

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08360

研究課題名(和文) miRNAによる食道扁平上皮癌の化学放射線療法感受性予測システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of a system by miRNA analysis to predict prognoses of cases with esophageal squamous cell carcinoma treated by chemoradiotherapy.

研究代表者

大沼 啓之(Ohnuma, Hiroyuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60582997

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)：ドセタキセル、ネダプラチン、5-FU併用化学放射線療法を施行した食道癌症例の治療前miR-625-3pを検討し、感受性例での血清・組織miRNA発現亢進を確認した。食道癌細胞株に対し、miR-625-3p mimicとinhibitorを導入し薬剤感受性を検討したところ、ドセタキセルおよび放射線照射において、miR-625-3p導入による増殖抑制効果が認められた。MAP3K1の発現をwestern blottingにて確認したところ、TE-8、TE-10、TE-13においてmiR-625-3p導入株での発現抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌に対する化学放射線療法の効果予測マーカーとして確立したものは未だなく、リキッドバイオプシーとして血液由来のmiRNAがマーカーとして使用できれば、臨床応用可能なものとなる可能性がある。治療前に化学放射線療法の反応性が予測できれば、低感受性例に対しては手術を第一選択、高感受性例では化学放射線療法を行うといった治療の最適化が可能となり、患者への恩恵は多大である。さらに、miR-625の機能解析を行い標的遺伝子・分子を見出し耐性獲得機構を明らかとすることで、耐性克服を目指した新規治療標的発見の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed miR-625-3p level in serum and FFPE of patients who received CRT using docetaxel, nedaplatin, and 5-FU and revealed the increased miRNA expression. Then, we demonstrated growth suppression in cells treated with docetaxel or radiation by miR-625-3p induction. We found decreased expression of MAP3K1 in TE-8, TE-10, and TE-13 cells induced with miR-625-3p.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：食道癌 化学放射線療法 放射線感受性 薬剤感受性 miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における切除可能病期 II/III 食道扁平上皮癌(ESCC)に対する根治的化学放射線療法(chemoradiation therapy: CRT)は、標準治療である術前化学療法+手術に比し全生存期間に劣る傾向にあり、耐術不能・手術拒否例に対するオプションとしての位置づけに留まっている。本邦の CRT は 5-FU+cisplatin の併用が標準的に使用されているが、申請者らは 5-FU+nedaplatin+docetaxel・放射線併用療法(DNF-R)の第 I/II 相試験を行い、優れた抗腫瘍効果、安全性と、historical control としての術前化療+手術成績と遜色ない良好な無増悪生存、全生存期間を確認し、同療法が手術を代替する可能性を見出した(図 1, Ohnuma ら, Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015)。食道温存が可能で良好な QOL を確保できる CRT が手術に劣らない成績を示すことができれば新たな標準治療となりうるが、CRT と手術という全く方法論やリスクの異なる治療 modality を用いたランダム化試験が成立することは困難であり、現に本邦で行われた I 期 ESCC に対する CRT vs 手術の比較試験(JCOG0502 試験)におけるランダム化部分は集積不良のため中止となっている。以上の背景より、食道癌は患者毎に最適な治療選択を行う precision medicine の確立が特に求められる癌種といえるが、これまで臨床応用された治療効果予測マーカーはない。

MicroRNA が癌の薬剤・放射線感受性に関与し、有望な効果予測マーカーの候補であることがいくつかの癌種において報告されているが、ESCC に対する CRT における miRNA の関与の意義は明らかではない。申請者らは以前、CRT を施行した ESCC 症例を対象に、CRT 感受性群、非感受性群それぞれの治療前生検検体 FFPE ブロック miRNA の網羅的発現解析を 2565 種類のプローブセットを用いたマイクロアレイで行い、CRT 感受性に関連する miRNA を検討した。クラスタリングをヒートマップ表示すると感受性群と非感受性群において大きな差が見られ、8 つの miRNA が感受性群において 10 倍以上の発現差をもって有意に発現亢進していることを見出した。これらのうち miR-625-3p は ESCC で過剰発現しており、その down-regulation が Sox2 の発現亢進を介し ESCC の浸潤 転移を亢進されることが報告されている(Hiyoshi ら, FEBS Lett 2014)。また近年、放射線治療誘導性の上皮間葉転換(Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT)と放射線抵抗性との関連が指摘されているが、胃癌や大腸癌、さらに ESCC と分子生物学的背景が類似した頭頸部癌など複数の癌種において miR-625 が EMT 阻害活性を示すことが報告されている。さらに薬剤耐性との関連においては、miR-625 が ALDH1A1 等を標的とし多剤耐性に関与することが胃癌、大腸癌、白血病細胞株において示されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、前述のこれまでの研究結果と解析手法を基盤に、ESCC における CRT 効果予測マーカーおよび新規治療標的の候補として miR-625-3p に注目し、その CRT 効果予測マーカーとしての妥当性の検証を行うと共に、機能解析を行い標的遺伝子・分子を見出し耐性獲得機構を明らかとすることで、耐性克服を目指した新規治療標的を見出すこと目的とする。

