

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461893

研究課題名(和文)食道癌放射線治療新規標的としてmicroRNAのInVivoと臨床症例の統合解析

研究課題名(英文) Analysis of micro RNA as new treatment target of radiation therapy for esophageal cancer on In vivo and clinical cases.

研究代表者

平川 雅和 (Hirakawa, Masakazu)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：20380454

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)：本研究の目的は食道癌に対する実用可能な放射線化学療法の新規感受性バイオマーカーと治療標的分子の同定することである。代表者は、基盤C課題番号23591843で食道癌細胞株の放射線感受性を制御する候補microRNA miR203aを同定した。本研究では、miR-203a低発現の放射線抵抗株TE1で放射線感受性有意な向上が認められ、miR203aは、放射線化学療法の新規感受性の重要なバイオマーカーと治療標的分子となりうる事がIn Vitroで確認された。miR-203aの標的遺伝子であるLASP1、BMI1に関する検討では、放射線感受性への関与が確認できず、臨床症例での確認は、未施行である。

研究成果の概要(英文)：We previously detected microRNA (miR)-203a as miR involved in radioresistance of esophageal cancer (ESC) cells (Grants-in-Aid for Scientific Research, 20380454). Purpose of this study is to identify new radiosensitive biomarker and treatment target relating chemoradiation for ESC. The expression of miR-203a was significantly lower in TE1 (Radioresistant ESC cell line) and higher in TE9 (Radiosensitive ESC cell line). On colony formation assay, overexpression of miR-203 impaired resistance to radiation in TE1. MiR-203 was identified as the downregulated miR in radioresistant cell line compared to radiosensitive cell line. Overexpression of miR-203 increased radiosensitivity of ESC cell lines. Our findings indicate that miR-203 can be a target for overcoming the radioresistance of ESC. We also evaluated expression of LASP1 and BMI1 which are target gene of miR-203a, however, we could not obtain the clear result that LASP1 and BMI1 might be radiosensitive gene in ESC cell lines.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：食道癌 放射線治療 マイクロRNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌(臨床病期 -)に対する根治的放射線療法第 相試験 (JCOG9906)では、5年生存率は37%で、治療成績は不良である。治療耐性獲得に、遺伝子異常の関与があり、1例として、TP53変異が細胞周期チェックポイント不活化やアポトーシス抑制を来し、治療耐性となる。治療成績向上のために、放射線治療効果や副作用のリスクと関連したゲノム構造の多様性に関する研究が進行中で、放射線感受性関連遺伝子としてBIRC2,COX-2, CD73,PLAU, CAS6等が報告されている。遺伝子制御機構において、転写調節因子microRNA(miR)が注目されているが、miRは癌組織中で安定発現する為、治療感受性予測マーカーや治療標的因子としての臨床的有用性が期待される。**放射線科感受性を制御するmiRおよびmiR-遺伝子 pathwayについて、包括的・統合的解析の研究は少なく、申請者グループにおいて研究が進行中であり、感受性・抵抗性を効率よく制御しうる「真の標的因子」となることが期待され、臨床的意義を有することを確信している。**代表者は、「**食道癌放射線治療成績向上のための放射線感受性制御microRNAと遺伝子の解明(基盤C課題番号23591843,平成23-25年)**」の助成をいただき、食道癌細胞株にマイクロアレイを実施し、**放射線感受性を制御する候補miR hsa-miR-203a, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-205-5p**をIn vitroにおいて同定した(未発表)。これらのmiRの食道扁平上皮癌の放射線感受性の報告はなく、新規バイオマーカー、治療標的因子としての可能性が期待され、In vivo,臨床症例での検討が必要と考えられた。

2. 研究の目的

(1)放射線耐性および感受性食道癌株化細胞を用いて、**In vivoにおける放射線感受性関連候補miRのPathwayとその分子機構**を明らかにすること

(2)更に当院食道癌症例原発巣における**放射線感受性関連候補miRに関する統合解析**を行うことである。**最終的には、食道癌に対する実用可能な放射線化学療法の新規感受性バイオマーカーと治療標的分子の同定へとつなげたい。**

3. 研究の方法

食道癌株への候補miRの過剰発現・ノックダウンによる放射線感受性に関するin vivo解析

申請者のアレイ解析の結果より得られた放射線感受性関連候補となった3つのmiR hsa-miR-203a, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-205-5pについて、強制発現株 or 抑制株をマウスに移植し、放射線感受性の変化をIn vivoで確認し、候補miRをさらに絞り込む。強制発現株 or 抑制株 対 コントロール群の gene

expression arrayを行うことで放射線感受性関連 miR が影響する標的遺伝子および pathway を同定する。包括的解析結果より、**放射線抵抗性 miR-制御遺伝子パスウェイ候補を絞り込み、その候補が、新たな治療標的となりうるか検討する。**

当院食道扁平上皮癌症例の放射線治療感受性と原発巣 miR-遺伝子発現との相関関係の解析

当院食道扁平上皮癌原発巣の生検検体やパラフィン切片において、放射線感受性の制御を司る候補となった3つのmiR hsa-miR-203a, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-205-5p-遺伝子発現に関する包括的解析を行い、放射線治療感受性との関連性について統合解析し、放射線治療の感受性予測マーカーや治療法的としての意義と臨床的有用性について検討したい。

