

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03784

研究課題名(和文) 肉腫における体液分子診断技術の開発と標的分子による新たな腫瘍進展機序の解明

研究課題名(英文) Development of diagnostic techniques using liquid biopsy and identification of novel mechanisms of tumor progression through circulating molecules in sarcoma

研究代表者

尾崎 敏文(Ozaki, Toshifumi)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：40294459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、粘液線維肉腫(MFS)における疾患特異的microRNA(miRNA)の特定と腫瘍周囲への浸潤性との関連性、滑膜肉腫(SS)における循環細胞外小胞(EVs)を標的とした予後予測因子の探索を行った。MFS、SSの細胞株から精製したmiRNAとEVsを網羅的解析し、miR-1260bとMCT1が同定された。miR-1260bはMFS患者血清で高発現し、浸潤性MFSで高値を示し浸潤性増殖との関連を示した。SS患者血清のMCT1発現レベルはSS患者の腫瘍量を反映していることが示された。MFSおよびSSを高感度にモニターする新しい体液分子診断技術を開発し、標的分子の探索が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、早期診断や病勢把握のためのバイオマーカーが存在しない高悪性度軟部肉腫に対し、新しい体液分子診断技術を開発した。腫瘍由来microRNAおよび細胞外小胞体をリキッドバイオプシーの手法を用いて、粘液線維肉腫(MFS)および滑膜肉腫(SS)における新しい診断ならびに治療標的にもなりうる標的分子を国際的に先駆けて同定した。本手法を標準化させることで、本邦の軟部肉腫におけるプレジジョンメディシンの確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The lack of non-invasive biomarkers that can be used to monitor tumors has become a major problem in bone and soft tissue sarcomas. In this study, we aimed; (1) to identify the disease-specific microRNA (miRNA) in myxofibrosarcoma (MFS) and the novel molecular pathway of tumor progression, and (2) to detect the molecular marker of circulating extracellular vesicles (EVs) in synovial sarcoma (SS). (1) miR-1260b was highly expressed in the serum of MFS patients, and showed high levels in infiltrative MFS, indicating an association with infiltration proliferation. (2) As a surface marker for EVs from SS patient's serum, MCT1 was highly expressed in EVs from SS patients. Serum levels of MCT1 reflected tumor burden in SS patients. Collectively, we devised a new liquid biopsy technique for tumor monitoring of MFS and SS using miR-1260b and MCT1+EVs.

研究分野：整形外科

キーワード：体液分子診断 エクソソーム 骨軟部肉腫

1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は有用な血中バイオマーカーに極めて乏しく、予後改善を妨げている重要な課題である。骨軟部肉腫の一部に特異的な融合遺伝子が発見されたことで組織診断の精度が向上したが、治療奏効性や再発・転移等のモニタリングの方法は確立されていない。本疾患群においては治療モニタリングが予後改善の鍵となるため、体液診断技術(リキッドバイオプシー)の開発および臨床応用は急務である。

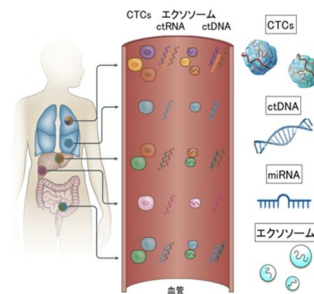


図1. 体液分子診断(リキッドバイオプシー)の概念的

近年、様々な悪性腫瘍におけるリキッドバイオプシーの開発が世界的に行われている。本法は侵襲的な組織採取を避け、体液を用いて分子遺伝学的ならびに分子生物学的手法で腫瘍由来の微量な発現変異を特定する手法である。血液や尿、唾液などの体液を利用するため、低侵襲かつ繰り返し検体の採取が可能となる。リキッドバイオプシーの主な標的としては、循環腫瘍細胞、循環核酸(microRNA(miRNA), circulating tumor DNA(ctDNA)など)細胞外小胞(EVs)が有力視されている(図1)。miRNAは疾患特異性を有し、体液中でexosomeといったEVsに内包されRNaseからの分解を逃れ、がん新規バイオマーカーとしての意義が高いのみならず、近年では腫瘍周囲微小環境に作用し浸潤・転移にも関与することが分かってきた。

