

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09062

研究課題名(和文) 食道癌の分泌型癌抑制microRNAを用いた治療感受性予測・核酸治療法の開発

研究課題名(英文) Blood microRNAs as a predictive biomarker of chemosensitivity, and a target of nucleic therapy in oesophageal cancer

研究代表者

藤原 斉 (Fujiwara, Hitoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20332950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌患者の術前化学療法前の血中miRNAを用いて、網羅的アレイ解析により、織学的効果判定でGrade2以上(著効群)症例と比べGrade0(非奏功群)症例で低発現を認めるmiRNA群、即ち抗癌剤感受性に関連するmiRNA候補を選出した。最終候補としてmiR-1254を同定した。miR-1254を細胞株に過剰発現させ、in vitroで抗がん剤の感受性を回復を確認し、標的となる抗癌剤耐性癌関連遺伝子も探索し薬物感受性回復効果の分子機序も明らかにした。マウス担癌モデルを用いて、miR-1254皮下投与による体液を介した強力な抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果可能とする抗がん核酸治療法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、一部の癌抑制型miRNAは正常細胞からも癌細胞の増殖抑制を目的として血中に分泌されるが、それらが枯渇することで癌の増殖、浸潤、転移などの悪性化、抗癌剤への耐性化が導かれる可能性がある。また、枯渇した癌抑制型miRNAを生体内に再導入し血中濃度を回復させて維持することで、抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果を得ることができる可能性がある。食道癌の体液中の分泌型癌抑制型miRNA濃度による癌の悪性度診断や抗癌剤感受性診断のみならず、分泌型の癌抑制型miRNAを用いた血液・体液を介した抗腫瘍効果や抗癌剤感受性回復効果を目的とした新たな癌治療の可能性を世界に先駆け報告するものである。

研究成果の概要(英文)：We selected four miRNA candidates (miR-323, 345, 409 and 1254) based on the microRNA microarray comparing pre-treatment plasma levels in ESCC patients with high and low histopathological responses to neoadjuvant chemotherapy (NAC). Among these miRNA candidates, miR-1254 was more highly elevated in pre-treatment plasma of ESCC patients with a high histopathological response than in those with a low histopathological response ($P=0.0021$; AUC 0.7621). High plasma miR-1254 levels tended to correlate with the absence of venous invasion ($P=0.0710$) and were an independent factor predicting a higher response to chemotherapy ($P=0.0022$; Odds ratio 7.86) and better prognosis ($P=0.0235$; Hazard ratio 0.23). Overexpressing miR-1254 in ESCC cells significantly enhanced chemosensitivity to cisplatin through the transcriptional regulation of ABCG1 in vitro. Moreover, increased plasma miR-1254 levels by subcutaneous injection significantly improved responses to CDDP in mice.

研究分野：リキッドバイオプシー

キーワード：食道癌 microRNA 抗がん剤 抗がん核酸治療 バイオマーカー リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

2008年に血中で miRNA が高い安定性を獲得してリボヌクレアーゼ活性から守られた状態であることを知り (Chen X et al. Cell Res 2008, Mitchell PS et al. PNAS 2008)、血中 miRNA を指標とした消化器癌のバイオマーカー探索研究を開始した。特に、食道癌、胃癌、膵癌等の消化器癌患者で、過去の文献から癌組織中で高頻度に高発現する miRNA やクラスター内の miRNA に注目し、あるいは、血中 miRNA のマイクロアレイを用いた網羅的解析により、癌患者と健常人、術前と術後の比較から、癌の存在診断、モニタリング診断、悪性度診断、予後予測診断に有用な可能性のある 20 種類以上の 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 (Br J Cancer 2010-2015, Gastroenterology 2012, Oncotarget 2016 他)。また、癌組織で発現低下している Let-7a や miR-375 などの一部の癌抑制遺伝子型 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た (Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S et al. Br J Cancer 2010, Komatsu S, Fujiwara H et al. Br J Cancer 2011, Kawaguchi T, Komatsu S et al. Br J Cancer 2013)。実際、miR-451 や miR-486 などの一部の癌抑制型 miRNA は、初期のステージの癌では血中濃度が保たれ、癌の進行とともに血中濃度が低下することが明らかとなった (Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, Fujiwara H et al. Br J Cancer 2012)。一方では、進行癌でも予後の良い症例においては、これらの癌抑制型 miRNA の血中濃度が有意に高いことも明らかとなった。(Komatsu S, Fujiwara H et al. Br J Cancer 2011, Komatsu S, Fujiwara H et al. Expert Opinion Biol Therapy 2012) (図 2、図 3)。これらの結果から、一部の癌抑制型 miRNA は正常細胞からも癌細胞の増殖抑制を目的として血中に分泌されるが、それらが枯渇することで癌の増殖、浸潤、転移などの悪性化、抗癌剤への耐性化が導かれる可能性があると考えた。また、枯渇した一部の癌抑制型 miRNA を生体内に再導入し血中濃度を回復させて維持することで、抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果を得ることができる可能性があるという仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究は、食道癌の体液中の分泌型の癌抑制型 miRNA 濃度による癌の悪性度診断や抗癌剤感受性診断のみならず、さらには分泌型の癌抑制型 miRNA を用いた血液・体液を介した抗腫瘍効果や抗癌剤感受性回復効果を目的とした新たな癌治療の可能性を世界に先駆けて検証するものである。分泌型の癌抑制型 miRNA を指標とした次世代型のがん治療戦略の構築を可能とする、斬新な研究である。

