

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09650

研究課題名(和文)新規肉腫バイオマーカーを利用したリキッドバイオプシーの臨床応用

研究課題名(英文)Clinical significance of liquid biopsy using a novel biomarker for sarcoma

研究代表者

國定 俊之(Kunisada, Toshiyuki)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：80346428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜肉腫で特異的なMonocarboxylate transporter (MCT)を特定し、治療に応じて血中発現が変動することを見出した。このMCTの発現は他の癌腫・肉腫でも転移ならびに臨床予後との関連が報告されている。滑膜肉腫の病勢を高感度にモニターすることが可能となり、リキッドバイオプシーの標的として有望である。

粘液線維肉腫の患者血清・培養上清から特定の分泌型miRNAを特定した。肉腫由来exosomeに内包され、肉腫細胞自身に作用するのではなく、周囲正常細胞に作用することで易浸潤環境を作っていると考えられた。粘液線維肉腫に対する新規バイオマーカーとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜肉腫と粘液線維肉腫で、新しいバイオマーカーとなりうる疾患特異的な遺伝子異常や発現異常を発見した。エクソソームおよび内在するmiRNAを疾患特異的なバイオマーカーとして利用し、従来の診断法では難しかった肉腫の再発・転移に対して、新しい視点の早期診断法や新規治療法として発展させることが可能である。また、化学療法などの治療抵抗性の原因遺伝子や発現異常が同定できれば、治療成績が不良である肉腫患者の予後改善が期待できる。さらに、健常者を対象とした肉腫の超早期診断法の開発にも繋げたい。

研究成果の概要(英文)：We identified a specific monocarboxylate transporter (MCT) in synovial sarcoma and found that its expression in blood varied depending on clinical treatment. The expression of MCT has been reported to be associated with metastasis and clinical prognosis in other carcinomas and sarcomas. The MCT can be monitored with high sensitivity during the treatment of synovial sarcoma and is a promising target for liquid biopsy. We identified a specific secreted miRNA in serum and culture supernatants from patients with myxofibrosarcoma. The MCT is covered with sarcoma cell-derived exosomes and can lead to an invasive environment by acting on surrounding normal cells, rather than on the sarcoma cells themselves. This may be a novel biomarker for myxofibrosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：バイオマーカー 骨軟部腫瘍 肉腫 リキッドバイオプシー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Liquid biopsy とは、低い侵襲により採取可能な血液等の検体を用いて、検体中に漏出するがん由来 DNA、がん細胞、がん細胞が産生する物質等を検査しがんの超早期診断、再発や転移の早期発見・治療介入による予後改善、治療薬選択に必要ながんのゲノム変異を同定できる可能性などが期待されている。分子遺伝学的な解析技術を組み合わせ、従来の生検と同等以上の診断効果を目指しており、腫瘍由来エクソソーム、血中循環 RNA および DNA、血中循環腫瘍細胞を利用した手技が試みられてきたが、腫瘍由来エクソソームおよび血中循環 miRNA を利用した方法が従来の方法よりも優れた感度・特異度を示すことが明らかにされた。しかしながら、肉腫における疾患特異性が高いバイオマーカーの報告は少ない。

2. 研究の目的

肉腫による死因のほとんどは肺転移であり、未だその問題は解決されていない。肉腫の5年生存率は60~70%であり、再発・転移を認めた進行例に対する有効な治療法はまだ無い。そのため、再発・転移を早期診断することが予後を改善する可能性が高く、現在はCTやMRIを定期的にチェックすることで早期発見につなげている。本研究の目的は、肉腫の新しいバイオマーカーを発見し、肉腫患者の再発・転移を早期診断する手技を確立することである。また、これらの新しいバイオマーカーを分子生物学的解析することで、治療効果を示す指標(化学療法奏功性および抵抗性など)となる可能性も示せれば、患者の予後改善に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

ヒト血清および滑膜肉腫細胞株(Aska-SS、HS-SY-II、SYO-1、YaFuSS、Yamato-SS)よりエクソソームを単離した。単離方法として、細胞株培養上清からは超遠心法を、ヒト血清からはEVSecondを用いた。抽出したエクソソーム分画タンパク質をLC/MSにより網羅的に解析し、膜表面に発現する候補分子をwestern blotとsandwich ELISAで検証した。

粘液線維肉腫(MFS)患者、非MFS肉腫患者、健常人の血清RNAを用いてmicroarray解析を行った。細胞株はNMFH-1、NMFH-2、およびヒト間葉系幹細胞(hMSC)を用いた。患者血清、細胞株培養上清由来RNA、NMFH-1の担癌マウス血清由来RNAを用いてqRT-PCR解析を行い、MFSにおける分泌型miRNAを検討した。

当科で初回手術治療を行った粘液線維肉腫(MFS)症例、未分化多形肉腫(UPS)症例における治療前血清中CSF-1濃度を計測し、臨床病理学および腫瘍学的意義を検討した。ヒトMFS・UPS細胞株、マウス線維肉腫細胞株から培養上清へのCSF-1分泌を解析し、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)誘導の可否および動物モデルにおける腫瘍増大との関連性を解析した。

