

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15563

研究課題名（和文）食道癌における手術回避を目指した腫瘍と宿主の双方向性モニタリング手法確立

研究課題名（英文）Monitoring tumor burden using liquid biopsy for esophageal cancer

研究代表者

松田 諭（Satoru, Matsuda）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30594725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：術前化学療法後に手術を施行された食道癌患者を対象にctDNAの検討を行った。結果として、TP53を中心に、食道扁平上皮癌原発巣高頻度に存在する変異がctDNAとして検出された。さらに、術後1-3ヵ月時点のctDNAの有無が早期再発を鋭敏に反映することを示した。これらは、研究者らの独自手法によって評価されたctDNAの食道扁平上皮癌における腫瘍モニタリング手法として有用であることを示す結果となったと考えている。

尿中miRNAについては、健常者、食道がん患者の尿検体を解析し、腫瘍量の勾配に合致する変動を示すmiRNAの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌における腫瘍モニタリング手法の開発に有用な評価方法の開発に成功した。本手法の精度をさらに向上させていくことにより、薬物療法奏効例への手術回避戦略の実現が可能となると考えている。

研究成果の概要（英文）：The ctDNA was examined in patients with esophageal cancer who had undergone surgery after preoperative chemotherapy at our institution. As a result, ctDNA was detected for TP53 and other mutations that are frequently present in primary tumours of oesophageal squamous cell carcinoma. Furthermore, the presence or absence of ctDNA at 1-3 months post-operatively was shown to sensitively reflect early recurrence. We believe that these results demonstrate the usefulness of ctDNA as a tumour monitoring method in oesophageal squamous cell carcinoma.

For tumour monitoring using urinary miRNAs, urine was processed using a microfluidic device, and miRNA expression was comprehensively analysed by microarray in healthy subjects/advanced/early-stage cancers respectively. As a result, 15 miRNAs whose expression increased along a tumour burden were captured. This study suggests that it might be possible to determine the presence or absence of tumours using urinary miRNA profiles.

研究分野：食道癌

キーワード：食道癌 リキッドバイオプシー ctDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

切除可能進行食道癌に対しては、術前化学療法(Neoadjuvant chemotherapy, NAC)後の手術が標準治療であるが、その奏効率向上に伴い、切除検体に遺残腫瘍を認めない病理学的完全奏効(pCR)率が上昇している。実際に、本研究課題申請当時が開発が進められていた3剤併用化学療法によるpCR率は18%程度であった。同患者を術前に見極めることができれば、高度侵襲を伴う食道切除術を回避可能となるため、患者利益が大きい。一方で、現行の病勢評価手法である内視鏡、CT検査は、治療後の微小遺残病変の有無の判定を高精度に行うためには精度は十分ではない。

全身の腫瘍量を反映する手法として、血液や尿などの体液中に存在する癌由来のDNAやRNAなどを評価するリキッドバイオプシーの開発が多くの癌種において進んでいる。申請者はこれまで、食道癌患者における血中 circulating tumor DNA (ctDNA) や尿中 miRNA による病勢評価手法の開発に取り組んできた。また、宿主の状態を反映する、血中凝固因子の予後予測因子としての有用性を報告してきた。

また、手術可能な食道癌において、NACの奏効が強力な予後規定因子であることが過去に複数の研究で示されている。したがって、術前化学療法の奏効率向上は、長期成績改善に直結すると考えられた。しかし、薬剤耐性メカニズム同定からの新規薬剤開発には長期を要する問題があることから、既存の薬剤を薬剤耐性克服に用いる Drug repositioning が有効な可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍由来の血中 ctDNA、尿に含まれる細胞外小胞(Extracellular vesicle, EV)中の miRNA、そして癌に対する宿主反応を反映する血中凝固因子という複数のリキッドバイオプシーを組み合わせることで、NAC後の遺残腫瘍量を精度高く定量する指標の確立することである。

あわせて本研究では、既存の1200薬剤の Drug screening により、NACとの併用により奏効率を高めることができる薬剤を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