3. 研究の方法

化学療法の非奏功患者群の血中で著しく濃度低下した miRNA 候補群の網羅的探索と機能解析

術前化学療法効果を予測する鋭敏なバイオマーカーがあれば、より適切な個別化治療の実現が可能となる。当院では Stagell-III 食道癌患者に 5-FU (800mg/m²) + CDDP (80mg/m²)

を 2 コース行う術前化学療法を施行している。食道癌患者の術前化学療法前の血漿中 miRNA を用いて、東レ 3D Gene microRNA マイクロアレイを用いた網羅的アレイ解析により、織学的効果判定で Grade2 以上(著効群)症例と比べ Grade0(非奏功群)症例で低発現を認める miRNA 群、即ち抗癌剤感受性に関連する miRNA 候補(特に分泌型の癌抑制型 miRNA)も網羅的に選出する。

癌細胞株での過剰発現により腫瘍増殖・浸潤・転移抑制効果の極めて強い miRNA 候補への絞り込み

癌細胞株へ候補 miRNA の mimic miRNA を過剰発現し、MTT アッセイ、Migration/invasion アッセイで細胞増殖・遊走・浸潤の抑制効果の確認を行う。In vivo 解析を視野にいれて、特に抗腫瘍効果の著しい miRNA に絞り込む。さらに標的癌関連遺伝子の発現変化を解析し、抗腫瘍効果の分子機序を明らかにする。

抑制型 miRNA を投与して体液中の濃度を回復、維持することによる抗腫瘍効果、治療薬感受性回復を目的とした抗がん核酸治療への応用

AteloGene® Systemic Use (KOKEN, Tokyo, Japan)を用いた癌抑制型 miRNA 候補を皮下、腹腔内あるいは尾静脈から全身投与を行い、体液を介した抗腫瘍効果、治療薬感受性回復効果を評価する予定である。体液を介した抗腫瘍効果については、膵癌で癌抑制型 miR-107、食道癌で癌抑制型 miR-655 の成果で報告している(Scientific Reports 2017, Molecular Cancer 2019)。

4 . 研究成果

今回、これまでの研究手法を基盤に、食道癌患者血中で枯渇している癌抑制型 microRNA に注目し、悪性度診断、治療感受性診断を可能とする候補を網羅的に探索した。具体的には、食道癌患者の術前化学療法前の血漿中 miRNA を用いて、網羅的アレイ解析により、織学的効果判定で Grade2 以上(著効群)症例と比べ Grade0(非奏功群)症例で低発現を認める miRNA 群、即ち抗癌剤感受性に関連する miRNA 候補(特に分泌型の癌抑制型 miRNA)も網羅的に選出した。次に、候補 miR の絞り込みと多数症例で validation study を行った。最終候補として miR-1254 を同定した。次に、miR-1254 mimic を細胞株に過剰発現させ、in vitro で抗がん剤の感受性を回復することを確認し、また標的となる抗癌剤耐性癌関連遺伝子も探索し、薬物感受性回復効果の分子機序も明らかにした。さらに、マウス担癌モデルを用いて、miR-1254 皮下投与による体液を介した強力な抗腫瘍効果、抗癌剤感受性回復効果の実現可能とする新たな抗がん核酸治療法を構築した。本研究成果は、京都府立医科大学特任准教授・小松周平博士を中心に発案、実施、研究指導を行い、大学院生とともに施行し、2023年の Cancer Science に報告した。代表申請者は研究と統括した。