我々はこれまでに特定した分泌型miRNAが、骨肉腫や滑膜肉腫において各腫瘍の病態に関与し、治療奏効性や転移のモニタリングに有効であることを報告している(参考文献1,2)。また、腫瘍由来EVsが腫瘍周囲や転移先の環境状況を変化させ、腫瘍自身の進展に有利な環境を整えていることが明らかにされつつあり、このメカニズムはなぜ肺転移が肉腫患者の大多数の死因となるかを解明する一助となるが、未だ十分に明らかにされていない。一方、循環腫瘍細胞は腫瘍早期における感度に限界があり、本研究では早期より有用であるmiRNAおよびEVsに焦点をあて、骨軟部肉腫におけるバイオマーカーの同定とその有効性の検証を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオマーカーに極めて乏しい肉腫に対し、近年確立されつつある体液診断技術の手法を検討することにより、最も有用な方法を確立することである。すなわち、(1)肉腫において臨床的に有用な腫瘍由来循環分子を特定し実用化へ展開すること、さらに、(2)特定標的分子による肉腫における新しい腫瘍進展機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)粘液線維肉腫(MFS)および(2)滑膜肉腫(SS)について、それぞれ腫瘍由来miRNAと腫瘍EVs由来の標的分子を網羅的に解析することにより、リキッドバイオプシーとして用いることのできる標的分子を抽出する(図2,3)。具体的には、MFSおよびSSの細胞株の培養上清および患者血清より、それぞれRNAならびにEVsを抽出し、両者のmiRNAはmiRNA arrayを用いて、EVsはLC/MS解析により特定する。これらの結果から各肉腫細胞から実際に分泌している循環分子に絞り、臨床上的治療効果や病理学的関連性と比較することにより治療モニタリングあるいは予後予測因子として、感度・特異度に優れた標的遺伝子を特定する。次に、各肉腫細胞株を用いて、特定された体液循環分子が腫瘍自身、腫瘍周辺微小環境ならびに遠隔転移部位での腫瘍進展に置いてどのような影響があるか評価する。

図2 MFS解析方法

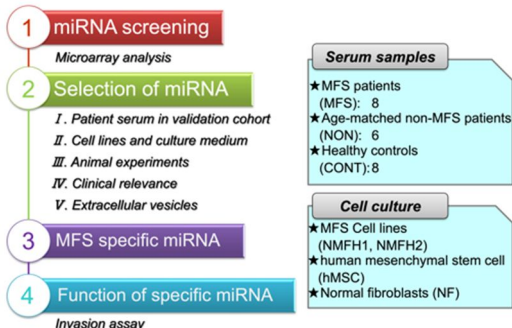
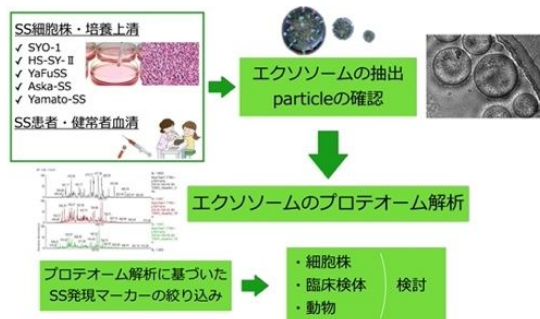


図3 SS解析方法



4. 研究成果

(1)MFSにおける循環型miRNAの特定、腫瘍周囲への浸潤性における分子学的意義: MFS患者血清および細胞株培養上清を用い、microarray解析を行った。その結果、培養上清に発現し、MFS患者で高値を示す4つのmiRNAが同定された(図4)。

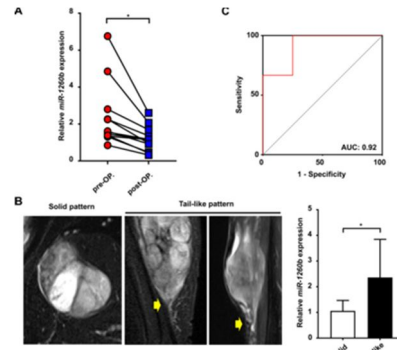
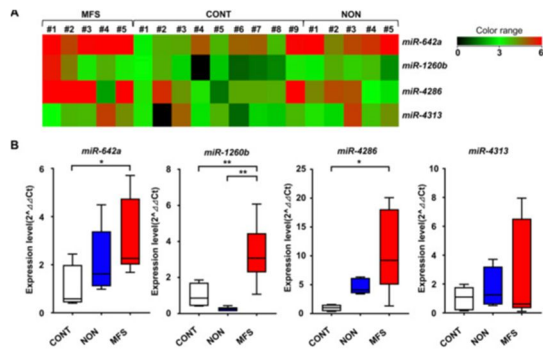