将来の臨床応用を目指し、組織と比しより簡便に安定した miRNA が得られる血清中の miR-

625-3p も検討し、組織中 miRNA との相関を検討する。

ESCC に対する CRT の効果予測マーカーとして確立したものは未だなく、リキッドバイオプシーとして血液由来の miRNA がマーカーとして使用できれば、臨床応用可能なものとなる可能性がある。治療前に CRT の反応性が予測できれば、低感受性例に対しては手術を第一選択、高感受性例では CRT を行うといった治療の最適化が可能となり、患者への恩恵は多大である。

### 3. 研究の方法

令和2年度

#### (1) 定量的 PCR による validation study

CRT 施行症例の感受性群、非感受性群それぞれの治療前血清 miR-625-3p 発現を定量的 PCR にて確認する。CRT のレジメンは我々の既報に則り DNF-R 療法を行う(Int J Radiat Oncol Biol Phys 2015)。CRT 終了後の画像所見を用いた RECIST v1.1 判定基準により効果判定を行い、全症例を奏効群(RECIST にて最良総合効果 CR)と非奏効群(CR 以外)の2群に分類する。奏効群のうち、CRT 後6ヶ月間無再発であった症例を感受性群、奏効群のうち CRT 後6ヶ月以内に再発した症例および非奏効群をあわせて非感受性群とする。既に使用同意を得た患者血漿各群20例分の検体を用い、血漿400 $\mu$ l から抽出した total RNA より、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて逆転写し、TaqMan microRNA Assay をプロトコールに従い実施する。miRNA のプライマーは miR-625-3p (Assay ID 002432)を用い、内在性コントロールとして RNU6B で補正する。データ解析は比較 Ct 法を用いる。

#### (2) 腫瘍 miR-625-3p 発現レベルの解析

感受性群、非感受性群それぞれの治療前生検検体癌組織 FFPE ブロックよりパラフィンスライドを作成。次いで RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)を用い、癌部組織からトータル RNA の抽出を行った後、上述の方法にて qRT-PCR を行う。

#### (3) 血漿・組織間 miR-625-3p 発現相関の解析

上記 , で得られた miR-625-3p 定量値の相関関係を Spearman 's correlation 解析にて検討する。

#### (4) In vitro における miR-625-3p の薬剤・放射線耐性に関する機能解析

分化度の異なる5種類の ESCC 細胞株(TE-1, TE-5, TE-8, TE-10, TE-13)に対し, mirVana® miRNA mimic/inhibitor (Ambion)にて各々作成した miR-625-3p mimic と inhibitor を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用い導入する。発現は qRT-PCR にて確認する。導入96時間後の細胞を用いて、薬物耐性については5-FU, nedaplatin, docetaxel を様々な濃度(1-256 $\mu$ M)で添加・培養し、放射線感受性については細胞放射線照射器 M100W( Softex )にて照射(1-8Gy)を行ない、48~72 時間後に MTT assay にて増殖抑制効果を検討する。

次年度以降

#### (1) miR-625-3p 標的遺伝子の探索

miRNA は標的 mRNA を認識し、その翻訳を負に制御し遺伝子発現調節に関わる。miRNA 発現量のプロファイリングに加えて、標的 mRNA を探索し miRNA-mRNA の関係性を考慮することで、耐性機序解明とより頑健なバイオマーカーの確立を目指したい。そこでオンラインソフトウェア miRDB の target mining mode を用いて miR-625-3p の標的遺伝子候補を解析したところ、表2に示す上位

20 の標的遺伝子が抽出された。このうち食道癌の増殖や、癌の薬剤耐性への関与が報告されている MAP3K1 に注目した。miR-625-3p により MAP3K1 の発現が制御されているかを、前述の miR-625-3p mimic および inhibitor 用い、MAP3K1 発現の相関を qRT-PCR および western blotting にて確認する。プライマーとして PrimePCR™ Probe Assay: MAP3K1 (Bio-Rad)、抗体として anti-MAP3K1 Ab (abcam) を使用する。更に、直接的に MAP3K1 を siRNA (Thermo Fisher) により阻害することで薬剤耐性が変化するかを検討する。

