

令和元年5月14日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07146

研究課題名(和文) 転移陰性リンパ節を用いた胃癌特異的マイクロRNAに基づく個別化バイオマーカー

研究課題名(英文) Personalized cancer management based on microRNA biomarkers

研究代表者

石亀 輝英 (Ishigame, Teruhide)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50583358

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)：本研究では当初、胃癌リンパ節を主な対象として癌特異的マイクロRNAを検索すべく種々の検討を行ったが、決定的な候補マイクロRNAの同定には至らなかった。一方、近年の消化器癌領域における免疫療法の著しい進歩を背景に、免疫チェックポイント分子であるPD-L1を制御するマイクロRNAの検索を試みた。TCGAデータから得た網羅的なマイクロRNA発現データおよび複数の標的予測プログラムを用い、さらにマイクロアレイデータ、FFPE由来のRNAを用いたqRT-PCR解析や免疫染色を行った。結果として、癌抑制的マイクロRNAであるmiR-148aがPD-L1遺伝子発現を抑制的に制御することを解明するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNAは標的遺伝子機能を制御することで発癌や癌の進展に重要な役割を担うことが知られている。癌診療においては、癌の診断、予後バイオマーカーや治療反応予測因子、さらに薬剤としての有用性が報告されているものもある。本研究で得られたマイクロRNAの機能や臨床的意義の知見が癌におけるマイクロRNAのさらなる理解や個別化医療の糸口へつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although this study originally aimed to investigate microRNAs that are specific to the lymph node involvement in gastric cancer, our microRNA screening strategies were not able to identify potential candidates. We then attempted to focus on the identification of microRNAs that regulate an immune checkpoint molecule, programmed cell death ligand 1 (PD-L1), since immunotherapy against the interaction between PD-1/PD-L1 has recently emerged as a promising strategy for gastrointestinal tract cancers. A comprehensive microRNA screening was conducted using The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset combined with microRNA target prediction programs, followed by the analysis of microarray-based mRNA/miRNA expression datasets and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples by immunohistochemistry and qRT-PCR. Here we identified a tumor suppressive microRNA, miR-148a that can negatively regulate PD-L1, via direct binding to 3'UTR of PD-L1 mRNA.

研究分野：消化器癌

キーワード：マイクロRNA 消化器癌

## 1. 研究開始当初の背景

消化管癌は全がんにおいて死亡・罹患数が上位を占める主要な癌腫である。なかでも胃癌はアジア圏に多く、本邦において、今なお死亡・罹患数が最も上位の癌腫のひとつである。これら消化管癌に対する診断・治療技術は、ここ10年で飛躍的な進歩を遂げたと言える。早期病変に対する内視鏡治療の適応拡大、特に外科領域においては低侵襲な体腔鏡手術が導入され、標準治療として日常臨床において中心的な役割を果たすようになり、早期癌のみならず局所進行癌に対しても適切なリンパ節郭清を含む胸腔鏡・腹腔鏡下根治手術が行われている。進行再発癌に対しては様々な新規抗癌剤、分子標的薬の導入により生存期間の延長が望めるようになり、集学的治療により根治に至る症例も見られる。さらに近年の免疫チェックポイント阻害剤の登場を契機として、消化管癌治療のパラダイムシフトとも言うべき大きな変革がおきている。すなわち、過去にはあくまで補完的役割であった免疫療法がいまや消化器癌薬物療法の主役になりつつある。

消化管癌に対する効果的で安全な個別化医療を提供することが本研究の究極的な課題である。胃癌において、リンパ節転移は最大の予後因子であるが、特に壁深達度が筋層内に留まるSM(粘膜下層)MP(固有筋層)程度の浸潤をきたしているような症例の場合、リンパ節転移陽性は極めて重要な再発リスク因子と考えられる。胃癌の診療はエビデンスに基づく治療ガイドラインに準じるが、リンパ節転移を伴う症例の多く(Stage II-III)に対しては術後補助化学療法を行うことが標準治療として推奨されている。リンパ節転移は胃癌の進行度(Stage)を決める因子であるとともに、その時点での画像診断モダリティや血清腫瘍マーカーでは検出不可能な遺残病変の存在を示唆する因子と言うこともできる。術後補助化学療法の意義は、治療切除後に存在する可能性のある全身の微小な遺残病変(undetected micrometastasis)を標的とした再発の防止である。本来予後良好であるリンパ節転移陰性症例においても、再発・転移を来す予後不良な群が存在する。このようなリンパ節転移陰性症例において、術後補助化学療法がどの患者に必要で、どの患者には不要なのか、というさらなる個別化のための指針が求められている。そのために、それぞれの患者にどのような治療を選択するか、その指標となる分子マーカーの開発が重要である。

