

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23922

研究課題名（和文）サルコペニア関連microRNAの消化器癌進展に対する分子機序の解明と臨床応用

研究課題名（英文）Identification of sarcopenia-related microRNAs causing poor prognosis in sarcopenia patients with gastrointestinal cancer

研究代表者

木内 純 (Kiuchi, Jun)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：10847180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：消化器癌において、サルコペニア併存状態が不良な長期予後に関連するメカニズムについて解析した。まず骨格筋由来のmicroRNAであるmiR-133bの血中濃度が、胃癌および大腸癌患者の骨格筋量に相関していることを発見した。そしてmiR-133bが癌抑制作用を持ち、これが骨格筋から循環血中に分泌され腫瘍に送達されることにより癌の進展を抑制していること、またサルコペニア症例においてはこのmiR-133bの血中濃度が低下することにより癌の進展が助長されることを明らかにした。またエクササイズにより骨格筋量を維持することで、血中miR-133b濃度が維持され、腫瘍の進展を抑制し得ることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会において、サルコペニア併存症例は今後ますます増加することが予想され、このような症例の不良な予後を改善する治療戦略の確立が喫緊の課題である。本研究において、miR-133bがサルコペニア併存消化器癌患者の不良な予後に重大な影響を及ぼしている可能性があり、運動療法やmiR-133bの直接投与により血中miR-133b濃度を維持することが、サルコペニア併存癌患者の予後を改善する可能性があることが分かった。これはサルコペニア併存癌患者に対する治療戦略として、新たな可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：Previous reports have been showed that presence of sarcopenia had been associated with poor prognosis in patients with gastrointestinal cancers. Then, we analyzed the background mechanism causing poor prognosis in cancer patients with sarcopenia. First, we identified miR-133b, which was derived from skeletal muscle, as a plasma biomarker reflecting sarcopenia. Next, we confirmed tumor suppressive functions of miR-133b using gastric cancer cell lines. Then, we clarified that miR-133b was released from skeletal muscle to systemic circulation by incorporated in exosomes and functioned as a tumor suppressive molecule by picked up into cancer cells. Finally, we showed that exercising kept skeletal muscle volume and high levels of plasma miR-133b resulting in suppression of cancer progression in mice which was transplanted gastric cancer cells.

研究分野：消化器癌における癌抑制型microRNAの治療応用

キーワード：胃癌 大腸癌 サルコペニア 癌抑制型microRNA エクソソーム エクササイズ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、消化器癌において骨格筋量の減少(サルコペニア)が不良な短期・長期予後に関連することが報告されている。しかしその背景となる分子メカニズムについては不明な点が多い。一方で高齢者社会の進行に伴い、サルコペニア併存担癌患者は今後ますます増加してくることが予想され、サルコペニア併存患者に対する新たな治療戦略が必要であると考えた。

以前より筋細胞に高発現している miRNA (myomiR) は 4 種類ほど報告されていたが、我々はこれらの myomiR がいずれも癌抑制的な作用を有していることに着目した。

我々はこれまでに、消化器癌患者で癌の存在診断や各種の病態診断に有用な可能性のある 30 種類ほどの miRNA を同定し、次世代型のバイオマーカー候補としての高い有用性があることを腫瘍外科医の視点から世界に先駆けて報告してきた (BJC 2010-2015, Gastroenterology 2012, Oncotarget 2016 他)。その中で、癌組織で発現低下している一部の癌抑制型 miRNA が、担癌患者の血中でも健常人より著しく濃度低下していることに注目していた。血中に循環している癌抑制型 miRNA の由来について、小坂、落谷らは、生体内に異型細胞が来ると、正常細胞からの分泌型の癌抑制型 miRNA が送達され異型細胞の増殖や進展を抑制するという仮説を提唱していた (Kosaka N, Ochiya T et al. JBC 2010, JBC 2012)。我々のこれまでの解析でも miR-451 や miR-486 (Konishi et.al. BJC. 2012) miR-375 (Komatsu et.al. BJC. 2011) などの一部の癌抑制型 miRNA でこの仮説を支持する結果を得ている。また、枯渇した一部の癌抑制型 miRNA を生体内に再補充し血中濃度を回復させることが新たな抗癌核酸治療となり得ると考えた。実際に、これらの仮説を膵癌では miR-107 (Imamura, Komatsu, Kiuchi et.al. Sci Rep. 2017) で、食道扁平上皮癌では miR-655 (Kiuchi et.al. Mol Cancer. 2019) で既に実証している。

