

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10423

研究課題名(和文) Hybrid EMTの見地からみた胸管内微小腫瘍細胞の同定による新たな食道癌治療

研究課題名(英文) Novel treatment strategy of esophageal cancers by detecting the cancer cells with hybrid EMT potential in the thoracic lymph duct.

研究代表者

小池 聖彦 (Koike, Masahiko)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10378094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌は難治癌のひとつであり、集学的な治療介入が必要となる。術前化学療法も頻用されるが、治療効果予測に有用なマーカーはいまだ確立していない。

今回liquid biopsyの手法として術中胸管リンパ液を採取すること、そしてhybrid epithelial-mesenchymal transition (EMT) statusに相関する遺伝子マーカーの発現を調べることを目的としたが、前半部分を十分に確立することができなかった。代替法として治療前血清サンプルを回収して用い、micro RNA発現の網羅的解析を行って化学療法抵抗性を予測する有望な予後マーカーを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hybrid EMT statusは、癌幹細胞化や抗癌剤耐性に関与する因子として昨今報告が増えている。難治食道癌治療において、術前化学療法の効果予測は重要な情報であり、本研究では予測マーカー候補抽出のため、奏効例(n=4)および耐性例(n=4)の治療前血清検体についてmicro RNA発現の網羅的解析を行い、さらに84例の血清検体を用いてvalidationを行った。食道癌術前化学療法の効果予測因子について、血清検体についてmicro RNAの網羅的解析を施行したはじめての報告として意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the lethal cancers in the world. Patients usually need to receive multimodal therapy. Advanced ESCCs are initially treated by neoadjuvant chemotherapy. However, no molecular marker predicting therapeutic effects of neoadjuvant chemotherapy has been well established.

As we initially failed to do liquid biopsy using lymph fluid from the thoracic lymph duct intraoperatively, we collected serum samples from pre-treated patients instead. We focused on the chemo-sensitivity to neoadjuvant treatment, which is one of the key characteristics of hybrid EMT status. In this project, we tried to pursue the new micro RNA markers clearly distinguishing chemo-sensitive cases and chemo-resistant cases by microarray analyses followed by validation analyses.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 EMT 胸管 micro RNA

1. 研究開始当初の背景

消化器領域の中でも難治性である食道癌の根治を目指すためには、外科的切除術を含めた集学的治療が不可欠である。3領域の高精度リンパ節郭清を伴う食道癌手術で行う「胸管合併切除」は、縦隔内のリンパ管が胸管内に流入する解剖学的背景から歴史的に en bloc な郭清として行われてきた。しかし、癌の局所制御だけでなくリンパ系や血行性転移への関与は未だ不明で、「胸管合併切除」自体は低タンパク血症と血管内脱水を来し、食道癌手術を過大侵襲としている可能性がある。予後改善という明確なエビデンスも認められない。

本研究では、近年提唱された「Hybrid EMT」の見地から食道癌の治療抵抗性の評価を行い、これらの結果と予後との相関を検討する。可能であれば有望な候補マーカーにつき胸管リンパ液を用いた liquid biopsy を行うことで胸管内に存在する微小癌細胞の検出を行い、胸管合併切除の意義を問う。

2. 研究の目的

これまで研究代表者らは、食道癌における "tumor budding" の臨床的意義を報告し、また EMT の代表的マーカーである E-cadherin と vimentin の mRNA 発現比から算出される「EMT status」と tumor budding の相関についても報告してきた。また methylation マーカーについても検討してきた。これらの成果をもとに、下記の研究計画を立案した。

(1) 食道癌症例における「Hybrid EMT」の臨床的意義の検討

昨今癌悪性度との相関が指摘される hybrid EMT status につき、化学療法抵抗性の獲得という観点から、hybrid EMT status を特徴づける micro RNA マーカーの抽出を試みる。具体的には、食道癌患者の治療前血清サンプルを用い、術前化学療法奏功例 4 例、抵抗例 4 例の計 8 検体に対して、高性能 DNA チップ基板 3D-Gene を用いて miRNA の網羅的解析を行う。

(2) 胸管内リンパ液中における微小癌細胞同定手技の検証

食道癌手術中に胸管からリンパ液の回収を行い、末梢血循環腫瘍細胞 Circulating Tumor Cells (CTCs) の検出方法である EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule; 上皮細胞接着分子) のモノクローナル抗体を用いた免疫磁気的手法で、微小癌細胞の同定が可能かどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体における「Hybrid EMT」臨床的意義の検証

