

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17683

研究課題名（和文）食道扁平上皮癌の治療抵抗性改善薬としての人工環状RNA医薬の開発

研究課題名（英文）Development of an Artificial Circular RNA Medicine for overcoming treatment resistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

阪野 佳弘（Sakano, Yoshihiro）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20850267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、食道扁平上皮癌の治療抵抗性と関連するcircRNAを特定することである。

ESCCの細胞株であるTE11と、樹立したTE11シスプラチン耐性株（TE11R）を次世代シーケンスにて解析し、CDDP抵抗性に関連するcircXを同定した。また、circXのノックダウンによって薬剤感受性が増強することが確認された。また、シスプラチンを含む化学療法を施行後に外科的切除を行った食道扁平上皮癌46例について、組織におけるCircXの発現を定量したところ、治療前生検組織でcircXの高発現と治療抵抗性に相関を認めた。CircXは治療抵抗性に関わる因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、食道扁平上皮癌と関連するcircRNAを特定することができた。これまで、circRNAを用いた核酸医薬は未だ開発されていないが、circRNAのその安定した構造と、転写翻訳を制御する機能を有する点に着目し、核酸医薬の次世代の主役として期待される。今後は、特定されたcircRNAを用いた新たな核酸医薬の開発につながるかと考えられる。また、本研究により食道癌におけるCDDP抵抗性に関与するcircRNAを同定することで、新たなバイオマーカーとなる可能性を秘めており、その恩恵は多大であると考えている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify circRNAs associated with treatment resistance in esophageal squamous cell carcinoma.

We analyzed the ESCC cell line TE11 and the established TE11 cisplatin-resistant line (TE11R) by next-generation sequencing to identify circX associated with CDDP resistance. It was also confirmed that knockdown of circX enhanced drug sensitivity. In addition, we quantified CircX expression in the tissues of 46 patients with esophageal squamous cell carcinoma who underwent surgical resection after cisplatin-containing chemotherapy, and found a correlation between high CircX expression and treatment resistance in pretreatment biopsy tissues, suggesting that CircX may be a factor involved in treatment resistance.

研究分野：消化器外科

キーワード：環状RNA 食道癌

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は、固形癌の中でも最も悪性度が高い癌の一つである。化学療法、手術、放射線療法を用いた集学的治療が進歩しつつあるが、治療に抵抗性を示す症例も多く、依然として予後は不良である。治療効果の改善のため、治療抵抗性メカニズムの解明や新規の治療法の開発は喫緊の課題である。circRNA は数百～数千程度の塩基からなり、環状構造を有することにより線状RNA よりも安定している。1000 種以上の存在が確認され、豊富に発現している。また、組織特異性や分化度特異性を有し、原始的な種からヒトに至るまで進化を経て保存されている。circRNA の持つこれらの機能や特性から、新たなバイオマーカーや核酸医薬の主演としての有用性が期待されている。circRNA の機能として、microRNA(miRNA)をスポンジのように吸着してその働きを阻害すること、RNA 結合タンパク質(RBPs)を制御することが明らかになっている。つまり、circRNA は miRNA や RBPs よりも上流で転写、翻訳機構を制御する役割を担っている。しかしながら、食道癌における circRNA の発現状況や治療抵抗性に関連する circRNA に関する情報は無いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道扁平上皮癌と関連する circRNA を特定し、新たなバイオマーカーを開発すること、さらには、特定された circRNA を用いた新たな核酸医薬の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

target circRNA の探索

・治療抵抗性に関連する circRNA を探索するために、食道扁平上皮癌 (ESCC) の細胞株である TE11 と、TE11 から樹立したシスプラチン耐性株 (TE11R) における circRNA の発現について NGS を用いて網羅的に解析を行う。

食道癌細胞株および臨床検体での発現の定量

・NGS にて抽出された候補 circRNA の primer を設計し、PCR での定量法を確立する。
・食道扁平上皮癌細胞株 TE11 と TE11 にシスプラチンを長期暴露して樹立した耐性株において、NGS の結果を PCR で validation を行い、さらに候補 circRNA を絞り込む。
・ESCC 凍結組織検体(内視鏡、手術)の癌部と非癌部から Trizol RS を使用して RNA を抽出し、RT-PCR にて発現定量を行う。

食道癌細胞株を用いた target circRNA の機能解析

・候補 circRNA のノックダウンによる化学療法感受性の変化を検討する。
・候補 circRNA と相補的な配列の miRNA をデータベースから検出し、さらに miRNA の target 遺伝子を検索し、circRNA-miRNA のネットワーク図を作成する。Gene ontology 解析を行い、候補 circRNA の下流シグナルを見出す。

