

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09078

研究課題名(和文) 食道癌における癌特異的 transfer RNA 断片の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and function analyses of novel cancer-specific transfer RNA fragments in esophageal cancer

研究代表者

浜井 洋一 (Hamai, Yoichi)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：90423384

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)：本研究は低酸素環境で培養した食道癌細胞株と食道癌患者の血清を用いてエクソソーム内のsmall RNAを網羅的に解析し、癌患者で特異的に発現しているTransfer RNA fragments (tRF)を同定し、機能解析を行うことを目的としている。

食道癌細胞株の培養上清のエクソソームからRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的small RNA発現解析を行った。低酸素環境下において有意に発現が変化するmicro RNAs (miRNA)およびtRFを抽出し、これらの発現上昇・抑制株を作製。これらを用いて細胞浸潤・遊走能および種々の抗がん剤感受性についての機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、tRFは多様な生物活性を有し、様々な細胞プロセスに関与することが報告されている。tRFは細胞の種類や疾患状態に高度に依存しているため優れたバイオマーカーになると考えられるが、その機能はまだまだ不明な点が多い。本研究は実際に治療を行った癌患者の検体を用いtRFの選定を行う点、そこで同定された新規tRFの機能解析を行うことで新たな癌の分子機構を解明する点が、既存の報告にはない特徴である。本研究で得られた結果は臨床応用に直結し、多くの癌患者にとって有益になる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to analyze the functions of micro RNA (miRNA) and transfer RNA fragments (tRFs), which were specifically identified in blood serum of esophageal cancer patients and were also significantly associated with the various expressions of RNA extracted from culture supernatant for esophageal cancer cell lines in hypoxic environment. We conducted the comprehensive small RNA expression analysis for these esophageal cancer cell lines cultured in hypoxic environment, and some distinguishing miRNAs and tRFs were identified. The cell lines, which were increased or decreased these small RNA expressions, were made for subsequent evaluations of small RNA (miRNAs and tRFs) functions. We subsequently assessed the various cancer specific functions of these miRNAs and tRFs, such as anticancer drug sensitivity, invasive capacity and migration capability, in these esophageal cancer cell lines.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 Small RNA Micro RNA Transfer RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行食道癌には化学療法や放射線療法および手術を含めた集学的治療がなされるが、いまだに予後不良である。食道癌の治療成績向上のためには、癌の悪性化や治療感受性機構のさらなる解明、それを基にした新規バイオマーカーの同定と治療開発が急務である。

Small ribonucleic acid (RNA)は蛋白質をコードしない約 20~30 塩基の RNA の総称で microRNA (miRNA), short interfering RNA, piwi-interacting RNA などがある。miRNA は messenger RNA に結合し遺伝子発現を制御することで、癌の発生・進展・転移・治療耐性に密接に関わっているが、small RNA には機能が未知のものが多数存在する。これらの small RNA は癌細胞からエクソソームに内包された状態で血中に放出されるため、血液検体での評価が可能である。

我々は健康人と食道・肺・乳癌患者、それぞれ約 50 例において、血清中の small RNA を次世代シーケンサーで網羅的に検出・比較し癌に特異的な発現を示す新規 small RNA を多数同定した。この中に多くの transfer RNA (tRNA) 断片 (tRNA fragment: tRF) が含まれていた。候補となる tRF-X, tRF-Y は健康者と比較し食道癌患者において有意に発現が上昇し、乳癌患者全 51 例においても有意な発現上昇を認めた。