図 4. miRNA array を用いた miRNA スクリーニング 図 5. 血清 miR-1260b の臨床病理学的関連性

これらの miRNA の中で、*miR-1260b* が MFS 患者血清において腫瘍由来 EVs に内包され高レベルで発現し、さらに浸潤型 MFS 患者血清において高発現であることが示された。また、担癌マウスモデルの血清においても腫瘍動態と相関性が確認された。さらに、血清中の高い *miR-1260b* 発現は、浸潤性 MFS の特徴である放射線学的尾部様パターンと相関していた ($p=0.038$) (図 5)。

興味深いことに、細胞外に分泌された *miR-1260b* は腫瘍由来 EVs に内包され、腫瘍細胞自身に作用するのではなく、線維芽細胞に取り込まれ、*miR-1260b* の標的遺伝子の一つである *PCDH9* の発現の抑制を通じ、MFS の細胞浸潤を促進していることが判明した。

上記の結果から、血清 *miR-1260b* が MFS 患者の新規循環バイオマーカーとなりうる可能性が示された。また、EVs-*miR-1260b* は、隣接する正常細胞への伝達メッセンジャーとして MFS の浸潤性増殖を仲介し、腫瘍細胞とその微小環境との間のクロストークを介した浸潤性のメカニズムに関与するという新たな知見が得られた。

(2) SS における循環 EVs の特定、EV マーカーの分子病理学的意義：SS 患者血清由来の EVs における分子マーカーを検出することによるリキッドバイオプシー法確立のための高感度分析を行った。まず、SS 細胞株 3 種類 (SYO-1, HS-SY-II, YaFuSS) を用いて超遠心法により EVs を精製した。質量分析法を用いて網羅的にプロテオーム解析を行い、3 種類の細胞株共通で 199 種類のタンパク質が同定された (図 6)。DAVID GO 解析の結果、monocarboxylate transporter 1 (MCT1) が SS 由来の EVs の表面マーカーとして同定された。MCT1 は SS 患者血清由来の EVs で健常者血清に比べて発現が高いことが明らかになった。

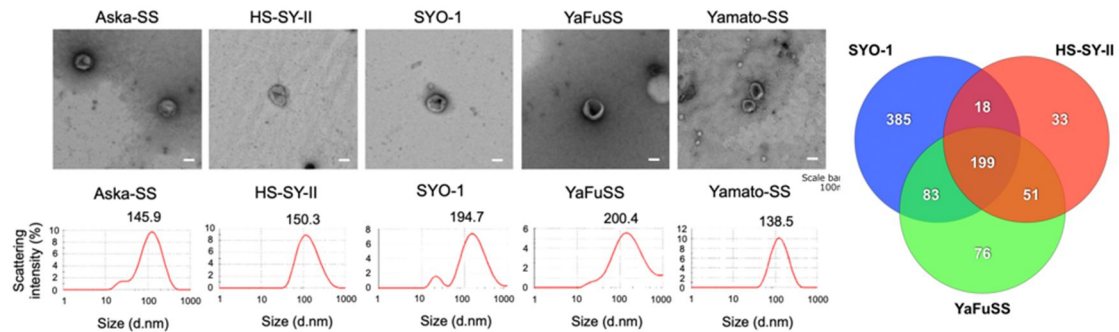


図 6. SS 細胞株由来 EVs の確認とプロテオーム解析結果

担がんマウスモデルを用いた検討では、*MCT1*⁺*CD9*⁺EVs は SS を移植したマウスからも検出され、その発現レベルは腫瘍体積と有意に相関していた ($p=0.003$)。さらに、SS 患者血清 *MCT1*⁺*CD9*⁺EVs における検出レベルは、SS 患者の腫瘍切除術前後で有意に減少し、腫瘍量を反映することが明らかとなった。また、免疫組織化学的検討では、SS の 96.7% の検体で *MCT1* が陽性であり、細胞質/細胞膜への発現は全生存率の低下と有意に関連していた ($p=0.002$) (図 7)。