4. 研究成果

滑膜肉腫細胞株および患者血清中エクソソームは約100nmをピークとする小胞として検出された。LC/MS解析により健常人および滑膜肉腫患者以外の骨軟部腫瘍患者と比較し滑膜肉腫患者由来エクソソームで発現が高いMonocarboxylate transporter(MCT)を特定した。MCTは全滑膜肉腫細胞株由来エクソソームに発現が認められ、患者血清中エクソソームでも発現が確認された。術前術後ペア血清8検体においては、エクソソーム中のMCT発現は術前に比べ術後に有意に減少していた($p=0.03$)。またMCTは各細胞株自身にも発現を認め、SS組織11例中全例でもその発現が観察された。siRNAにより腫瘍細胞における発現を抑制したところ増殖能・浸潤能とも抑制され($p<0.001$)、悪性形質との関与も見出された。滑膜肉腫細胞ならびに患者血清由来エクソソーム表面に共通して発現するMCTを特定し、同分子を標的とする解析により治療に応じて血中発現が変動することを見出した。同分子の発現は他の癌腫・肉腫でも転移ならびに臨床予後との関連が報告されている。滑膜肉腫患者における新しい血中マーカーとして期待している。

Microarray解析により5種類、qRT-PCRにより5種類のうち3種類のmiRNAが健常人よりMFS患者の血清において有意に高く発現していた。さらに術後にも低下するmiRNAを選別した。このmiRNAはMFS細胞株培養上清、担癌マウス血清においてcontrolと比較し有意に発現が高く、腫瘍サイズと有意な相関関係を認めた。次に、MFS細胞株培養上清より抽出したexosome分画の解析を行い、これらを用いmigration assay、ヒト由来正常線維芽細胞(NF)を用いたinvasion assayによる機能解析を行った。MFS細胞株培養上清由来exosome分画においてもその発現は高かった。migration assayではexosome投与による肉腫細胞自身の移動能増加は認めなかったが、invasion assayではNFに腫瘍由来exosomeを暴露した群でコントロール群より肉腫細胞の浸潤性が増強された。MFSの患者血清・培養上清から分泌型miRNAを特定し、新規バイオマーカーとなりうる可能性が示された。さらにこのmiRNAは肉腫由来exosomeに内包されることが示され、肉腫細胞自身に作用するのではなく、周囲正常細胞に作用することで易浸潤環境を作っていると考えられた。すなわち腫瘍由来exosomeによるパラクライン効果の存在が示唆された。

治療前血中CSF-1濃度(pg/ml)はMFS 401.5、UPS 451.5であり、健常人の167.9に比べ有意に高値を示した($p=0.040, 0.003$)。各細胞株から培養上清へのCSF-1分泌は細胞数・培養時間依存

的に上昇した。マウス骨髄細胞をこれらの培養上清で培養すると、CD45+CD11b+CD206+細胞が enrich され TAM に分化誘導された。NFSa Y83 を接種したマウス血中 CSF-1 濃度は、接種前と比較し腫瘍増大に伴い有意に上昇し、腫瘍サイズと正の相関を示した。患者由来血中 CSF-1 高値は CD63+細胞 (p=0.020)、CD163+細胞 (p=0.045) の浸潤割合が高く、CSF-1 高値 (p=0.040/0.027)、単球割合高値 (p=0.008/0.028)、単球リンパ球比高値 (p=0.043/0.043) が無病生存率/無転移生存率における予後不良因子であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kunisada Toshiyuki, Nakata Eiji, Fujiwara Tomohiro, Hosono Ako, Takihira Shota, Kondo Hiroya, Ozaki Toshifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Soft-tissue sarcoma in adolescents and young adults	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-022-02119-7	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 Yokoo Suguru, Fujiwara Tomohiro, Yoshida Aki, Uotani Koji, Morita Takuya, Kiyono Masahiro, Hasei Joe, Nakata Eiji, Kunisada Toshiyuki, Iwata Shintaro, Yonemoto Tsukasa, Ueda Koji, Ozaki Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Liquid Biopsy Targeting Monocarboxylate Transporter 1 on the Surface Membrane of Tumor-Derived Extracellular Vesicles from Synovial Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1823 ~ 1823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13081823	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 Takuya Morita, Tomohiro Fujiwara, Aki Yoshida, Koji Uotani, Masahiro Kiyono, Suguru Yokoo, Joe Hasei, Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical relevance and functional significance of cell-free microRNA-1260b expression profiles in infiltrative myxofibrosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66120-8	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 畑 利彰, 藤原 智洋, 吉田 晶, 近藤 彩奈, 片山 晴喜, 佐藤 浩平, 近藤 宏也, 梶平 将太, 中田 英二, 国定 俊之, 尾崎 敏文
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージを誘導するCSF-1の分泌と血中発現の解析：浸潤性軟部肉腫における検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 演者名：近藤 宏也，田澤 大，久禮 美穂，藤原 智洋，佐藤 浩平，畑 利彰，中田 英二，国定 俊之，藤原 俊義，尾崎 敏文
2. 発表標題 骨肉腫における腫瘍関連マクロファージの役割とin vitro実験による検証
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suguru Yokoo; Tomohiro Fujiwara; Aki Yoshida; Koji Uotani; Takuya Morita; Masahiro Kiyono; Koji Demiya; Ryoji Joko; Hiroya Kondo; Shota Takihira; Joe Hasei; Eiji Nakata; Toshiyuki Kunisada; Takahiro Ochiya; Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 Establishment Of Liquid Biopsy Targetting Exosomes Derived From Synovial Sarcoma
3. 学会等名 2020 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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