一部の癌抑制型 miRNA は筋細胞で高発現しており myomiR と呼ばれる。我々のこれまでの解析では、myomiR である miR-133b は、胃癌患者において骨格筋量に強い相関をもつことが分かった。また in vitro の解析で、miR-133b は強い癌抑制作用を持ち、骨格筋と癌細胞を共培養することで miR-133b を介した抗腫瘍効果があることを確認した。これらの結果から「サルコペニアによる骨格筋量の減少は、筋由来の癌抑制型 microRNA の血中濃度低下を来し、癌の進行を助長する」という仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、消化器癌においてサルコペニアと不良な予後との関連の背景にある癌抑制型 miRNA を介した分子メカニズムを解明し、サルコペニア併存の担癌患者に対する新規治療法を確立することである。特に運動療法による骨格筋量の維持が、癌抑制型 microRNA を介した腫瘍抑制効果に与える影響について明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 胃癌および大腸癌患者のヒト臨床血液サンプルを用いた qRT-PCR 法による、血漿 miR-133b 濃度と骨格筋量との相関解析。

(2) 胃癌および大腸癌細胞株とヒト正常骨格筋細胞との共培養系を用いた、骨格筋細胞から癌細胞への miR-133b の輸送機能とそれによる抗腫瘍効果の解析。

(3) 胃癌細胞株を移植した自発運動モデルマウスを用いた、エクササイズによるサルコペニア予防効果の検証と、それに伴う血中 miR-133b 濃度の推移および抗腫瘍効果の評価。

### 4. 研究成果

(1) 胃癌および大腸癌患者血漿サンプルにおける筋由来 microRNA (myomiR) の発現を qRT-PCR で解析し、その中で血漿中 myomiR-133b 濃度が患者の骨格筋量に相関していることを発見した。血漿 miR-133b 濃度低値は胃癌および大腸癌患者において、独立した予後不良因子であった。

(2) ヒト胃癌細胞株を移植したヌードマウスにおいて、癌の進行とともに骨格筋量は経時的に減少した。それとともに血漿 miR-133b 濃度も低下し、骨格筋量と血漿 miR-133b 濃度には正の相関関係を認めた。マウスでの検証においても、ヒト臨床データを裏付ける結果となった。

(3) ヒト正常骨格筋細胞において、miR-133b は著明に高発現していた。ヒト胃癌細胞株に miR-133b を過剰発現させたところ、増殖能、遊走・浸潤能は有意に抑制され、miR-133b の腫瘍抑制効果が確認された。

(4) 胃癌細胞株とヒト正常骨格筋細胞株 (SkMC) を共培養したところ胃癌細胞株の増殖能は、SkMC 細胞の濃度依存的に抑制され、また SkMC 細胞の miR-133b の発現を anti-miRNA を用いて抑制したところ、胃癌細胞株の増殖能、遊走・浸潤能は回復した。さらに、培地中のエクソソーム内の miR-133b 濃度は、SkMC との共培養によって有意に上昇し、また SkMC 内の miR-133b 発現を抑制すると低下した。また、培地中の miR-133b 濃度増加に伴い胃癌細胞株内の miR-133b 濃度も増加した。これらの結果から、骨格筋は癌抑制型 miR-133b をエクソソームに埋包する形で体液中に分泌し、これが癌細胞に送達されることでその進展が抑制されることが確認できた。また骨格筋細胞の減少などによる体液中の miR-133b 濃度の減少が、腫瘍の進展を助長することが再現