腫瘍と宿主の双方向性モニタリングによる遺残腫瘍検出手法確立

血液中に存在する遺伝子変異を有する DNA (cell free tumor DNA, cfDNA) を、NAC 前後の患者血漿を用いた遺伝子パネル解析(Roche diagnostic AVENIO Expanded kit)によって評価する。さらに解析対象全例において、ドライバー遺伝子を含む160遺伝子対象としたクリニカルシーケンスパネル(PleSSision-Rapid)により、原発巣の遺伝子変異プロファイルと cfDNA の照合を行うことで、cfDNA が腫瘍由来であることを確認する。

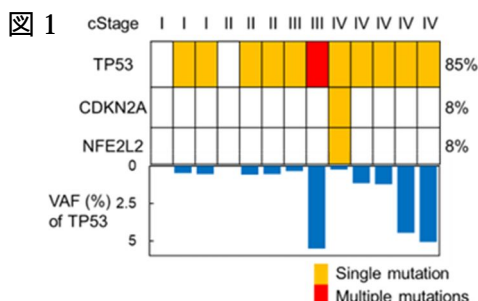
尿中 EV 中 miRNA は、株式会社 Craif が有する尿中 EV を捕捉する独自の手法を用いる。マイクロ流体デバイスにより試料内のエクソソームを99%以上の高収率で捕捉することができる本手法は、肺がん、肝がん、膀胱がん、前立腺がん、膵がん、大腸がん、脳腫瘍において既に、健常者と比較して患者特有の miRNA プロファイルが報告されている(Science Advances, 2017;3:e1701133)。本手法を用いて、食道癌に特徴的な miRNA 発現パターンを確立することを計画している。尿中 EV を収集可能なナノ流路チップを用いて EV を補足し、miRNA アレイをもちいて解析する。

血液凝固因子 Fibrinogen(FNG)については、申請者は既に NAC 奏効との関連、および予後との関連を報告しているほか、FNG が腫瘍原発巣の免疫抑制微小環境を反映することを捉えている。

Drug screening による NAC 抵抗性の克服と機序の解明

食道扁平上皮癌細胞株を用いて3剤併用化学療法(DCF療法)耐性株を樹立し、既存の1200薬剤の薬剤感受性試験を行うことで、DCF療法耐性株に致死的な効果を発揮する薬剤を選別する。続いて同定された薬剤使用後の、耐性株における経時的な遺伝子発現変化を、RNAシーケンスを用いて評価することで、耐性機序に関与する遺伝子を特定する。同遺伝子が、DCF耐性獲得に寄与するという仮説のもと、高発現株、発現抑制株を作成の上、同細胞株のDCF療法感受性評価により検証する。

4. 研究成果



自施設においてNAC後に手術を施行された食道癌患者を対象に ctDNA の検討を行った。結果として、図1に示す通り、TP53を中心に、食道扁平上皮癌原発巣高頻度に存在する変異が ctDNA として検出された。さらに、図2に示した通り、術後1-3ヵ月時点の ctDNA の有無が早期再発を鋭敏に反映することを示した。これらは、申請者らの独自手法によって評価された ctDNA の食道扁平上皮癌における腫瘍モニタリング手法として有用であることを示す結果と