Takashima Y, Komatsu S, Ohashi T, Kiuchi J, Nishibeppu K, Kamiya H, Arakawa H, Ishida R, Shimizu H, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Kubota T, Fujiwara H, Otsuji E. Plasma miR-1254 as a predictive biomarker of chemosensitivity and atarget of nucleic acid therapy in esophageal cancer. Cancer Sci. 2023 Epub ahead of print. PMID: 37190912.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shuhei Komatsu , Taisuke Imamura , Jun Kiuchi , Yusuke Takashima , Hajime Kamiya , Takuma Ohashi , Hiroataka Konishi , Atsushi Shiozaki , Takeshi Kubota , Kazuma Okamoto , Eigo Otsuji	4. 巻 11(12)
2. 論文標題 Depletion of tumor suppressor miRNA-148a in plasma relates to tumor progression and poor outcomes in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2944-2956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Koji Takao , Hiroataka Konishi , Daiki Matsubara , Katsutoshi Shoda , Tomohiro Arita , Hiroki Shimizu , Shuhei Komatsu , Atsushi Shiozaki , Yusuke Yamamoto , Takeshi Kubota , Hitoshi Fujiwara , Kazuma Okamoto , Eigo Otsuji	4. 巻 41(5)
2. 論文標題 MiR-3663-3p Inhibits the Progression of Gastric Cancer Through the CCND1 Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 2441-2449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer	査読の有無 有
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 Takabatake K, Konishi H, Komatsu S, Fujiwara H, Otsuji E et al.	4. 巻 46(6)
2. 論文標題 Anterior gradient 2 regulates cancer progression in TP53 wild type esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.8211.	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 Matsumoto Y, Shiozaki A, Komatsu S, Fujiwara H, Otsuji E et al	4. 巻 28(11)
2. 論文標題 Expression and Role of CFTR in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 6424-6436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-09752-y.	査読の有無 有
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 Mitsuda M, Shiozaki A, Komatsu S, Fujiwara H, Otsuji E et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional Analysis and Clinical Significance of Chloride Channel 2 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-09659-8.	査読の有無 有
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 Nishibeppu K, Komatsu S, Fujiwara H et al.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Plasma microRNA profiles: identification of miR-1229-3p as a novel chemoresistant and prognostic biomarker in gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59939-8.	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 Nanishi K, Shoda K, Komatsu S, Fujiwara H et al.	4. 巻 111(11)
2. 論文標題 Circulating circERBB2 as a potential prognostic biomarker for gastric cancer: An investigative study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 4177-4186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14645.	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 Matsubara D, Konishi H, Komatsu S, Fujiwara H et al.	4. 巻 27(9)
2. 論文標題 Involvement of Intracellular and Extracellular High-Mobility Group Box-1 in the Progression of Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 3233-3244.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08363-3.	査読の有無 有
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 Katsurahara K, Shiozaki A, Komatsu S, Fujiwara H et al.	4. 巻 27(9)
2. 論文標題 AN09 Regulated Cell Cycle in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 3218-3230.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08368-y.	査読の有無 有
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 Takashima Y, Komatsu S, Fujiwara H, Otsuji E et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Plasma miR-1254 as a predictive biomarker of chemosensitivity and atarget of nucleic acid therapy in esophageal cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15830.	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小松周平、藤原 斉、大辻英吾 他
2. 発表標題 New era of myomiR-133b in blood for sarcopenia-related tumor progression and nucleic acid therapy in gastric cancer
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木内 純、小松周平、藤原 斉、大辻英吾 他
2. 発表標題 The restoration of the depleted miR-143 in plasma is a novel anticancer treatment for esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷 肇、小松周平、藤原 斉、大辻英吾 他
2. 発表標題 Histological heterogeneity contributes to lymph node metastasis via intercellular transfer of miR-21 in gastric cancer
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松周平、藤原 斉 他
2. 発表標題 血中分泌型microRNAを用いた胃癌の抗がん剤感受性診断予測と抗がん核酸治療
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高嶋 祐助、小松周平、藤原 斉 他
2. 発表標題 分化・未分化混在型胃癌におけるmicroRNAを介した悪性化機序の解明
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木内 純、小松周平、藤原 斉 他
2. 発表標題 消化器癌における筋由来血中miR-133bを用いたサルコペニア病態診断とその治療応用
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷 肇、小松周平、藤原 斉 他
2. 発表標題 食道胃接合部腺癌における新規癌関連遺伝子CDCA3の癌化機構の解明と臨床応用
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋拓馬、小松周平、藤原 斉 他
2. 発表標題 胃食道接合部癌における新規の癌関連遺伝子SMYD2の発現意義と臨床応用
3. 学会等名 日本癌学会総会
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	大辻 英吾 (Otsuji Eigo) (20244600)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究 分担者	小松 周平 (Komatsu Shuhei) (40578978)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授 (24303)	

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
---------	---------