

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 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：2013～2015

課題番号：25462022

研究課題名(和文) microRNA制御を応用した新しい食道癌化学放射線療法の開発

研究課題名(英文) Chemoradiotherapy for esophageal cancer using down-regulation of micro RNA

研究代表者

檜原 淳(Hihara, Jun)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：10322744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌化学放射線療法における腫瘍特異的免疫反応の役割に着目し、miR-222およびmiR-339を抑制することで腫瘍局所の抗腫瘍免疫反応を増強し、化学放射線療法の治療効果増強について検討した。食道扁平上皮癌細胞株において、miR-222、miR-339をdown-regulateすることで、ICAM-1の発現が増強する可能性が示唆された。T細胞浸潤の認められる食道癌においては、本研究で示されたmiR-222およびmiR-339をターゲットにした治療による化学放射線療法の効果増強が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumor-specific immunoreaction may play an important role in chemoradiotherapy for esophageal cancer. In esophageal squamous cell carcinoma cell lines, down-regulation of miR-222 and miR-339 might has a potential to up-regulate ICAM-1 expression. These micro RNAs might be candidates for molecular targets to enhance anti-tumor effect in chemoradiotherapy for esophageal cancer with T-cell infiltration.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌

1. 研究開始当初の背景

micro RNA(miRNA, miR)は長さ 18-24 ヌクレオチドの一本鎖低分子 RNA であり、種々のタンパク質をコードする mRNA の翻訳を抑制する(図1)。これまで 700 を超える miRNA がヒトで同定されており、多くの miRNA の機能解析が現在まさいに行われているところである。また、miRNA の生合成の過程では Dicer と呼ばれる RNaseIII ファミリータンパク質が重要な役割を担っていることも報告されている。近年 miR-222 と miR-339 が腫瘍細胞において接着分子 intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)の発現を抑制することが示され、miR-222, miR-339, Dicer のいずれを抑制しても ICAM-1 の発現が増加し、細胞障害性 T 細胞(CTL)に対する感受性が増強することが報告された(Ueda 2009)。

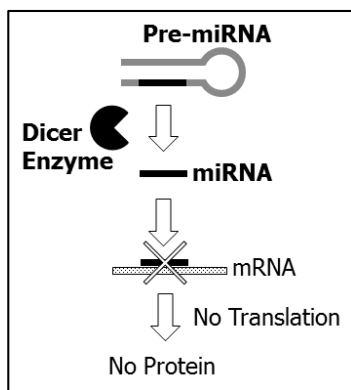


図 1

切除可能・切除不能を問わず、食道癌治療においては化学放射線療法の効果が治療成績に大きな影響を及ぼす。とくに完全寛解(complete response; CR)が得られるか、わずかでも癌細胞が遺残する部分寛解(partial response; PR)かで、予後は大きく異なる。一般に、CR が得られるか PR に終わるかを規定する最大の要因は化学療法および放射線療法に対する癌細胞の感受性であるが、不均一な細胞集団である癌組織では治療抵抗性の細胞群が遺残し、増殖することで高頻度に癌の再燃を来す。CR 率を向上させるためには化学放射線療法への感受性向上に加えて、別のアプローチが必要である。

近年、特異的免疫反応が強く誘導されている症例では予後が良好であることが報告され、化学放射線療法における抗腫瘍免疫反応の重要性が明らかとなった(Suzuki 2012, Tsuchikawa 2011)。現在までペプチドワクチン療法などが試みられてきたが、固形癌においては単独で治癒に至る効果は得られていない。その要因の一つが腫瘍細胞による免疫逃避機構であり、腫瘍細胞の MHC クラス I 分子や ICAM-1 に代表される接着分子の発現低下により、細胞障害性 T 細胞(CTL)に認識されないあるいは認識されても攻撃されない状態を腫瘍自身が作り出すと考えられている(図2)。したがって、化学放射線療法において、腫瘍の免疫逃避機構を解除

することができれば、化学放射線療法に感受性のない腫瘍細胞を特異免疫反応で除去し、CR 率を上げることができ、治療成績の向上が期待される。

2. 研究の目的

食道癌化学放射線療法における腫瘍特異的免疫反応の役割に着目し、miR-222 および miR-339 を抑制することで腫瘍局所の抗腫瘍免疫反応を増強し、化学放射線療法抵抗性の腫瘍細胞も含めた治療効果の増強を着想するに至った。

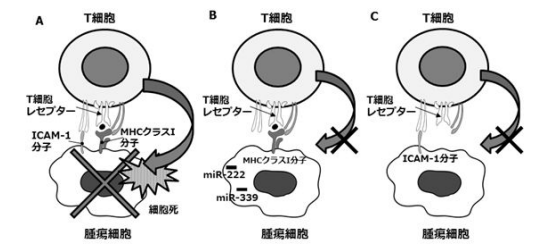


図 2

今回、1) 食道癌細胞株における miR-222, miR-339 抑制による ICAM-1 分子の発現増効果の増強、3) miR-222, miR-339 制御の臨床応用の可能性について明らかにしたい。

