

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791416

研究課題名(和文)エクソソームを利用した抗癌剤感受性予測および新規核酸治療法の開発

研究課題名(英文) Impact of circulating microRNA on chemoresistance in patients with esophageal cancer

研究代表者

田中 晃司 (Tanaka, Koji)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70621019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：術前抗癌剤療法を受けた食道癌患者の奏功例・非奏功例5症例ずつの血清を用いたmicroRNA arrayを施行。microRNA arrayより、非奏功例の血清にて高発現を認めたmicroRNA(miR-X, miR-Y)に着目して、in vitroで抗癌剤耐性機序の検討を行った。In vitroにおける検討では、抗癌剤感受性におけるmiR-X, miR-Yの直接的影響は認められなかった。線維芽細胞との共培養実験により、miR-X, miR-Yは抗癌剤耐性に寄与することが判明した。食道癌細胞が分泌されるmiR-X, miR-Yは微小環境を調節することで抗癌剤耐性を獲得している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Serum expression of miRNAs selected by miRNA array was measured by quantitative RT-PCR in 68 patients with esophageal cancer who received cisplatin-based chemotherapy to examine the relationship between miRNA expression and response to chemotherapy. In vitro assays were conducted using esophageal cancer cells and normal fibroblasts (NOF) to investigate the mechanism of miRNA-induced chemoresistance. 18 miRNAs were different between responders and non-responders by miRNA array. Of these, high expression levels of miR-X correlated with poor response to chemotherapy. Although transfection of miR-X to cancer cells had no significant impact on chemosensitivity, esophageal cancer cells cultured in supernatant of miR-X-transfected NOF showed reduced chemosensitivity. miR-X-transfected NOF showed α -SMA expression. Our results indicated that miR-X is involved in resistance to chemotherapy in esophageal cancer, through transfection of NOF into cancer-associated fibroblasts.

研究分野：食道癌 外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌 microRNA 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器癌に対する治療において、しばしば抗癌剤耐性が問題となる。

進行食道癌に対して、手術成績の向上を目指してこれまで手術に加えて化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が模索されてきた。本邦では、近年施行された臨床試験 (JCOG9907) の結果により、切除可能食道癌に対しては、術前化学療法による生命予後の延長が示され、術前化学療法が標準治療となるに至った。しかし、化学療法を行ってもその約半数は化学療法に対して効果が認められず (抗癌剤耐性) 予後も不良である。

(2) これまで抗癌剤耐性に関わるメカニズムとして、ABC トランスポーター発現、増殖シグナルの異常、アポトーシス機構の障害、DNA 修復機構の亢進などの関連が報告されているが、未だ十分に解明されたとは言えず、治療成績向上へはいたっていない。

近年、遺伝子の発現制御において microRNA という分子が注目されている。microRNA はタンパクをコードしない 22 塩基前後の一本鎖 RNA で、不完全な相補性をもって標的 mRNA に結合し、主として転写後の翻訳を抑制し、個体の発生や発達、細胞の分化等、生体における機能制御の根幹に関わっている。また microRNA の発現異常はさまざまな癌種で報告されており、そのため、癌のバイオマーカーや治療標的としての有用性が期待されている。また、抗癌剤耐性についても microRNA の関与を示唆する報告がある。

(3) われわれはこれまでに、食道癌において抗癌剤耐性に関わる microRNA の研究を行ってきた。食道癌抗癌剤耐性株を樹立したのち、microRNA array を行い、抗癌剤耐性に関与する microRNA 候補を探索した。そして、食道癌化学療法後に遺残した癌細胞に miR-200c が高発現すること、また miR-200c の高発現は化学療法効果や患者予後と逆相関することを報告している (Hamano R, et al. Clin Cancer Res 2011)。

(4) 従来は RNase により、microRNA は血液中ではすぐに分解されると考えられていた。しかし、胎盤由来の microRNA が血清中に存在することが報告されて以後、microRNA は常温や凍結融解などでの環境下でも安定して存在することが報告された (Mitchell, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2008)。そのメカニズムとして、エクソソーム内に存在、Argonaute 2 タンパク (AGO2) との結合が考えられている (Arroyo JD, et al. Proc Natl

Acad Sci U S A. 2011)。

(5) AGO2 は microRNA と結合して RISC 複合体を形成し、この複合体が、AGO2 に結合した一本鎖 RNA と相補的な配列の mRNA の切断を触媒する働きがある。

(6) エクソソームとは、大きさ 50 ~ 100nm の膜結合小胞である。初期は、細胞質内のエンドソーム膜に出芽し膜小胞として形成される。この膜内小胞で満たされたエンドソームは Multivesicular body (MVB) と呼ばれている。MVB が細胞の形質膜と融合すると、膜内小胞は細胞外へエクソソームとして放出される。エクソソームには、mRNA、microRNA、タンパク質が取り込まれており、これらは血液中を循環し、生体内を移動する。また、エクソソームは recipient 細胞に取り込まれて機能し、細胞間の情報伝達機能を有する。実際、癌の増殖能などに関与することも報告されている (Kosaka, et al. J Biol Chem 2010)。また、エクソソームは host の細胞が有するタンパク質を表面に保持しており、癌細胞に特徴的な表面タンパク (EpCAM、CEA、HER1、HER2、CD 抗原など) を利用し、癌細胞由来エクソソームの抽出が可能である。