本研究は根治的放射線療法の治療成績向上を目的とするため、標準的な根治治療対象の臨床病期 - 期(T4症例を除外、UICC第7版)の食道扁平上皮癌の原発巣を対象とする。

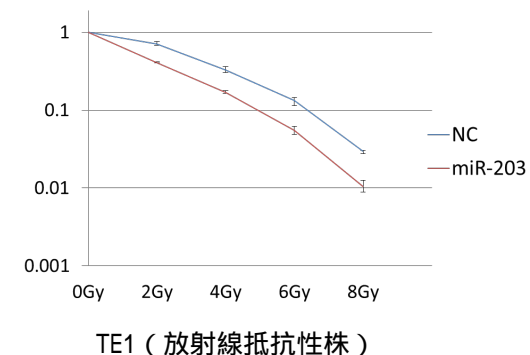
治療感受性群と耐性群の2群間で、マイクロアレイと遺伝子解析を行い、同定されたmiRと遺伝子異常の相互関係をPathway解析で見出したい。

Pathway解析・統合解析は、東京大学医科学研究所と共同でスーパーコンピュータを使用させていただき研究を行う。

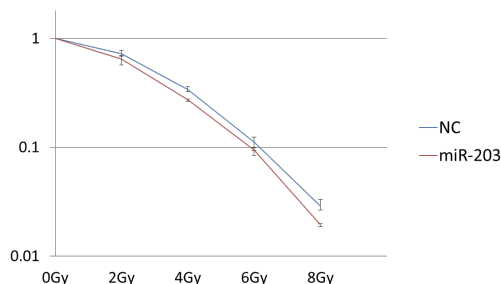
4. 研究成果

(1)放射線耐性食道癌細胞株 TE1 と放射線感受性 TE9 での miR-203a 発現検定を施行し、放射線抵抗株 TE1 では、miR-203a 低発現、放射線感受性株 TE9 では、miR-203a 高発現を確認した。

放射線抵抗株 TE1 で miR-203a を強制発現させ、放射線抵抗性 感受性に転換するかの検討するためコロニー形成法で放射線感受性検討した。結果として、miR-203a を強制発現株で、コントロール群と比較して放射線感受性の有意な向上が確認された。放射線感受性株 TE9 の miR-203a 強制発現させた。miR-203 そのものによる足場依存性の増殖抑制効果を認めたが放射線感受性株 TE9 においても感受性向上傾向を認めた(有意差なし)。

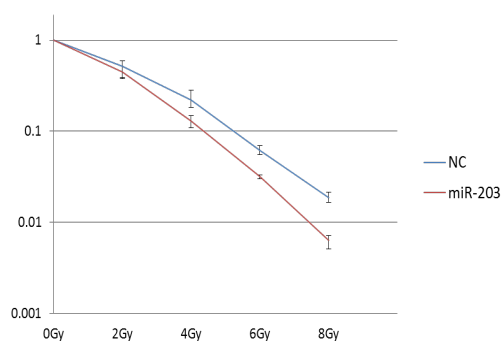


放射線抵抗株である TE1 に miR203 を導入すると、有意に生存率が低下し、放射線感受性の向上を認めました。



TE9 (放射線感受性株)

TE9 でも放射線感受性が改善する傾向を認めました。有意差はでませんでした。元々が感受性であるため差がでなかった、とも考察できます。TE9 の miR-203a 発現阻害すると、放射線感受性 抵抗性になるか検討のために、様々な実験条件の変更を行ったが、miR-203a 発現低下 TE9 細胞株を樹立不可能であった。TE1,9 細胞株以外の TE4,5,11 において、miR-203a を強制発現させ、コロニー形成法で放射線感受性を検討した。結果として、TE4,5 では有為な放射線感受性の改善は認めなかったが、TE11 では放射線感受性の有意な向上が確認された。



TE11 (放射線抵抗性株)

TE11 では miR203 を導入により有意に生存率が低下し、放射線感受性の向上を認めました。

TE4,5,11 において、miR-203a の標的遺伝子である LASP1 の発現の変化を RT-PCR で確認し、発現量の低下傾向を認めたが、有意差は確認できなかった。他の miR-203a のターゲット遺伝子候補である BMI1 でも RT-PCR を施行するも、いずれの食道癌細胞株でも発現低下が確認できなかった。

(2) 報告書作成時点で、miR-203a inhibitor も標的遺伝子の発現量の変化で work していることを再確認する実験を再計画中であり、

発現量低下が確認できれば、阻害実験を改めて再開し、実際の食道扁平上皮癌放射線治療の臨床症例で感受性 vs. 抵抗性群で miR-203a 発現が異なるか検討する方針。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

2017 American Society for Radiation Oncology (ASTRO) annual meeting において「Downregulation of micro RNA-203 associates with radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma cells」の演題名にて発表した。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平川 雅和 (HIRAKAWA, Masakazu)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：20380454

(2) 研究分担者

中村 和正 (NAKAMURA, Katsumasa)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：20284507

三森 功士 (MIMORI, Kohshi)
九州大学・大学病院・教授

研究者番号：50322748

寺嶋 広太郎 (TERASHIMA, Kohtaro)
公益財団法人佐賀国際重粒子線がん治療
財団九州国際重粒子線がん治療センター
(臨床研究部)・臨床研究部 医師
研究者番号：40627676