研究代表者らは食道癌細胞株の EMT status について報告してきたが、この「Hybrid EMT」との相関についても検討する。また、教室の食道癌切除検体約 100 例を用い、「Hybrid EMT」のマーカーを同様に測定し、臨床病理学的因子・予後・再発形式との相関を解析する。以上より、食道癌における「Hybrid EMT」の臨床的意義に関する検証を行う。

(2) マウスモデルにおける検証

「Hybrid EMT」はリンパ管や血管などの脈管内に流入した癌細胞の高い着床や転移能を有すると考えられているため、食道癌細胞株をヌードマウスの尾静脈から注射し、肺、肝臓、腹膜などの遠隔臓器への着床や転移能の差について検討する。これにより、「Hybrid 細胞株」が有意に着床・転移能を有していることが予想される。

(3) 胸管内リンパ液における「Hybrid EMT」型微小癌細胞の同定

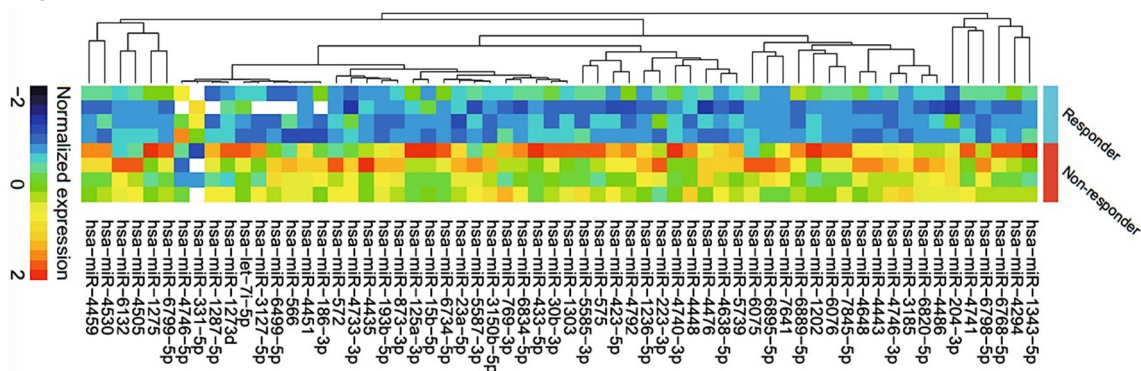
食道癌手術症例において開胸直後に胸管内リンパ液を 3mL 採取しておく。この検体から RNA を抽出し、食道癌の腫瘍特異的遺伝子である「SCC」に対して定量 PCR 法を行い、腫瘍細胞陽性率を測定する。また「Hybrid EMT」マーカーを測定し、循環癌細胞中における「Hybrid EMT」細胞を検出する。

4. 研究成果

(1) micro RNA マーカーについての網羅的解析

Epithelial と Mesenchymal 双方の因子を有する Hybrid EMT type は癌幹細胞の性質を有し、薬剤耐性に寄与すると指摘されている。この Hybrid EMT type に特徴的な遺伝子マーカーについて、当初は ZEB、SNAIL、miR-34、miR-200 など既知のものを使用する予定であったが、利便性と新規性の観点から、今回 micro RNA (miR) に注して網羅的な解析を施行することで、有望な新規マーカーの抽出を試みた。食道癌治療の臨床的見地から、術前化学療法 (cisplatin+5FU or cisplatin+S-1) の奏効例と無効例との選別を行うことに意義があると考え、NAC responder (R, n=4) と non-responder (NR, n=4) の治療前血清検体について、2565 個の probe を用いた網羅的な micro RNA 発現解析 (3D-Gene® Scanner、TORAY) を施行し、両群で発現に差のある micro RNA に注目した。ここで、NAC responder は Japanese Classification of Esophageal Cancer 10th edition でいう Grade2-3 の症例、non-responder は Grade0-1 の症例と定義した。両群で有意な発現の差を認めたものを Fig 1A に示す。

Fig 1A



(2) 術前化学療法感受性を予測する miRNA の抽出

Fig 1A に掲載した miR 候補の中から、NR 群で発現量が非常に高くなるもの、そして文献的に他癌腫で抗癌剤耐性との関連が指摘されているものという条件下に、3 つの miR を抽出した (miR-23a-5p、miR-193-5p、miR-873-3p)。