(2) 前向きコホートによる miR-625-3p の CRT 感受性、予後への関与の評価

CRT 施行予定症例の治療前血漿の miR-625-3p レベルを測定し、CRT を完遂した症例の治療感受性、PFS、OS を追跡する。年齢、T 因子、N 因子などの臨床病理学的因子に加えて、miR-625-3p を変数に加えてロジスティック回帰分析による多変量解析を行い、CRT 感受性に関与する因子を見出す。生存に相関する因子については Cox 比例ハザード分析にて解析する。年間予定症例数は 30 例である。

#### 4. 研究成果

(1) 12 例の進行食道癌症例に DNF-R 療法を行い、感受性群 8 例、非感受性群 4 例であった。各患者血漿から抽出した total RNA を用いて miR-625-3p の定量を行った結果、感受性群において有意差は得られなかったものの発現亢進を認めた。

(2) 上記の患者コホートにおける治療前の生検検体癌組織 FFPE ブロックよりパラフィンスライドを作成し、次いで RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion) を用い抽出した total RNA を用いて qRT-PCR を行った。結果、血漿 RNA 同様に感受性群での有意な発現亢進を認めた。さらに血漿・組織間 RNA 量は、Spearman 相関係数 0.071 で有意確率が 0.101 と有意ではないものの正の相関が示唆された。

(3) mirVana® miRNA mimic/inhibitor にて miR-625-3p mimic と inhibitor 作成し、ESCC 細胞株 TE-1, TE-5, TE-8, TE-10, TE-13 に対し Lipofectamine RNAiMAX を用い導入し、その発現亢進・低下を qRT-PCR にて確認した。各細胞株により導入後発現が peak に至る時間が異なったため、各導入 24, 48, 96 時間後の細胞を用いて、5-FU、ネダプラチン、ドセタキセルを様々な濃度 (1-128  $\mu$ M) で転写・培養後に MTT assay を行った。miRNA 非導入細胞では各薬剤において濃度依存性に細胞死が誘導されたが、miR-625-3p 導入細胞株ではドセタキセル添加群において抗腫瘍効果は増強された一方 (TE-5, TE-10 では有意差あり)、inhibitor 導入株では増強効果は見られなかった。

(4) miR-625-3p mimic/inhibitor 導入細胞株における miR-625-3p 標的遺伝子の候補 MAP3K1 の発現を western blotting にて確認したところ、TE-8, TE-10, TE-13 において miR-625-3p 導入株での発現抑制が確認され、MAP3K1 発現が miR-625-3p に制御されている可能性が示唆された。

現在、miR-625-3p の放射線感受性への関与を検討すべく miR-625-3p mimic/inhibitor 導入細胞株に照射 (1-8Gy) を行ない、MTT assay にて増殖抑制効果を検討している。前向きコホートによる DNF-R 施行症例の血漿 miR-625-3p レベルに基づく予後への関与の評価は 4 例登録中だが、これまで全例が無増悪生存中であり、非感受性例の症例追加には時間を要すると思われた。今後も引き続き検討予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 佐藤昌則
2. 発表標題 進行食道癌に対するdocetaxel, nedaplatin, 5-fluorouracil, 放射線併用療法 (DNF-R)による根治的化学放射線療法の第I/II相試験 - アップデート解析-
3. 学会等名 第129回日本消化器病学会北海道支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早坂 尚貴
2. 発表標題 Stage III食道癌に対するdocetaxel, nedaplatin, 5-FU (DNF) 3剤併用療法を用いた集学的治療戦略: NAC or CRT?
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼啓之
2. 発表標題 切除可能進行食道癌に対する三剤併用療法ベースの化学放射線療法は手術療法を代替できるか?: 傾向スコアマッチング分析
3. 学会等名 第128回日本消化器病学会北海道支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼啓之
2. 発表標題 切除可能進行食道癌に対する三剤併用療法ベースの化学放射線療法は手術療法を代替できるか?: 傾向スコアマッチング分析
3. 学会等名 第128回日本消化器病学会北海道支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼啓之
2. 発表標題 Stage IVa食道癌に対するdocetaxel, nedaplatin, 5-fluorouracil, 放射線併用療法 (DNF-R)による根治的化学放射線療法 - 長期予後解析と救済療法を含めた至適治療の検討 -
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022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	久保 智洋 (Kubo Tomohiro)  (00634669)	札幌医科大学・医学部・助教  (20101)	
研究分担者	加藤 淳二 (Kato Junji)  (20244345)	札幌医科大学・医学部・教授  (20101)	

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