

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

頭頸部癌に対するマイクロ RNA 解析に関する研究

担当責任者 田原 栄俊
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 細胞分子生物学研究室 教授

研究要旨

頭頸部がんの早期発見および治療効果を高精度に評価する体液を用いたバイオマーカー開発を目的として、頭頸部がんの術前術後における血清中のマイクロ RNA の解析を次世代シーケンサを用いて解析を行う。

頭頸部がんの予後マーカーの開発を目的とする。原発巣の腫瘍組織検体のマイクロ RNA 解析、同日患者における術前血清、術後血清を用いたマイクロ RNA 解析を行う。

既知のマイクロ RNA に関しては、腫瘍のステージ依存性などを検証する。これらの中から頭頸部がんにおいてバイオマーカーとなり得る候補マイクロ RNA に関して、qRT-PCR で発現解析を行う。

これらの結果を総合して、頭頸部がんを早期発見できる有用なバイオマーカーの同定をめざす。

A．研究目的

「がん対策推進基本計画」では、がんによる死亡率の減少、全てのがん患者とその家族の苦痛の軽減と療養生活の質の維持向上、がんになっても安心して暮らせる社会の構築が全体目標として掲げられている。本研究では、それを達成するために頭頸部がんに関心を当て、頭頸部がんの早期発見および頭頸部がんの治療効果を高精度に評価する体液を用いたバイオマーカー開発をめざす。具体的には、頭頸部がんの術前術後における血清を比較して、頭頸部がんの予後マーカーの開発を目的とする。

B．研究方法

後再発 High-Risk 因子（顕微鏡的断端陽性、節外浸潤、多発頸部リンパ節転移）を有する局所進行頭頸部扁平上皮癌患者について、以下の試験デザイン

において、バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の同定のための解析を実施する。

試験デザイン：適格患者に A 群、B 群いずれかの治療をランダム割付けし、第 II 相部分では両群の治療の安全性を確認し、第 III 相部分にて全生存期間を Primary endpoint として weekly CDDP+RT の、標準治療である 3-weekly CDDP+RT に対する非劣性を検証する。

A 群：CDDP 100mg/m², day 1, 22, 43, RT 一日 1 回、週 5 回分割法、Total 66Gy（術後 RT 標準用量）

B 群：CDDP 40mg/m², day 1, 8, 15, 22, 29, 36, RT 一日 1 回、週 5 回分割法、Total 66Gy

Primary endpoint：第 III 相部分：全生存期間、第 II 相部分：治療完遂割合
Secondary endpoints：第 III 相部分：

無再発生存期間、局所無再発生存期間、有害事象 第 II 相部分：有害事象

この試験デザインにおいて、手術時の腫瘍組織検体のマイクロ RNA 解析さらに、術前、術後及び再発時の血液中のマイクロ RNA の発現変化の解析を以下の手順で実施する。

(1)次世代シーケンサー Ion PGM を用いて、エクソソームから調製したマイクロ RNA の種類を同定し、それらの発現量および遺伝子配列を調べる。同年令の健常者のエクソソームに含まれるマイクロ RNA の種類・発現量および遺伝子配列と比較する。

(2)それぞれの解析の比較から、以下のマイクロ RNA を同定する。

(3)患者サンプルにのみ優位に共通して検出される（発現増加マイクロ RNA の同定）

(4)多くの患者サンプルにのみ優位に共通して減少する（発現減少マイクロ RNA の同定）

1)腫瘍のステージ依存的に増加あるいは減少するマイクロ RNA の同定

2)同定されたマイクロ RNA・mRNA について、術前、術後、再発時のサンプルを用いて比較し、頭頸部癌特異的なマーカーとなりうるかどうかを調べる。

本年度は、まず 25 名について次世代シーケンズによる解析を実施し、原発腫瘍、術前・術後の体液中のエクソソーム中のマイクロ RNA 発現解析を実施する。対象となる健常人についても患者同一年齢の健常人 25 名についてシ

ークエンズ解析を実施する。また、ここから得られるシーケンズデータから、MiRBase(<http://www.mirbase.org>)に登録されているマイクロ RNA のシーケンズとの相同性を解析し、そのリード数から術前および術後で変化するマイクロ RNA の同定を試みる。マイクロ RNA 候補について、附随研究の同意を得られた患者について qRT-PCR を実施し、高精度な頭頸部がんバイオマーカーを創出する。

（倫理面への配慮）

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化される。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則を遵守する。

なお、現在改訂中の「臨床研究に関する倫理指針」に採用される見込みの Emanuel らの研究倫理 7 要件への対応は以下のとおり。

(1)Social/Scientific Value：医療の進歩に貢献し得る研究課題のみを採択し実施する。

(2)Scientific Validity：広く正しいと認められた科学的原則に基づいて研究を実施する。すなわち適切な研究デザイン・データマネジメント・統計解析を行うことにより正しい結論を導く。施設からの提出データの正確性は施設訪問監査で確認される。また、収集された症例報告用紙、解析に用いたデータセットおよび解析プログラムは半永久的に JCOG データセンターに保管される。これらにより研究の質及び透明性

を確保する。

(3) Fair Subject Selection : 被験者選択は公正に行う。適切な患者選択規準を設け、登録時および登録後に適格性の確認を行い不適格例の登録の最小化を図る。適格性は中央モニタリングで検討される。

(4) Favorable Risk-Benefit Ratio : 被験者のリスクを最小化し、被験者や社会のベネフィットを最大化し、リスクとベネフィットのバランスを適正に保つよう研究を計画し、中央モニタリングにより継続的に適正化を図る。

(5) Independent Review : 研究実施計画書の IRB 承認が得られた施設のみから患者登録を行う。

(6) Informed Consent : 被験者に、十分な情報を提示し、適切な理解に基づいて、自発的同意を得る。同意のプロセスの適正性は施設訪問監査で確認される。