これらの miR について、validation cohort として準備した検体につき定量 PCR を行い、normalization 可能な 84 例 (R 群 15 例 (18%)、NR 群 69 例 (72%)) について解析対象とし、検討を行った。その結果、miR-193b-5p および miR-873-3p について、microarray の結果通り、NR 群で有意に高発現を示した (P=0.004、P=0.001、Fig 1B)。特に miR-873-3p については、治療開始後の生存曲線についても高発現群で有意に予後不良であった (P=0.006、Fig 1C)。

Fig 1B

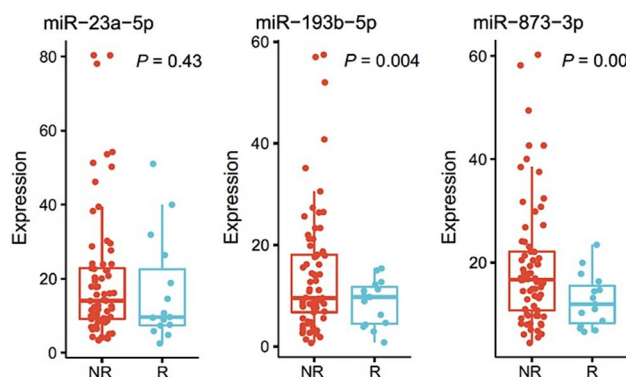
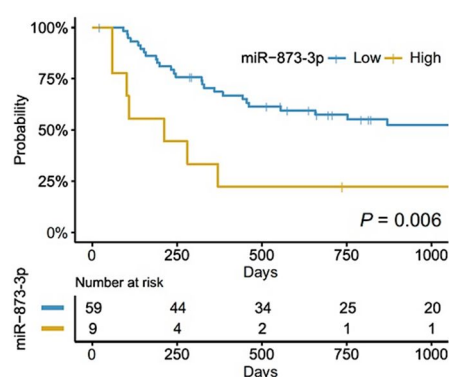


Fig 1C



(3) 術前化学療法が無効 (NR 群) となる症例の予測因子についての単変量解析

cT や Serum SCC antigen と比較して、miR-23a-5p、miR-193b-5p、miR-873-3p が高値であることから、高い OR 値をもつ有用な因子であることが分かる (Table 1)。さらにこれらを組み合わせることで、Receiver Operating Characteristic curve (ROC curve) を Figure 2 に示すとおり、AUC が漸増し、より正確な術前治療感受性が予測できると考えられた。特に miR-193b-5p と miR-873-3p を組み合わせた場合 (2-miR-model) 有用な治療前予測因子になりうると考えられた。

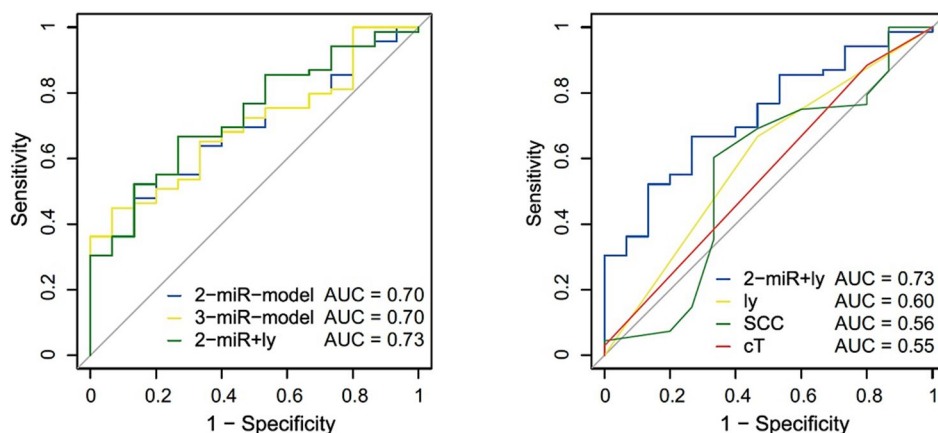
これらの結果は単施設のデータであり、多施設コホートで裏付けが必要であると考えられる。また術後の血清値の変動、あるいは対応する生検組織検体での発現について確認することも、今後の課題と考えられる。しかし、食道癌の術前化学療法の感受性の予測マーカーとして microRNA を扱うものとしてははじめての報告と考えられ、NR 群と R 群で比較した microarray データも今後の参照データとして有用と思われた。