4. 研究成果

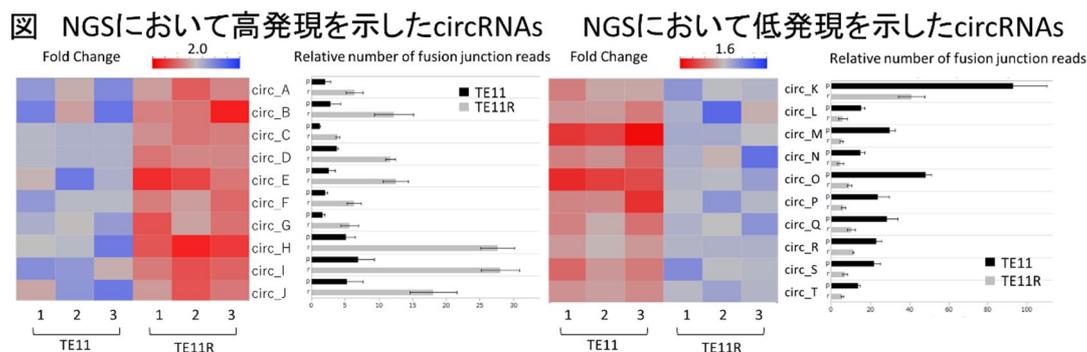
target circRNA の探索

・circRNA についてより効率的にシークエンスを行うために circRNA の濃縮を行った。具体的には、抽出した total RNA よりリボソーム RNA を除去したのち、RNase R を用いて線状 RNA を分解除去した。食道扁平上皮癌細胞株 TE11 と TE11 にシスプラチンを長期暴露して樹立した耐性株を用いて、まずは小型の NGS 機によるパイロットシークエンスを行った。パイロットシークエンスでは、リード数やサンプル数、circRNA の濃縮処理、解析法の妥当性を検討した。条件設定を目的とした小規模なリード数でのシークエンスであったが、ペアエンド法にて解析後、circRNA の検出ツールを用いて検討したところ、計 300 超の circRNA を検出することが可

能であった。

・ついで、ESCC の細胞株である TE11 をシスプラチン(CDDP)に暴露し、TE11CDDP 耐性株 (TE11R)の各 3 検体ずつ 6 検体を解析対象とし、それぞれから抽出した RNA を Illumina HiSeq® を用いて解析し、CIRCexplorer®を用いて circRNA の検索を行った。CIRCexplorer®にて 19085 の circRNA が検出され、87 が TE11R で有意に高発現($p < 0.05$, fold-change > 2.0)、105 が有意に低発現($p < 0.05$, fold-change < 0.5)であった。

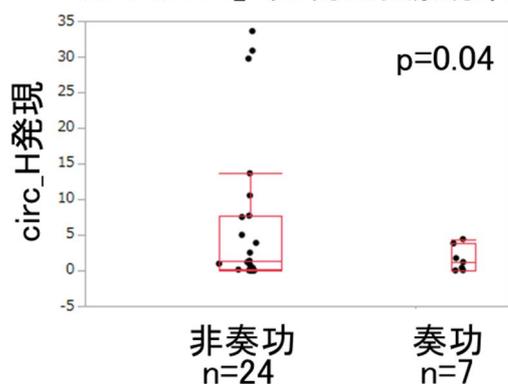
食道癌細胞株および臨床検体での発現の定量
食道扁平上皮癌細胞株 TE11 と TE11 にシスプラチンを長期暴露して樹立した耐性株において、NGS の結果を PCR で validation を行った (図)。



TE11R において低または高発現を示した target のうちそれぞれ 5 の target について、TE11、TE11R、TE8、TE8CDDP 耐性株 (TE8R) における発現を RT-PCR 法にて定量した。10 のうち 7 target において TE11 と TE11R にて NGS と整合性のある発現が定量された。また、そのうち 3 target において、TE8 と TE8R でも TE11 と TE11R での発現パターンが再現された。今回我々は、circH に着目して化学療法前の生検検体での発現を解析した。

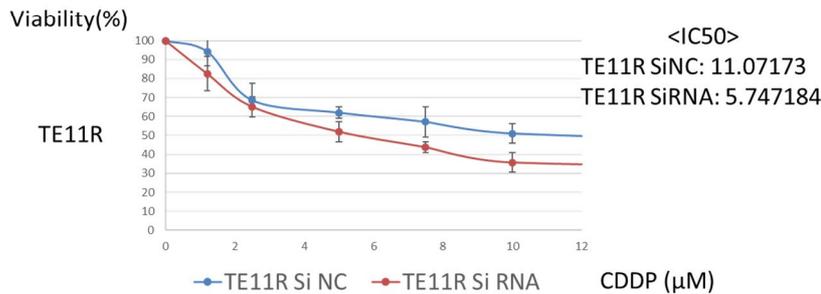
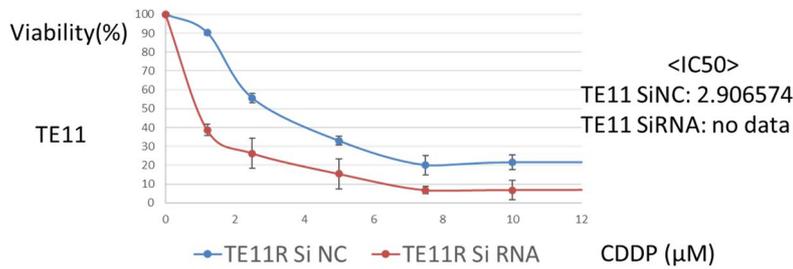
その結果、circH の発現と治療効果が相関していることを確認した (図)。