(7) これまでの抗癌剤感受性予測は、組織を採取することが必要であり、臓器からの検体採取の困難性、もしくは侵襲性の問題や、組織の不均一性の問題があり、臨床応用へは至っていない。今回は、血清サンプルから、RNA を抽出し、その中に存在する microRNA を解析するため、非常に簡便で、安定した結果がえられ、臨床応用が可能である。さらに、抗癌剤耐性もしくは感受性に関与する microRNA が同定できれば、該当する microRNA を抑制・導入することで、抗癌剤耐性克服を通じ、新規治療法につながる。実際、肝炎治療における miR-122 (Science, 2010) のように、microRNA を標的とした治療は臨床応用が始まっている。また、従来の分子標的治療は主に細胞表面の受容体に作用する治療法であったが、エクソソームは細胞質内に取り込まれ、直接 mRNA に作用するため、高い効果を発揮できる可能性がある。現時点では、microRNA の効率の良いドラッグデリバリーシステム (DDS) は構築されておらず、エクソソームによる DDS の可能性を模索することは意義があると考えられる。

2. 研究の目的

(1)臨床サンプルを用いた抗癌剤耐性・感受性に関する microRNA の同定
食道癌化学療法症例の血液サンプルを用いて、microRNA array を行い、奏功例、非奏功例を比較検討することで抗癌剤感受性に関する microRNA を同定する。

(2)血液サンプルによる抗癌剤感受性予測
microRNA array の結果より同定された microRNA を、食道癌患者の血液サンプル中で、各分画(全血清、エクソソーム分画、AGO2分画)ごとに定量し、抗癌剤の治療効果との相関を検討し、最も抗癌剤感受性を反映する分画を選定する。

(3)エクソソームによる microRNA 治療 (DDS の開発)
microRNA のエクソソーム封入 (electroporation や細胞への transfection) し、最適な人工的エクソソーム作成法を確立する。さらに、エクソソームを利用した microRNA 投与の体内動態と治療効果を、投与方法別(経口投与、皮下注、静注、局所投与)に検討し、エクソソームによる microRNA の DDS 開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体(血液サンプル、切除標本)を用いて、抗癌剤耐性の制御に関する miRNA および遺伝子を網羅的に解析する。

(2) 選定した miRNA に関して、細胞株、実験動物を用いた導入/抑制実験を行い、標的解析を行うとともに、miRNA による抗癌剤耐性の制御が得られるかを検証する。

(3) 選定された microRNA による抗癌剤感受性予測法を臨床検体において確立する。

(4) エクソソームを用いた microRNA 治療の開発 (DDS の開発)

4. 研究成果

(1) 同定した microRNA の in vitro での解析・候補 microRNA による抗癌剤耐性能の確認

microRNA array より選出された抗癌剤感受性と相関する 3 種の microRNA のうち、非奏功例の血清にて高発現を認めた microRNA (miR-X, miR-Y) に着目して、in vitro で抗癌剤耐性との関係性を検討した。食道癌細胞株 TE10 を用い、anti-miR-X, anti-miR-Y を導入し、TE10 の増殖能と抗癌剤感受性を、proliferation assay, WST assay, apoptosis assay を用いて行った。control miR 導入細胞と、anti-miR 導入細胞は、増殖能、抗癌剤感受性、アポトーシスにおいて差は認めなかった。次に、食道癌切除検体の正常食道部より採取した正常線維芽細胞 (NOF) と、癌部より採取した CAF (癌関連線維芽細胞) を培養し、pre-miR-X, pre-miR-Y, control miR を導入した培養上清を TE10 に移植し、抗癌剤感受性を検討した。WST assay では、pre-miR-X, pre-miR-Y 導入 NOF の培養上清は、control miR 導入 NOF に比べ、シスプラチン (CDDP) に対する感受性が低下し、CAF の上清で培養した TE10 と同程度の CDDP 抵抗性を示した。Apoptosis assay でも同様に、CAF、pre-miR-X・pre-miR-Y 導入 NOF は control miR 導入 NOF に比べアポトーシスが抑制されていた。さらにそれぞれの培養上清中の TGF- β , IL-6, PDGF, HGF の濃度を ELISA にて測定したところ、miR-X/Y を transfection した NOF の培養上清と CAF の培養上清中の TGF- β 濃度が有意に高値を示していることが判明した。つぎに、TGF- β が抗癌剤感受性に影響する因子かを検討するために、TGF- β の中和抗体を添加する群と非添加群に分け、miR-X/Y を NOF に transfection した培養上清にて CDDP に対する TE10 の感受性を検討すると、TGF- β の中和抗体を添加した群では、抗癌剤感受性が改善した。以上の結果より、癌細胞から分泌された miR-X/Y が NOF に作用し、TGF- β の分泌量が増加し、食道癌細胞における CDDP に対する耐性が增強している可能性が示唆された。

(2) 血中エクソソーム分画における miRNA 発現確認
超遠心、Exoquick® (エクソソーム抽出試薬) を用いて、血清よりエクソソームを抽出した。Western blotting、電子顕微鏡により、上記両方法によりエクソソームが抽出できていることを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

研究者番号:

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中晃司 (Tanaka Koji)
大阪大学医学部附属病院・医員
研究者番号: 70621019

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()