Transfer RNA は通常、蛋白合成においてアミノ酸をリボソームに運搬する役割を担うが、機能を発揮するには全長が保たれている必要がある。これまで、その断片である多様な tRF が細胞内や血液内に存在することが知られていたが、機能を有さないものと考えられていた。しかし近年、tRF には miRNA とは異なる働きがあり、様々な細胞プロセスに関与していることが示され大きな関心を集めている。低酸素環境下にある乳癌細胞で tRF (tRNA [Glu, Asp, Gly, Tyr] 由来) が蓄積し、Y-box binding protein 1 に結合することで癌の増殖・転移を制御する。(Goodarzi H, et al: Cell 2015;161:790-802) また乳癌細胞株において低酸素環境で誘導された化学療法抵抗性に tRF (tRNA [Gly] 由来) が関与している。(Cui Y et al. J Cell Physiol. 2019;234:8740-51) さらにアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて特定の tRF (tRNA [Gly] 由来) レベルを低下させるとマウス肝腫瘍の増殖が低下する。(Kim HK, et al: Nature 2017;552:57-62)

癌組織の内部は低酸素状態にあり、低酸素環境は癌の増殖・転移能や治療抵抗性の獲得に密接に関連している。上記の知見から、この過程に tRF が関与し治療標的となると考えられる。また、これまでの我々の研究結果から、なぜ癌患者の血清で tRF の発現異常があるのか、tRF と癌の関わりを明らかにすることで、その意義を解明する必要があると考えた。本研究により tRF の新規分子マーカー・治療標的としての有用性を解明する。

2. 研究の目的

tRF が様々な疾患の細胞プロセス(アポトーシス、蛋白合成、翻訳調節など)に関与するといった in vitro での報告が散見され、癌との関係も示唆されているが、その詳細な機能や臨床検体(血液、癌組織)での発現の意義は全く解明されていない。本研究は、低酸素環境下で培養した食道癌細胞株を用いて、特に tRF に着目し small RNA の網羅的解析を行う。また食道癌組織および患者血清から同定した tRF と比較することで、食道癌の悪性度(低酸素環境で獲得された増殖・浸潤能・細胞死耐性・治療抵抗性)とともに、実際の食道癌患者の臨床病理学的因子、治療効果および予後と関わる tRF を特定する。さらに、その機能解析を行うことで tRF が関わる新たな癌の浸潤・転移および治療感受性機構をより深く解明することを目的としている。

臨床検体を用いて機能が未知の tRF を同定し、その機能解析を行うことで、癌患者血清における tRF の発現異常の意義を検証することに本研究の先進性と独自性がある。得られた結果は食道癌のみならず、多くの癌の基礎的研究とともに臨床の場において非常に貴重なものとなる。

3. 研究の方法

(1) 低酸素下における食道癌細胞株培養上清での網羅的 small RNA 解析による候補 tRF の同定。

(2) 食道癌組織および患者血清における small RNA の比較による候補 tRF の選定。

(3) 患者血清で候補 tRF を定量的 RT-PCR で再評価し、癌との関係を確認・検証する。

(4) バイオマーカーとして特定された癌特異的 tRF の機能解析を行う。

食道扁平上皮癌細胞株 TE-1、TE-11、TE-14 を低酸素ワークステーションにおいて培養する。細胞増殖、HIF-1 発現の測定を行い低酸素環境への適応を評価し、浸潤・遊走能、種々の抗癌剤感受性の変化を確認する。この培養上清に放出されたエクソソーム-HO (hypoxia) と通常酸素環境下のエクソソーム-NO (normoxia) を exosome isolation kit (Invitrogen 社) にて回収する。これらエクソソームから内包 RNA を抽出する。

次世代シーケンサー (Ion Proton, Thermo Fisher Scientific 社) を用いて small RNA の網羅的解析を行う。低酸素環境ストレス下において有意に発現が変化する miRNA および tRF を抽出する。これまで解析してきた食道癌患者の血清エクソソームで同定された tRF と食道癌切

除組織から抽出した RNA での tRF 発現を比較することで、癌組織に発現し、進行度や予後、化学・放射線療法の治療効果に関わり、治療過程で発現が変化する候補 tRF を選定する。