## 2. 研究の目的

マイクロRNAはゲノム上にコードされる20-25塩基長の1本鎖RNA分子であり、タンパク質には翻訳されず、その標的mRNAの3'非翻訳領域(3'UTR)に不完全な相補性をもって結合し、標的mRNAの不安定化およびタンパク質への翻訳抑制を起こす。したがって種々の生物学的プロセスにおいて、マイクロRNAは標的遺伝子機能を抑制的に制御することで発癌や癌の進展に重要な役割を担うことが知られている。癌診療においては、癌の診断、予後バイオマーカーや治療反応予測因子、さらに薬剤としての有用性が報告されている。RNA研究において技術的な障壁はサンプルの保存や処理過程におけるRNA断片化である。しかしマイクロRNAは、ゲノムから転写されるが蛋白をコードせず、19~25塩基程度と極めて短いRNA鎖であるため、mRNAよりはるかに安定である。そのため、通常の遺伝子(mRNA)発現解析で使用されるような凍結サンプルのみならず、FFPEサンプルからも検出が容易であることがバイオマーカーとして用いる際の大きな利点である。確立すれば実用性の高いバイオマーカーになり得る。本研究では、最も臨床現場でアクセスしやすいサンプルであるパラフィン包埋ホルマリン固定(FFPE)切片を用いて、癌特異的マイクロRNAにアプローチするものである。

したがって本研究の目的は、消化管癌において分子マーカーとなり得るマイクロRNAを探索することであり、マイクロRNAに基づく個別化医療の礎となるための臨床的・基礎的検討を行うことである。

## 3. 研究の方法

- RNAシーケンシングまたはマイクロアレイを用いたmRNAおよびマイクロRNAの発現プロファイルデータ解析による候補マイクロRNAの抽出
- FFPEからのマクロダイセクションによる微小なRNAサンプル抽出とqRT-PCR手法の確立
- マイクロRNAの臨床的意義の検討(マイクロアレイ、免疫染色、qRT-PCR)
- マイクロRNAの機能的意義の検証(細胞株を用いた検討:Luciferaseアッセイ、qRT-PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、マイクロRNAのトランスフェクション、各種細胞機能解析)

## 4. 研究成果

### FFPE からの RNA 抽出と qRT-PCR 手法の確立

FFPE から total RNA を抽出するにあたり、複数の手法を試行した。なお本手法は臨床応用を念頭に置いた「マクロ」ダイセクションであり、光学顕微鏡を補助的に使用し、肉眼～ルーペレベルで標的組織（例えば腫瘍部）をマーキングすることを前提としている。最終的に採用した方法は未染色 FFPE ブロック上で標的部位を針でマーキングし、これを 5～10 $\mu$ m に薄切することで選択的に標的部位の組織を得るものである。これをキシレン等で脱パラフィン処理し、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit® (ThermoFisher Scientific) を用いて RNA を抽出する。Reverse transcription および PCR は Taqman probe (ABI) を用いて行い、安定的かつ再現性の高いマイクロ RNA 定量が可能であった。

### 免疫チェックポイント分子を制御するマイクロ RNA の同定

表題の通り、当初は胃癌、特にリンパ節を対象として、FFPE 由来のマイクロ RNA の検討を行う予定であった。上述のように FFPE からの RNA 抽出手法に関しては一定の成果を得た。しかしながら網羅的遺伝子発現・マイクロ RNA 発現データの解析や過去の論文検索など、いずれにおいても決定的と思われる候補マイクロ RNA の同定に至らなかった。

一方、免疫チェックポイント機構である癌細胞表面の PD-L1 (programmed death ligand-1) とリンパ球上の PD-1 (programmed death-1) シグナルを標的とした免疫療法が急激に固形癌領域で注目されるようになった。消化管領域では胃癌において抗 PD-1 抗体である Nivolumab が、大腸癌を中心とした固形癌では dMMR/MSI-H 症例を対象とした抗 PD-1 抗体、Pembrolizumab が保険収載されるに至った。同時に、免疫機構の調整に関わるマイクロ RNA の存在も知られるようになり、特に近年では、PD-L1 を制御する複数のマイクロ RNA が報告され、非小細胞肺癌においては miR-200 や miR-34 が癌細胞の PD-L1 発現を抑制的に制御することが報告された。