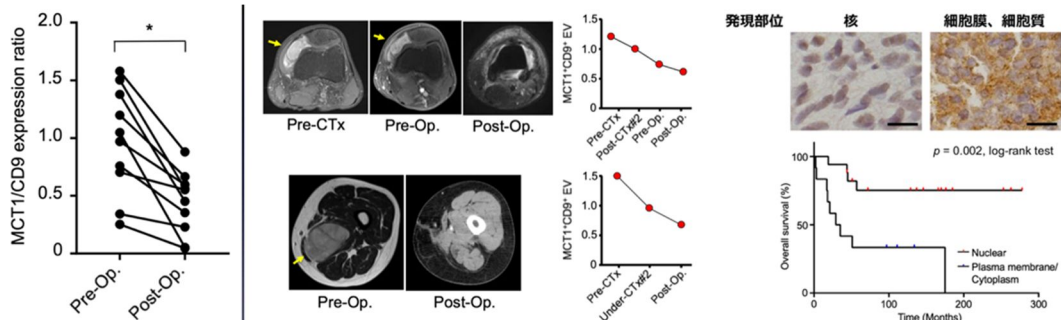


図7. SS 患者由来 EVs における MCT1 発現と SS 腫瘍組織検体での MCT1 発現評価

最後に、SS 細胞株を用いた MCT1 機能評価を行った。MCT1 の発現を抑制することで、SS 細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が低下することが明らかとなった。

上記の結果から、MCT1⁺CD9⁺ EVs は SS の病勢をモニターする新しいリキッドバイオプシーの標的となることを明らかにした。さらに、SS における MCT1 の新規治療標的としての可能性が示された。

総括：本研究では、肉腫患者の体液循環分子 (miRNA, EVs) を検出することにより、MFS, SS における腫瘍モニタリングのための高感度な分析が可能であった。

参考文献

1. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma.
Fujiwara T, Uotani K, Yoshida A, Morita T, Nezu Y, Kobayashi E, Yoshida A, Uehara T, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Takeda K, Kunisada T, Kawamura M, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T.
Oncotarget. 2017 May 16;8(20):33375-33392. doi: 10.18632/oncotarget.16498.
PMID: 28380419
2. Circulating MicroRNA-92b-3p as a Novel Biomarker for Monitoring of Synovial Sarcoma.
Uotani K, Fujiwara T, Yoshida A, Iwata S, Morita T, Kiyono M, Yokoo S, Kunisada T, Takeda K, Hasei J, Numoto K, Nezu Y, Yonemoto T, Ishii T, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T.
Sci Rep. 2017 Nov 7;7(1):14634. doi: 10.1038/s41598-017-12660-5.
PMID: 29116117

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yokoo Suguru, Fujiwara Tomohiro, Yoshida Aki, Uotani Koji, Morita Takuya, Kiyono Masahiro, Hasei Joe, Nakata Eiji, Kunisada Toshiyuki, Iwata Shintaro, Yonemoto Tsukasa, Ueda Koji, Ozaki Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Liquid Biopsy Targeting Monocarboxylate Transporter 1 on the Surface Membrane of Tumor-Derived Extracellular Vesicles from Synovial Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1823 ~ 1823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13081823	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 Fujiwara Tomohiro, Yakoub Mohamed A., Chandler Andrew, Christ Alexander B., Yang Guangli, Ouerfelli Ouathek, Rajasekhar Vinagolu K., Yoshida Aki, Kondo Hiroya, Hata Toshiaki, Tazawa Hiroshi, Dogan Yildirim, Moore Malcolm A.S., Fujiwara Toshiyoshi, Ozaki Toshifumi, Purdue Ed, Healey John H.	4. 巻 20
2. 論文標題 CSF1/CSF1R Signaling Inhibitor Pexidartinib (PLX3397) Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Stimulates T-cell Infiltration in the Sarcoma Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1388 ~ 1399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-20-0591	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 該当する

1. 著者名 Nakata Eiji, Fujiwara Tomohiro, Kunisada Toshiyuki, Ito Tastuo, Takihira Shota, Ozaki Toshifumi	4. 巻 51
2. 論文標題 Immunotherapy for sarcomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 523 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyab005	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 Fujiwara Tomohiro, Healey John, Ogura Koichi, Yoshida Aki, Kondo Hiroya, Hata Toshiaki, Kure Miho, Tazawa Hiroshi, Nakata Eiji, Kunisada Toshiyuki, Fujiwara Toshiyoshi, Ozaki Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Tumor-Associated Macrophages in Sarcomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1086 ~ 1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13051086	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 該当する