本研究では、従来の化学放射線療法に局所の腫瘍特異的免疫反応の増強を併用することにより、化学放射線療法抵抗性の腫瘍細胞群に対しても効果のある治療の開発を最終目標にしている。これまで消化器癌領域において、腫瘍細胞の miR-222 と miR-339 をターゲットにした免疫療法の研究は報告されていない。また免疫療法単独ではなく化学療法、放射線療法との併用を前提としている点が特色である。

本研究で miR-222 と miR-339 制御の有効性が明らかとなれば、これらの分子を標的とした治療の開発ひいては化学放射線療法への臨床応用の道が開かれ、治療成績の向上に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 術前化学放射線療法切除標本における T 細胞浸潤の程度、サブセットの解析、腫瘍細胞における ICAM-1 分子の発現程度、miR-222, miR-339, Dicer の発現の評価

外科切除材料を用いて、実際の腫瘍における ICAM-1 分子の発現、HLA-A1 分子の発現、Dicer 分子の発現状況を免疫染色にて評価するとともに、腫瘍浸潤リンパ球のサブセット(CD8, CD4)を解析する。miR-222, miR-339 の発現についてはパラフィン切片または凍結標本より tRNA を抽出し、RT-PCR 法で評価する。

(2) 食道扁平上皮癌細胞株における MHC クラス I 分子および ICAM-1 分子発現のスクリーニング

各種細胞株において、HLA-A 分子および ICAM-1 分子の発現をフローサイトメトリー

で確認し、以下の実験に供する。

(3) 食道扁平上皮癌細胞株における miR-222, miR-339, Dicer 発現の測定

各種細胞株における miR-222, miR-339, Dicer の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて評価し、細胞株による発現の差を確認する。

(4) 食道扁平上皮癌細胞株における Dicer 抑制による ICAM-1 分子の発現の変化と CTL による腫瘍障害活性の変化

細胞株に siRNA を投与することにより Dicer の機能を抑制し、miR-222 および miR-339 を down-regulate する。続いて細胞表面の ICAM-1 発現の変化を観察する。

腫瘍細胞株それぞれの HLA に合致した細胞障害性 T 細胞(CTL)を健常者末梢血から誘導し、CTL の抗腫瘍活性を 51Cr 放出試験で確認し、Dicer siRNA 投与による抗腫瘍活性の変化を確認する。

(5) 化学療法剤処理あるいは放射線照射後の食道扁平上皮癌細胞株における T 細胞による腫瘍細胞障害活性と miR-222, miR-339 抑制によるその変化

腫瘍細胞株をシスプラチン+5-FU の存在下に培養し、(4)と同様の検討を行う。また、腫瘍細胞株に放射線照射を行った後にも同様の検討を行う。さらに化学療法剤暴露と放射線照射を同時に行い、Dicer siRNA と組み合わせることで CTL 抗腫瘍活性の変化を確認する。

4. 研究成果

術前化学放射線療法後切除標本における T 細胞の浸潤の程度について 5 例のパラフィン切片で検討したところ、T 細胞浸潤の程度は症例により差が大きく、病理学的効果判定との間に明かな関連性は認められなかった。十分量の tRNA が採取できず、これらの症例における miR-222, miR-339 発現の解析は困難であった。

食道扁平上皮癌細胞株において、Dicer を siRNA で抑制すると miR-222, miR-339 が down-regulate されており、ICAM-1 の発現が増強する可能性が示唆された。

T 細胞浸潤の認められる食道癌においては、本研究で示された miR-222 および miR-339 をターゲットにした治療が化学放射線療法の効果を増強する可能性があり、これを証明すべくさらに in vitro の検討を進めたい。また、食道癌局所に T 細胞が浸潤するメカニズムについても不明な点が多く、こちらについてもさらなる研究が必要であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1) Hihara, J., Hamai, Y., Emi, M., Murakami, Y., Kenjo, M., Nagata, Y., Okada, M.: Role

of definitive chemoradiotherapy using docetaxel and 5-fluorouracil in patients with unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma: a phase II study. *Dis Esophagus*, 2015. (査読・有)

2) Miyata, Y., Mimura, T., Tsutani, Y., Ito, M., Misumi, K., Tsubokawa, N., Kai, Y., Kagimoto, A., Hihara, J., Okada, M.: Completion lobectomy for unanticipated pN1 disease on postoperative pathology after segmentectomy for cT1N0 lung cancer: Prevention of pleural adhesion by using fibrin glue. *J Cardiothorac Surg. 10 Suppl 1: A245*, 2015. (査読・有)

3) Ibuki, Y., Hamai, Y., Hihara, J., Taomoto, J., Kishimoto, I., Miyata, Y., Okada, M.: Emergency escape surgery for a gastro-bronchial fistula with respiratory failure that developed after esophagectomy. *Surg Today*. 45: 369-373, 2015. (査読・有)