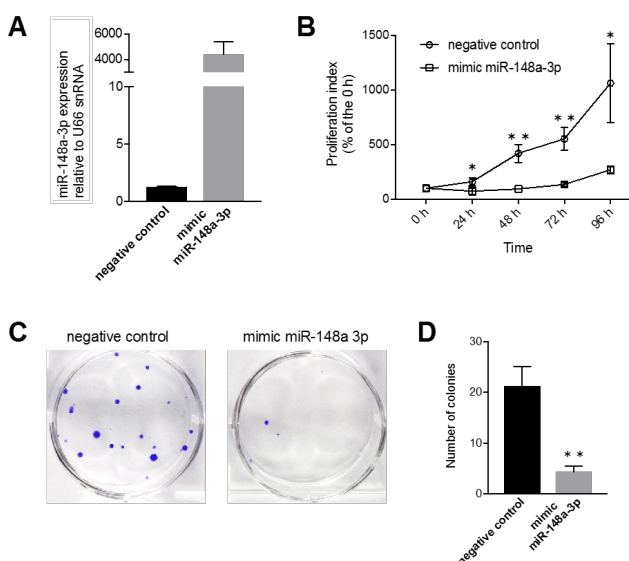
上述のような経緯と時代の趨勢から、本研究では消化管癌におけるマイクロ RNA と免疫抑制機構へと大きく舵を切ることとした。その結果として、癌細胞上の PD-L1 発現を制御するマイクロ RNA の同定に至った。

TCGA (The Cancer Genome Atlas) -COAD データから得た 260 例の RNA シークエンスによる網羅的なマイクロ RNA 発現データを用いて、PD-L1 発現 (CD274 遺伝子) と有意に逆相関し ( $P < 0.05$ )、かつ MSI-H 症例において有意に発現低下している ( $P < 0.05$ ) マイクロ RNA 候補を抽出した。

Accession	SUM	miRMap	RNA22	PITA	miRanda	Targetscan	microT-CDS	miRWalk	miRDB
MIMAT0000243	7								
MIMAT0000419	5								
MIMAT0003393	4								
MIMAT0003215	3								
MIMAT0000705	2								
MIMAT0002888	2								
MIMAT0004955	1								
MIMAT0000092	1								
MIMAT0002821	1								
MIMAT0000086	1								
MIMAT0001080	1								
MIMAT0000226	1								
MIMAT0000420	0								
MIMAT0000258	0								
MIMAT0003260	0								
MIMAT0000281	0								
MIMAT0000094	0								
MIMAT0000099	0								
MIMAT0001536	5								
MIMAT0000318	5								

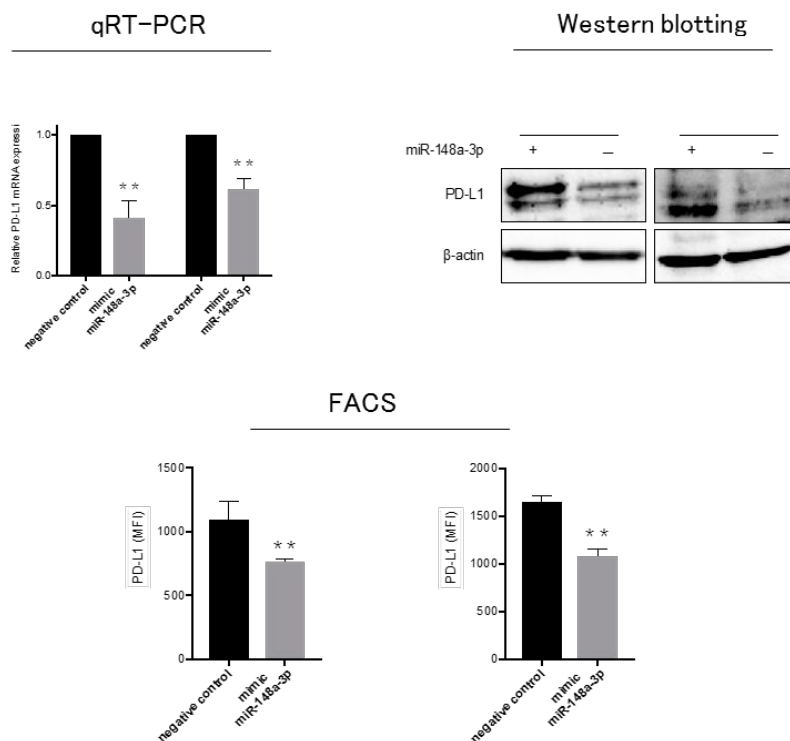
さらに、複数のマイクロ RNA 標的予測アルゴリズム (miRMap, PITA, miRanda, Targetscan, microT-CDS, miRWalk, miRDB) を用いることで、PD-L1 mRNA の 3' UTR 配列を標的とし得るマイクロ RNA として miR-148a を同定した (右上図)。さらに 148 例のマイクロ RNA・mRNA マイクロアレイデータ解析により、PD-L1 高発現症例において miR-148a は有意に発現低下していることを確認した ( $P < 0.01$ )。