Table 1

Variables	OR	95% CI Low	95% CI High	P
Age (years)				
≥ 65 vs <65	0.55	0.17	1.8	0.31
Sex				
Male vs female	0.73	0.15	3.7	0.70
cT				
3, 4 vs 0, 1, 2	1.42	0.43	4.7	0.57
cN				
Positive vs negative	1.17	0.22	6.2	0.85
Serum SCC antigen (ng/ml)				
≥ 1.5 vs <1.5	0.39	0.13	1.2	0.11
miR-23a-5p				
High vs low	2.80	0.90	8.8	0.08
miR-193b-5p				
High vs low	7.47	0.93	60.2	0.06
miR-873-3p				
High vs low	3.11	0.96	10.1	0.06

OR odds ratio, CI confidence interval, cT clinical T, cN clinical N, SCC squamous cell carcinoma

Figure 2



(4) Hybrid EMT type の細胞株を用いたマウスモデルの作成

同定した候補 miR マーカーについて、hybrid EMT type との相関を検証するためにマウスモデルの作成を試みたが細胞株の生着を得ることができず、断念した。

(5) 胸管内リンパ節からの RNA 採取

本研究で最も困難が予想された、胸管内リンパ液中における微小癌細胞同定手技の検証についてであるが、食道癌術中に胸管内リンパ液を採取する手技の確立に難渋している。採取手技、サンプル量、抽出した核酸クオリティの問題などあり、解析を行うに十分な検体が確保できなかった。また、比較対象として術前治療による修飾のない胸管内リンパ液検体の集積が必要であるが、昨今は術前治療を行う症例が多くなっているため、サンプル数の確保にも難渋した。

< 引用文献 >

- Koike M, Koder Y, Itoh Y, Nakayama G, Fujiwara M, Hamajima N, Nakao A. Multivariate analysis of the pathologic features of esophageal squamous cell cancer: tumor budding is a significant independent prognostic factor. *Ann Surg Oncol*. 2008 Jul;15(7):1977-82. doi: 10.1245/s10434-008-9901-6.
- Teramoto H, Koike M, Tanaka C, Yamada S, Nakayama G, Fujii T, Sugimoto H, Fujiwara M, Suzuki Y, Koder Y. Tumor budding as a useful prognostic marker in T1-stage squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Surg Oncol*. 2013 Jul;108(1):42-6. doi: 10.1002/jso.23341.
- Niwa Y, Yamada S, Koike M, Kanda M, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Nomoto S, Fujiwara M, Koder Y. Epithelial to mesenchymal transition correlates with tumor budding and predicts prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 2014 Nov;110(6):764-9. doi: 10.1002/jso.23694.
- Kurimoto K, Hayashi M, Guerrero-Preston R, Koike M, Kanda M, Hirabayashi S, Tanabe H, Takano N, Iwata N, Niwa Y, Takami H, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, Nakayama G, Sugimoto H, Fujii T, Fujiwara M, Koder Y. PAX5 gene as a novel methylation marker that predicts both clinical outcome and cisplatin sensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Epigenetics*. 2017;12(10):865-874. doi:10.1080/15592294.2017.1365207.
- He P, Qiu K, Jia Y. Modeling of mesenchymal hybrid epithelial state and phenotypic transitions in EMT and MET processes of cancer cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):14323. doi:10.1038/s41598-018-32737-z

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Yukiko Niwa, Suguru Yamada, Fuminori Sonohara, Keisuke Kurimoto, Masamichi Hayashi, Mitsuru Tashiro, Naoki Iwata, Mitsuro Kanda, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Goro Nakayama, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Koder. Identification of a serum-based miRNA signature for response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Translational Medicine*. 17:1(Open Access), 2019. DOI: 10.1186/s12967-018-1762-6 (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山田 豪

ローマ字氏名：(YAMADA, Suguru)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：30467287

研究分担者氏名：岩田 直樹

ローマ字氏名：(IWATA, Naoki)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：00719247

研究分担者氏名：丹羽 由紀子

ローマ字氏名：(NIWA, Yukiko)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院講師

研究者番号(8桁)：50746401

研究分担者氏名：藤井 努

ローマ字氏名：(FUJII, Tsutomu)

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60566967

研究分担者氏名：小寺 泰弘

ローマ字氏名：(KODERA, Yasuhiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：10345879

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。