された。これはサルコペニアによる骨格筋量の減少自体が癌の進行を誘導し得るという、これまでに報告のない分子機序である。

(5) 胃癌細胞株を移植したヌードマウスを自発運動させると、非自発運動マウスと比較して骨格筋量は高値で維持された。それに伴い、血漿 miR-133b 濃度は高値で維持され、腫瘍の増殖は有意に抑制された。また、胃癌細胞株を移植したマウスに、アテロコラーゲンをを用いて miR-133b を皮下投与すると、血中 miR-133b 濃度は上昇し、有意な腫瘍抑制効果を示した。一方で、miR-133b 投与による骨格筋量への影響は認めなかった。これらの結果は、担癌患者において、運動療法による骨格筋量の維持や miR-133b の投与により血中 miR-133b 濃度を維持することで腫瘍の進行を抑制する可能性があり、サルコペニア併存担癌患者に対する新規の治療戦略となり得ることを示す結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木内純、小松周平、西別府敬士、岸本拓磨、高嶋祐助、大辻英吾
2. 発表標題 Sarcopenia causes down-regulation of plasma miR-133b and cancer progression in gastric cancer
3. 学会等名 第11回 日本RNAi研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木内純、小松周平、西別府敬士、岸本拓磨、久保秀正、庄田勝俊、小菅敏幸、窪田健、岡本和真、有田智洋、小西博貴、森村玲、村山康利、塩崎敦、栗生宜明、生駒久視、中西正芳、藤原斉、大辻英吾
2. 発表標題 胃癌サルコペニアに関連する骨格筋由来癌抑制型miR-133bの同定と運動負荷によるmiR-133b介した抗腫瘍効果
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木内純、小松周平、西別府敬士、岸本拓磨、庄田勝俊、小菅敏幸、窪田健、有田智洋、小西博貴、塩崎敦、中西正芳、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 胃癌患者のサルコペニアに関与する血漿microRNAの同定とその分子動態の解析
3. 学会等名 第44回 日本外科系連合学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木内純、小松周平、西別府敬士、岸本拓磨、川口耕、庄田勝俊、有田智洋、小菅敏幸、小西博貴、塩崎敦、窪田健、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 Loss of skeletal muscle volume causes down-regulation of plasma miR-133b and cancer progression in gastric cancer
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木内純、小松周平、大辻英吾
2. 発表標題 胃癌サルコペニアにおけるmicroRNAを介した癌進展機構の解明
3. 学会等名 2020年 日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木内純、小松周平、西別府敬士、岸本拓磨、高嶋祐助、久保秀正、工藤道弘、有田智洋、小菅敏幸、小西博貴、森村玲、村山康利、塩崎敦、栗生宜明、生駒久視、窪田健、中西正芳、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 消化器癌サルコペニアにおける血漿miR-133b濃度低下を介した腫瘍進行メカニズムとエクササイズによる抗腫瘍効果
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木内純、小松周平、大橋拓馬、岸本拓磨、高嶋祐助、有田智洋、清水浩紀、小西博貴、塩崎敦、栗生宜明、窪田健、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 Loss of skeletal muscle causes poor prognosis via down-regulation of plasma myo-miR-133b in gastrointestinal cancer
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木内純、小松周平、有田智洋、村山康利、栗生宜明、窪田健、中西正芳、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 術前サルコペニアが高齢者大腸癌患者に及ぼす影響とその背景となる筋細胞 - 癌細胞間の分子送達機構の解析
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木内純、小松周平、大橋拓馬、岸本拓磨、高嶋祐助、神谷肇、有田智洋、清水浩紀、栗生宜明、久保秀正、小西博貴、山本有祐、森村玲、塩崎敦、生駒久視、窪田健、藤原斉、岡本和真、大辻英吾
2. 発表標題 消化器癌サルコペニアにおける循環血漿microRNAを介した腫瘍進行メカニズムとエクササイズによる抗腫瘍効果
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

報告書作成時現在、本研究結果は論文文化しジャーナルに投稿中である。

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

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