同マイクロ RNA を癌細胞株に過剰発現すると (右図 A) 増殖能 (右図 B) およびコロニー形成能 (右図 C, D) が低下し、癌抑制的マイクロ RN



Aであることが確認された。

miR-148a 過剰発現による癌細胞における PD-L1 発現を qRT-PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーで評価し、mRNA・タンパク・細胞表面といずれのレベルにおいても PD-L1 発現が抑制されることを確認した(下図)。



さらなる臨床的意義や治療標的、バイオマーカーとしての意義を検討中である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ashizawa M, Okayama H, Ishigame T, Thar Min AK, Saito K, Ujiie D, Murakami Y, Kikuchi T, Nakayama Y, Noda M, Tada T, Endo H, Fujita S, Sakamoto W, Saito M, Saze Z, Momma T, Ohki S, Mimura K, Kono K. miRNA-148a-3p Regulates Immunosuppression in DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer by Targeting PD-L1. *Mol Cancer Res*. Epub ahead of print, 2019.

Shimura T, Shibata M, Gonda K, Kofunato Y, Okada R, Ishigame T, Kimura T, Kenjo A, Marubashi S, Kono K, Takenoshita S. Clinical Significance of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Interleukin-6 in Patients with Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Invest Surg*. 31(6):475-482, 2018

Mimura K, Teh JL, Okayama H, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, Smoot DT, Ashktorab H, Oike T, Suzuki Y, Fazreen Z, Asuncion BR, Shabbir A, Yong WP, So J, Soong R, Kono K. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci*. 109(1): 43-53, 2018.

Shimura T, Shibata M, Gonda K, Okayama H, Saito M, Momma T, Ohki S, Kono K. Serum transthyretin level is associated with prognosis of patients with gastric cancer. *J Surg Res*. 227: 145-150, 2018.

Saito M, Okayama H, Saito K, Ando J, Ohki S, Ishii Y, Takenoshita S. CDX2 is involved in microRNA-related inflammatory carcinogenesis in gastric cancer. *Oncol Lett*. 14(5):6184-6190, 2017.

芦澤舞, 岡山洋和, Aung Kyi Thar Min, 野田勝, 青砥慶太, 中島隆宏, 石亀輝英, 三村

耕作, 河野浩二. ミスマッチ修復機構欠損を有する大腸癌における microRNA による PD-L1 制御機構. 癌と化学療法. 44(10):889-891, 2017.

[学会発表](計 5 件)

Ashizawa M, Okayama H, Ishigame T, Mimura K, Kono K. Identification of microRNAs that target PD-L1 in mismatch repair-deficient colorectal cancer. ASCO-SITC CLINICAL IMMUNO-ONCOLOGY SYMPOSIUM; 2018/01/25-27; San Francisco

Okayama H, Ashizawa M, Kikuchi T, Sakamoto W, Fujita S, Endo H, Saito M, Momma T, Ohki S, Kono K. Targeting the tumor microenvironment in dMMR/MSI-H colorectal cancer. 第 73 回日本消化器外科学会総会; 2018/7/11-13; 鹿児島

芦澤舞, 岡山洋和, 石亀輝英, Thar Min Aung Kyi, 氏家大輔, 村上祐子, 菊池智宏, 野田勝, 青砥慶太, 中島隆宏, 早瀬傑, 坂本渉, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 三村耕作, 大木進司, 丸橋繁, 河野浩二. Identification of microRNAs that target PD-L1 in mismatch repair-deficient colorectal cancer. 第 118 回日本外科学会定期学術集会; 2018/4/5-7; 東京

渡邊 淳一郎, 木村 隆, 武藤 亮, 佐藤 直哉, 小船戸 康英, 石亀 輝英, 岡田 良, 見城 明, 志村 龍男, 河野 浩二, 丸橋 繁. 胃癌患者における腫瘍内 CD15/CD8 陽性細胞比の臨床的意義. 第 118 回日本外科学会定期学術集会; 2018/4/5-7; 東京

芦澤舞, 岡山洋和, Aung Kyi Thar Min, 野田勝, 青砥慶太, 中島隆宏, 石亀輝英, 円谷彰, 丸橋繁, 河野浩二. ミスマッチ修復機構欠損を有する大腸癌における microRNA による PD-L1 調整機構. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017/7/20-22; 金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 岡山 洋和

ローマ字氏名: OKAYAMA Hirokazu

所属研究機関名: 福島県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 20583397

研究分担者氏名: 竹之下 誠一

ローマ字氏名: TAKENOSHITA Seiichi

所属研究機関名: 福島県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 理事長

研究者番号(8桁): 10167489

研究分担者氏名: 千田 峻

ローマ字氏名: CHIDA Shun

所属研究機関名: 福島県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 博士研究員

研究者番号(8桁): 40769642

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。