新たな多数の食道癌患者血清を用いて、上記行程の結果を統合解析し候補となった tRF を定量的 RT-PCR にて再評価し、臨床病理学的因子や化学・放射線療法の治療効果、予後との相関を確認・検証する。低酸素環境で発現変化を示す tRF と患者血清および組織での tRF で一致するものがない場合でも、それぞれで特定された tRF を RT-PCR で評価することで候補 tRF を絞り込む。

特定された tRF について癌特異的な機能解析を行う。特定された癌特異的 tRF の高発現および低発現細胞株を使用する。tRF をプラスミドにより細胞株に導入し tRF の発現を上昇させる。また RNA インヒビターにより発現抑制細胞株も作製し使用する。これらの食道癌細胞株を用いて、以下の通り tRF の機能解析を行う。

(1) Cell invasion assay, Cell migration assay にて細胞浸潤・遊走能について比較検討する。種々の抗癌剤の感受性について MTT assay にて比較検討する。

(2) 抗がん剤感受性については、複数の薬剤に対する耐性細胞株も作製し、tRF 発現の変化を解析する。

(3) tRF のターゲット分子を予測し、ターゲット分子の上・下流の遺伝子と蛋白質発現の変化を解析する。

(4) tRF に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞機能(浸潤・遊走能、薬剤感受性とともに入アポトーシス)の変化を解析する。

(5) 細胞株をヌードマウスに移植し xenograft モデルで、in vivo での癌機能解析(増殖・転移能)および抗癌剤やアンチセンスヌクレオチドの感受性解析にも発展させる。

以上より、tRF が癌の悪性化と治療耐性に関わっているか、新たな分子機構を解明し、分子マーカーとしての有用性と核酸医薬の治療標的としての可能性を評価する。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株の培養上清のエクソソームから内包 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて small RNA の網羅的発現解析を行った。低酸素環境ストレス下において有意に発現が変化する miRNA および tRF を抽出し、これまで解析してきた食道癌患者の血清で同定された tRF と食道癌切除組織から抽出した RNA の tRF 発現を比較した。これにより食道癌の臨床病理学的因子や化学・放射線療法の治療効果と相関する候補 tRF を選定した。これらの tRF を細胞株に導入し発現上昇株を作製。また RNA インヒビターにより発現抑制細胞株も作製した。