図. 化学療法前の癌部におけるcirc_H発現と治療効果



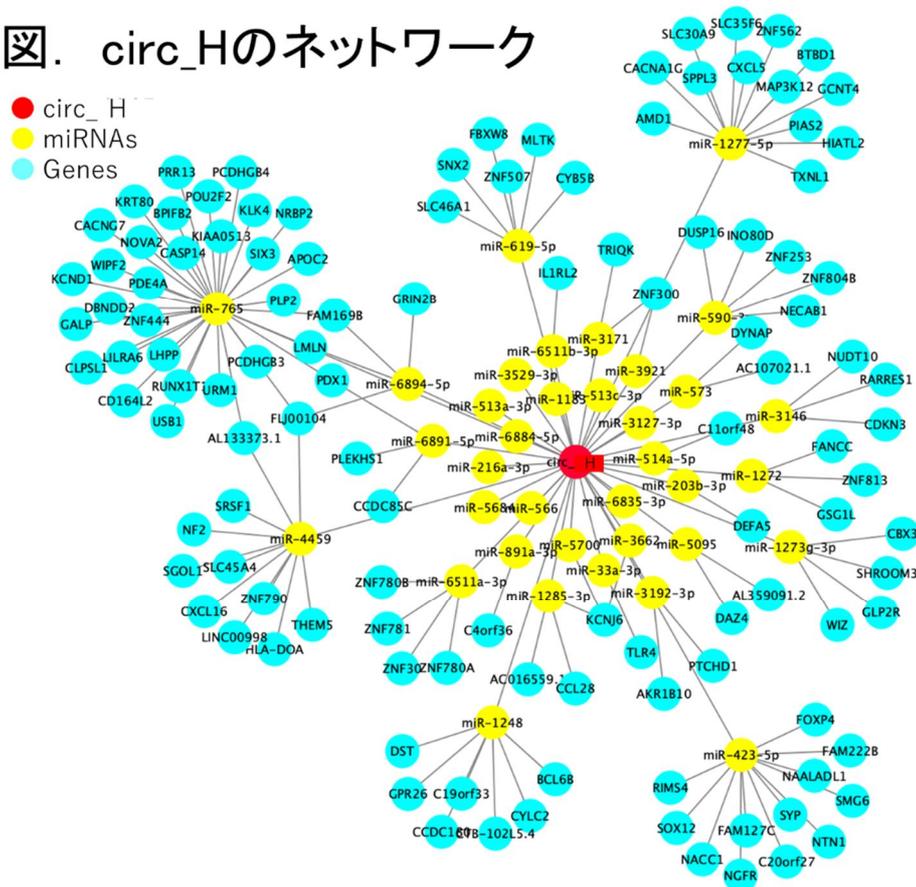
食道癌細胞株を用いた target circRNA の機能解析

・TE11 および TE11R にて circH を siRNA を用いてノックダウンし薬剤感受性試験を行ったところ、circH のノックダウンによって薬剤感受性が増強することが確認された (図)。



・ circRNA を用いた治療応用への可能性を検討するために、今回抽出した circ_H の下流シグナルについて検討した(図)

図. circ_Hのネットワーク



Gene ontology 解析の結果、circ_H は Transcription regulation, DNA-binding, Nucleus, Alternative splicing などと相関が強く、遺伝子の転写に強く関連することが分かった。特に、スプライシング関連因子として SRSF1 (serine/arginine-rich splicing factor 1) を代表として 14 種の RBP と相互作用を示す可能性を見出した。

まとめ

これらの研究成果から、CDDP 抵抗性に関連する circRNA の抽出に成功した。治療前の生検組織から治療感受性予測が可能となりうることが分かった。また、circH の下流シグナルを同定することに成功した。今後の核酸医薬品開発につながる研究成果である。またバイオマーカーの有効性に関しては、多数の臨床検体での検証を行う必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 食道扁平上皮癌における治療抵抗性に関連するcircular RNAの網羅的探索
2. 発表標題 山田萌、田中晃司、山下公太郎、牧野知紀、山崎誠1、西塔拓郎、高橋剛、黒川幸典、中島清一、森正樹、土岐祐一郎
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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