4) Hamai, Y., Hihara, J., Taomoto, J., Yamakita, I., Ibuki, Y., Okada, M.: Effects of neoadjuvant chemoradiotherapy on postoperative morbidity and mortality associated with esophageal cancer. *Dis Esophagus* 28: 358-364, 2015. (査読・有)

5) Hamai, Y., Hihara, J., Furukawa, T., Yamakita, I., Kurokawa, T., Okada, M.: Role of FDG-PET/CT in prediction of pathological tumor response and survival after trimodality therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *J Cardiothorac Surg. 10 Suppl 1: A244*, 2015. (査読・有)

6) Hamai, Y., Hihara, J., Emi, M., Murakami, Y., Kenjo, M., Nagata, Y., Okada, M.: Results of Neoadjuvant Chemoradiotherapy With Docetaxel and 5-Fluorouracil Followed by Esophagectomy to Treat Locally Advanced Esophageal Cancer. *Ann Thorac Surg*. 99: 1887-1893, 2015. (査読・有)

7) Hihara, J., Hamai, Y., Emi, M., Aoki, Y., Taomoto, J., Miyata, Y., Okada, M.: Esophageal bypass operation prior to definitive chemoradiotherapy in advanced esophageal cancer with tracheobronchial invasion. *Ann Thorac Surg*. 97: 290-295, 2014. (査読・有)

8) Hamai, Y., Hihara, J., Taomoto, J., Yamakita, I., Ibuki, Y., Okada, M.: Hemoglobin level influences tumor response and survival after neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg*. 38: 2046-2051, 2014. (査読・有)

9) Sasada, S., Miyata, Y., Tsutani, Y., Tsuyama, N., Masujima, T., Hihara, J., Okada, M.: Metabolomic analysis of dynamic response and drug resistance of gastric

cancer cells to 5-fluorouracil. Oncol Rep. 29: 925-931, 2013. (査読・有)

10) Sakogawa, K., Aoki, Y., Misumi, K., Hamai, Y., Emi, M., Hihara, J., Shi, L., Kono, K., Horikoshi, Y., Sun, J., Ikura, T., Okada, M., Tashiro, S.: Involvement of homologous recombination in the synergism between cisplatin and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. Cancer Sci. 104: 1593-1599, 2013. (査読・有)

11) Hamai, Y., Hihara, J., Emi, M., Taomoto, J., Aoki, Y., Kishimoto, I., Ibuki, Y., Okada, M.: Treatment outcomes and prognostic factors for thoracic esophageal cancer with clinical evidence of adjacent organ invasion. Anticancer research. 33: 3495-3502, 2013. (査読・有)

12) Aoki, Y., Sakogawa, K., Hihara, J., Emi, M., Hamai, Y., Kono, K., Shi, L., Sun, J., Kitao, H., Ikura, T., Niida, H., Nakanishi, M., Okada, M., Tashiro, S.: Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. Int J Oncol. 42: 1951-1960, 2013. (査読・有)

〔学会発表〕(計6件)

1) 檜原淳, 浜井洋一, 山北伊知子, 古川高意, 黒川知彰, 岡田守人: 切除可能局所進行食道扁平上皮癌に対する術前化学放射線療法の意義. 第68回日本胸部外科学会定期学術集会. 神戸, 2015.10.18

2) 檜原淳, 浜井洋一, 山北伊知子, 古川高意, 岡田守人: Stage II/III 食道癌に対する術前化学放射線療法の治療成績. 第70回日本消化器外科学会総会. 浜松, 2015.7.15

3) 檜原淳, 浜井洋一, 山北伊知子, 古川高意, 岡田守人: Near T4 食道扁平上皮癌に対する術前化学放射線療法の治療成績. 第115回日本外科学会定期学術集会. 名古屋, 2015.4.16

4) 檜原淳, 浜井洋一, 山北伊知子, 伊富貴雄太, 埴本純哉, 岡田守人: 気管・気管支に浸潤した切除不能胸部食道癌に対する治療戦略. 第68回日本食道学会学術集会. 東京, 2014.7.4

5) 檜原淳, 浜井洋一, 青木義朗, 埴本純哉, 岸本伊知子, 村上祐司, 権丈雅浩, 靖, 永., 岡田守人: 進行食道扁平上皮癌に対する術前化学放射線療法の治療成績. 第67回日本食道学会学術集会. 大阪, 2013.6.14

6) 檜原淳, 浜井洋一, 恵美学, 青木義朗, 岸本伊知子, 埴本純哉, 岡田守人: 局所進行食道癌に対する術前化学放射線療法-とくに T3/T4 境界病変への有用性について-. 第68回日本消化器外科学会総会. 宮崎, 2013.7.17

(1)研究代表者

檜原 淳 (HIHARA JUN)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師
研究者番号: 10322744

(2)研究分担者

岡田 守人 (OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号: 70446045