現在までに、これらの食道癌細胞株を用いて細胞浸潤・遊走能および種々の抗がん剤感受性について解析を行った。また食道癌で発現が低下している細胞老化誘導 miRNA を同定し、細胞株への導入により増殖抑制効果を示すことを確認し、さらなる機能解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hamai Y, Emi M, Ibuki Y, Kurokawa T, Yoshikawa T, Ohsawa M, Hirohata R, Murakami Y, Nishibuchi I, Imano N, Nagata Y, Okada M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Distribution of Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Trimodal Therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 1798-1807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09106-0	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 Hirohata R, Hamai Y, Emi M, Kurokawa T, Yoshikawa T, Ohsawa M, Tadokoro K, Okada M.	4. 巻 51
2. 論文標題 Prediction of the tumor response and survival based on computed tomography in esophageal squamous cell carcinoma after trimodality therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 1496-1505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02277-7	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 Hamai Y, Emi M, Ibuki Y, Kurokawa T, Yoshikawa T, Hirohata R, Ohsawa M, Kitasaki N, Okada M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Comparison of Open and Thoracoscopic Esophagectomy in Patients With Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Neoadjuvant Therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 3011-3021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.15083	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 Hamai Y, Hihara J, Emi M, Ibuki Y, Kurokawa T, Yoshikawa T, Hirohata R, Ohsawa M, Kitasaki N, Okada M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Prospective Randomized Trial of Early Postoperative Enteral and Total Parenteral Nutrition for Treating Esophageal Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6237-6246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.15444	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 Ibuki Yuta, Nishiyama Yukie, Tsutani Yasuhiro, Emi Manabu, Hamai Yoichi, Okada Morihito, Tahara Hidetoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Circulating microRNA/isomiRs as novel biomarkers of esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231116	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 Hamai Yoichi, Emi Manabu, Ibuki Yuta, Murakami Yuji, Nishibuchi Ikuno, Nagata Yasushi, Furukawa Takaoki, Kurokawa Tomoaki, Ohsawa Manato, Yoshikawa Toru, Okada Morihito	4. 巻 27
2. 論文標題 Predictions of Pathological Features and Recurrence Based on FDG-PET Findings of Esophageal Squamous Cell Carcinoma after Trimodal Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4422 ~ 4430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08609-0	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 KUROKAWA TOMOAKI, HAMAI YOICHI, EMI MANABU, IBUKI YUTA, YOSHIKAWA TORU, OHSAWA MANATO, HIROHATA RYOSUKE, OKADA MORIHITO	4. 巻 40
2. 論文標題 Risk Factors for Recurrence in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Without Pathological Complete Response After Trimodal Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4387 ~ 4394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14442	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 Hamai Yoichi, Emi Manabu, Ibuki Yuta, Kurokawa Tomoaki, Yoshikawa Toru, Ohsawa Manato, Hirohata Ryosuke, Murakami Yuji, Nishibuchi Ikuno, Imano Nobuki, Nagata Yasushi, Okada Morihito	4. 巻 28
2. 論文標題 Distribution of Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Trimodal Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1798 ~ 1807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09106-0	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 Ochi Masanori, Murakami Yuji, Nishibuchi Ikuno, Kubo Katsumaro, Imano Nobuki, Takeuchi Yuki, Kimura Tomoki, Hamai Yoichi, Emi Manabu, Okada Morihito, Nagata Yasushi	4. 巻 62
2. 論文標題 Long-term results of definitive chemoradiotherapy for unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 142 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa110	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 Ohsawa M, Hamai Y, Emi M, Ibuki Y, Kurokawa T, Yoshikawa T, Hirohata R, Kitasaki N, Okada M	4. 巻 42
2. 論文標題 Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a Predictor of Postoperative Recurrence and Prognosis in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1499-1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15622	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 Hirohata Ryosuke, Hamai Yoichi, Hihara Jun, Emi Manabu, Kurokawa Tomoaki, Yoshikawa Toru, Ohsawa Manato, Kitasaki Nao, Okada Morihito	4. 巻 46
2. 論文標題 Evaluation of Neoadjuvant Chemoradiotherapy Followed by Surgery for Borderline Resectable Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 1934 ~ 1943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-022-06568-z	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 Hamai Yoichi, Emi Manabu, Ibuki Yuta, Murakami Yuji, Nishibuchi Ikuno, Nagata Yasushi, Kurokawa Tomoaki, Yoshikawa Toru, Hirohata Ryosuke, Ohsawa Manato, Kitasaki Nao, Okada Morihito	4. 巻 172
2. 論文標題 Prognostic value of quantitative parameters for esophageal squamous cell carcinoma determined by preoperative FDG-PET after trimodal therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 584 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2022.03.034	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 Ohsawa Manato, Hamai Yoichi, Emi Manabu, Ibuki Yuta, Kurokawa Tomoaki, Yoshikawa Toru, Hirohata Ryosuke, Kitasaki Nao, Okada Morihito	4. 巻 36
2. 論文標題 Blood biomarkers as predictors of pathological lymph node metastasis in clinical stage T1N0 esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diseases of the Esophagus	6. 最初と最後の頁 doac042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dote/doac042	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 HAMAI YOICHI, EMI MANABU, IBUKI YUTA, KUROKAWA TOMOAKI, YOSHIKAWA TORU, OHSAWA MANATO, HIROHATA RYOSUKE, KITASAKI NAO, OKADA MORIHITO	4. 巻 42
2. 論文標題 Correlation Between Tumor Uptake on FDG-PET and Malignant Features in Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6037 ~ 6045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.16115	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
---------------------------	-----------------------	----

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