図 2

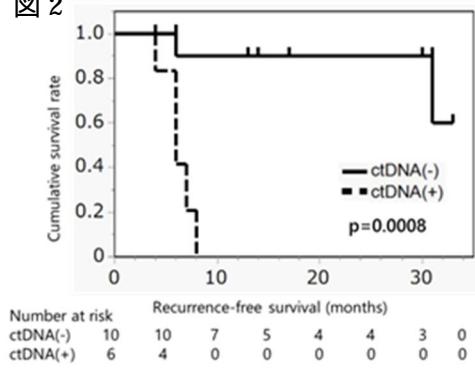
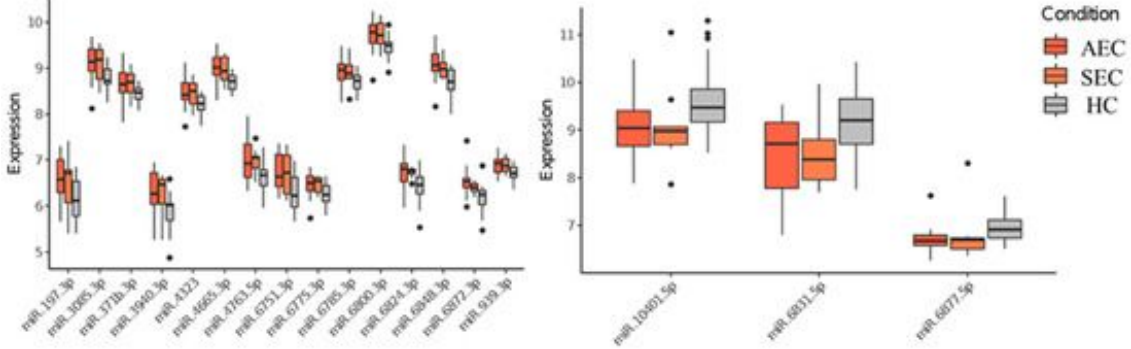


図 3



デルを構築した際の AUC 0.72 はであった。本検討より、尿中 miRNA プロファイルを用いて腫瘍の有無の判定が可能であることが示唆された。

目的 である、Drug repositioning を用いた食道癌薬剤耐性克服を目指した検討については、食道癌細胞株を用いて独自に樹立した DCF 療法耐性株を用いて、1200 薬剤のスクリーニングを終了した。そして、ある特定の循環器領域の薬剤が、DCF 耐性株に奏効することを見出した。現在、そのメカニズム解明を目指して検討を進めている。

なったと考えている。

尿中 EV 中 miRNA を用いた腫瘍モニタリングについては、Craif 社が開発したマイクロ流体デバイスを用いて、2020 年より尿の収集を開始し、健常者 20 例、進行/早期食道癌それぞれ 10 例の検体を用いたフェージビリティ検討のためのマイクロアレイ解析を終了した。その後、健常者、早期癌、進行癌患者の比較検討を行った結果、図 3 の通り、進行/早期/健常者という腫瘍量の勾配に沿って発現が増加する miRNA を 15 種類とらえた。これらを用いて健常者と食道癌を分類するロジスティック回帰モ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto Yosuke, Matsuda Satoru, Kawakubo Hirofumi, Nakamura Kohei, Kobayashi Ryota, Hisaoka Kazuhiko, Okui Jun, Takeuchi Masashi, Aimonu Eriko, Fukuda Kazumasa, Nakamura Rieko, Saya Hideyuki, Nishihara Hiroshi, Kitagawa Yuko	4. 巻 Published online
2. 論文標題 Tumor Burden Monitoring with Circulating Tumor DNA During Treatment in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	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/s10434-023-13194-z	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 Hisaoka Kazuhiko, Matsuda Satoru, Minoura Kodai, Yamaguchi Hiroki, Ichikawa Yuki, Mizunuma Mika, Kobayashi Ryota, Morimoto Yosuke, Takeuchi Masashi, Fukuda Kazumasa, Nakamura Rieko, Hori Shutaro, Yamazaki Taigi, Sambe Takehiko, Kawakubo Hirofumi, Kitagawa Yuko	4. 巻 16
2. 論文標題 Identifying the Trends of Urinary microRNAs within Extracellular Vesicles for Esophageal Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1698 ~ 1698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers16091698	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 Matsuda Satoru, Hoshino Shota, Goto Tadahiro, Kawakubo Hirofumi, Takeuchi Masashi, Kobayashi Ryota, Nakamura Kohei, Takeuchi Hiroya, Nishihara Hiroshi, Kitagawa Yuko	4. 巻 Published online
2. 論文標題 Identifying intense inflammatory subtype of esophageal squamous cell carcinoma using clustering approach	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-023-02006-6	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------