肝機能や腎機能関連の血液データに異常を認めなかった。



血漿中miR-655は、食道癌の新規のバイオマーカーとしてのみならず、腫瘍増殖抑制やリンパ節転移抑制の抗がん核酸治療への応用も期待できることを明らかにした。本結果を Molecular Cancer 2019 に報告した。

また、胃癌の TS-1 (5-FU) 抗がん剤耐性に関連する新規の血中バイオマーカー miR-1229-3p も本科研費期間中で同定し、 Scientific Reports 2020 に報告した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishibeppu K, Komatsu S et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Plasma microRNA profiles: identification of miR-1229-3p as a novel chemoresistant and prognostic biomarker in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59939-8	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 Kiuchi Jun, Komatsu Shuhei, Imamura Taisuke, Nishibeppu Keiji, Shoda Katsutoshi, Arita Tomohiro, Kosuga Toshiyuki, Konishi Hirotaka, Shiozaki Atsushi, Okamoto Kazuma, Fujiwara Hitoshi, Ichikawa Daisuke, Otsuji Eigo	4. 巻 18
2. 論文標題 Low levels of tumour suppressor miR-655 in plasma contribute to lymphatic progression and poor outcomes in oesophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12943-018-0929-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Shuhei, Otsuji Eigo	4. 巻 3
2. 論文標題 Essential updates 2017/2018: Recent topics in the treatment and research of gastric cancer in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 581 ~ 591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishibeppu Keiji, Komatsu Shuhei, Ichikawa Daisuke, Imamura Taisuke, Kosuga Toshiyuki, Okamoto Kazuma, Konishi Hirotaka, Shiozaki Atsushi, Fujiwara Hitoshi, Otsuji Eigo	4. 巻 18
2. 論文標題 Venous invasion as a risk factor for recurrence after gastrectomy followed by chemotherapy for stage III gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-018-4052-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiuchi Jun, Komatsu Shuhei, Imamura Taisuke, Nishibeppu Keiji, Shoda Katsutoshi, Arita Tomohiro, Kosuga Toshiyuki, Konishi Hirotaka, Shiozaki Atsushi, Kubota Takeshi, Okamoto Kazuma, Fujiwara Hitoshi, Ichikawa Daisuke, Tsuda Hitoshi, Otsuji Eigo	4. 巻 8
2. 論文標題 Overexpression of YEATS4 contributes to malignant outcomes in gastric carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J cancer Res	6. 最初と最後の頁 2436 ~ 2452
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小松 周平、大辻 英吾
2. 発表標題 血中分泌型microRNAを用いた胃癌の抗がん剤感受性診断予測と抗がん核酸治療
3. 学会等名 第79回 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高嶋 佑助、小松 周平、大辻 英吾 他
2. 発表標題 分化・未分化混在型胃癌におけるmicroRNAを介した悪性化機序の解明
3. 学会等名 第79回 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西別府 敬士、小松 周平、大辻 英吾 他
2. 発表標題 胃癌術後の血小板増多は血小板由来分泌型miR-223を介し再発に関連する
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木内 純、小松 周平、大辻 英吾 他
2. 発表標題 消化器癌サルコペニアにおける血漿miR-133b濃度低下を介した腫瘍進行メカニズムとエクササイズによる抗腫瘍効果
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松 周平、大辻 英吾
2. 発表標題 血中分泌型癌抑制microRNAを用いたliquid biopsyによる新たな診断・核酸治療法の開発
3. 学会等名 第77回 日本癌学会総会
4. 発表年 2018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	大辻 英吾  (Otsuji Eigo)  (20244600)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (24303)	

	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	津田 均  (Tsuda Hitoshi)	防衛医科大学校・病態病理   (82406)	
研究 協力者	今村 泰輔  (Imamura Taisuke)	京都府立医科大学・医学研究科   (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	木内 純  (Kiuchi Jyun)	京都府立医科大学・医学研究科  (24303)	
研究協力者	西別府 敬士  (Nishibeppu Keiji)	京都府立医科大学・医学研究科  (24303)	
研究協力者	高嶋 佑助  (Takashima Yusuke)	京都府立医科大学・医学研究科  (24303)	
研究協力者	神谷 肇  (Kamiya Hajime)	京都府立医科大学・医学研究科  (24303)	

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