1. 著者名 藤原 智洋、中田 英二、国定 俊之、尾崎 敏文	4. 巻 1
2. 論文標題 骨・軟部腫瘍のマネジメント(その1) .診 断 2.組織・遺伝子診断 骨・軟部腫瘍におけるリキッドバイオ プシーの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 別冊整形外科	6. 最初と最後の頁 63~69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15106/j_besei79_63	査読の有無 無
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 Morita Takuya, Fujiwara Tomohiro, Yoshida Aki, Uotani Koji, Kiyono Masahiro, Yokoo Suguru, Hasei Joe, Kunisada Toshiyuki, Ozaki Toshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical relevance and functional significance of cell-free microRNA-1260b expression profiles in infiltrative myxofibrosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66120-8	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 Fujiwara Tomohiro, Tsuda Yusuke, Stevenson Jonathan, Parry Michael, Jeys Lee	4. 巻 31
2. 論文標題 Extra-articular resection of the hip joint for pelvic sarcomas: Are there any oncological and functional risks compared with intra-articular resection?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100401 ~ 100401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2021.100401	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 該当する

1. 著者名 Fujiwara Tomohiro, Ogura Koichi, Christ Alexander, Bartelstein Meredith, Kenan Shachar, Fabbri Nicola, Healey John	4. 巻 31
2. 論文標題 Periacetabular reconstruction following limb-salvage surgery for pelvic sarcomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100396 ~ 100396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2021.100396	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 該当する

1. 著者名 Fujiwara Tomohiro, Evans Scott, Stevenson Jonathan, Tsuda Yusuke, Gregory Jonathan, Grimer Robert, Abudu Adesegun	4. 巻 48
2. 論文標題 Impact of the national sarcoma guidelines on the prevalence and outcome of inadvertent excisions of soft tissue sarcomas: An observational study from a UK tertiary referral centre	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 533 ~ 540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2021.11.013	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 Chemotherapy and Surgery: Treatment of Bone and Soft Tissue Sarcoma
3. 学会等名 13th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor society (APMSTS) MEETING (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 智洋, Yakoub Mohamed, 吉田 晶, 近藤 宏也, 畑 利彰, 佐藤 浩平, たき平 将太, 中田 英二, 国定 俊之, 尾崎 敏文, Healey John
2. 発表標題 Pexidartinibの骨肉腫に対する前臨床的検討 CSF-1/CSF-1R阻害は肉腫微小環境の免疫細胞構成成分を変化させ抗腫瘍効果を発揮する
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑 利彰, 藤原 智洋, 吉田 晶, 近藤 彩奈, 片山 晴喜, 佐藤 浩平, 近藤 宏也, たき平 将太, 中田 英二, 国定 俊之, 尾崎 敏文
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージを誘導するCSF-1の分泌と血中発現の解析 浸潤性軟部肉腫における検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横尾 賢、藤原 智洋、吉田 晶、清野 正普、望月 雄介、出宮 光二、上甲 良二、久禮 美穂、尾崎 敏文
2. 発表標題 腫瘍由来エクソソームを標的とした滑膜肉腫におけるリキッドバイオプシーの開発
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清野 正普、藤原 智洋、吉田 晶、横尾 賢、出宮 光二、望月 雄介、上甲 良二、長谷井 嬢、中田 英二、国定 俊之、尾崎 敏文
2. 発表標題 骨肉腫由来エクソソームが関与する骨肉腫細胞転移の機序についての検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suguru Yokoo, Tomohiro Fujiwara, Koji Uotani, Aki Yoshida, Takuya Morita, Masahiro Kiyono, Joe Hasei, Eiji Nakata, Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 Establishment of Liquid Biopsy Targetting Exosomes Derived from Synovial Sarcoma
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担者	藤原 智洋 (Fujiwara Tomohiro) (80639211)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	長谷井 嬢 (Hasei Joe) (40636213)	岡山大学・医学部・客員研究員 (15301)	
研究分担者	杉原 進介 (Sugihara Shinsuke) (60314671)	独立行政法人国立病院機構四国がんセンター（臨床研究センター）・その他部局等・医長 (86301)	
研究分担者	畑 利彰 (Hata Toshiaki) (50880887)	岡山大学・大学病院・医員 (15301)	
研究分担者	横尾 賢 (Yokoo Suguru) (00781204)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・レジデント (82606)	
研究分担者	清野 正普 (Kiyono Masahiro) (60756097)	独立行政法人国立病院機構四国がんセンター（臨床研究センター）・その他部局等・医師 (86301)	

	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
研究協力者	森田 卓也 (Morita Takuya)		
研究協力者	植田 幸嗣 (Ueda Koji)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	落谷 孝弘 (Ochiya Takahiro)		
研究協力者	吉田 晶 (Yoshida Aki)		

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