(7) Respect for Potential and Enrolled Subjects : 被験者スクリーニングの段階から被験者候補に対して、および登録患者に対して、人権およびプライバシーの保護に最大限努める。

検体のマイクロRNA解析は、腫瘍組織を用いた体細胞変異の検索であることから「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とはならないが、個人情報保護の観点から、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠した JCOG の「非ゲノム解析研究」ポリシーに従って適切に連結可能匿名化もしくは連結不可能匿名化を行った上で実施する。

E . 結論

次世代シーケンサー Ion PGM を用いて、術前および術後での血清中のマイクロRNAの配列を網羅的にシーケンス解析し、それらの情報を頭頸部がんの治療評価のためのデータベース化した。これらには、miRBase に収録された既知の miRNA と既知の miRNA にアノテートされない未知の小分子 RNA を検出することができ、その割合は約 50% であった。miRBase に登録されている既知のマイクロRNA に関しては、179 種類について検討したところ、頭頸部がんのバイオマーカーとなりうる候補マイクロRNA を 31 種類同定することができた。

F . 健康危険情報

なし

(総括研究報告書にまとめて記入)

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, Tahara H, et al. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-beta peptide. FEBS letters 589, 84-88 (2015).
- 2) Shimamoto A, Yokote K, & Tahara H. Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming. Frontiers in genetics 6, 10 (2015).
- 3) Yuyama K, Sun H, Sakai S, Mitsutake S, Okada M, Tahara H, et al. Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading

- of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* 289, 24488-24498 (2014).
- 4) Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, Tahara H, & Okamoto T. Generation of human induced pluripotent stem (Ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF-Beta1 regulation of pluripotency. *PLoS One* 9, e87151 (2014).
 - 5) Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, & Tahara H. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS One* 9, e112900 (2014).
 - 6) Miyagi T, Shiotani B, Miyoshi R, Yamamoto T, Oka T, Umezawa K, Ochiya T, Takano M. & Tahara H. DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins. *Cancer Sci* 105, 870-874 (2014).
 - 7) Lotvall J, Hill A.F, Hochberg F, Buzas E.I, Di Vizio D, Gardiner, C, Gho Y.S, Kurochkin I.V, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 3, 26913 (2014).
 - 8) Kim D.K., Lee J, Kim S.R, Choi D.S, Yoon Y.J, Kim J.H, Go G, Nhung D, Hong K, Jang S.C, Kim S.H, Park K.S, Kim O.Y, Park H.T, Seo J.H, Aikawa E, Baj-Krzyworzeka, M, van Balkom B.W, Belting M, Blanc L, Bond V, Bongiovanni A, Borrás F.E, Buee L, Buzas E.I, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz C.S, Desiderio D.M, Di Vizio D, Ekstrom K, Falcon-Perez J.M, Gardiner C, Giebel B, Greening D.W, Gross J.C, Gupta D, Hendrix A, Hill A.F, Hill M.M, Nolte't Hoen E, Hwang D.W, Inal J, Jagannadham M.V, Jayachandran M, Jee Y.K, Jorgensen M, Kim K.P, Kim Y.K, Kislinger T, Lasser C, Lee D.S, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu M.L, Lotvall J, Marcilla A, Mathivanan S, Moller A, Morhayim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes D.N, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez M.I, Rodrigues M.L, Roh T.Y, Royo F, Sahoo S, Schiffelers R, Sharma S, Siljander P, Simpson R.J, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stepien E, Tahara H, et al: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* (2014).

- 9) Hosoi T, Inoue Y, Nakatsu K, Matsushima N, Kiyose N, Shimamoto A, Tahara H & Ozawa K. TERT attenuated ER stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 378-382 (2014).
 - 10) Hirokawa T, Shiotani B, Shimada M, Murata K, Johmura Y, Haruta M, Tahara H, et al. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint. *Cancer Res* 74, 3880-3889 (2014).
 - 11) Hirashio S, Nakashima A, Doi S, Anno K, Aoki E, Shimamoto A, Yorioka N, Kohno N, Masaki T. & Tahara H. Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9, 2117-2122 (2014).
 - 12) Ao M, Miyauchi M, Inubushi T, Kitagawa M, Furusho H, Ando T, Ayuningtyas N.F, Nagasaki A, Ishihara K, Tahara H, et al. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. *PLoS One* 9, e110519 (2014).
2. 学会発表
- 1) Tahara H. Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function, Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function, International Symposium on Extracellular Vesicles for Biomedical Applications, Seoul, Korea, 2014年5月29日, Clinical Lecture Hall 2, Seoul National Children's Hospital
 - 2) Tahara H. Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function, Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function, KSEV2014 (Korean Society for Extracellular Vesicles), Seoul, Korea, 2014年5月30日, Ewha Campus Complex, Ewha Womans University, Seoul
 - 3) 田原栄俊, Liquid Biopsy による疾患の診断と核酸医薬の開発の現状, (PMDA 職員研修会), 東京都, 2014年6月17日, 独立行政法人医薬品医療機器総合機構
 - 4) 田原栄俊, 小さな巨人「マイクロRNA」によるがん診断およびがん治療戦略, NPO 法人国際医科学研究会 第8回フォーラム, 東京都, 2014年6月29日, フクラシア東京ステーション
 - 5) 田原栄俊, 老化誘導型核酸医薬の開発に向けて, 「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム, 東京都, 2014年8月21日, 学術総合センター
 - 6) 田原栄俊, Direct detection of extracellular vesicles and exRNA, Direct detection of extracellular vesicles and exRNA, 第1回日本細胞

外小胞学会,広島市,2014年8月28日,グランドプリンスホテル広島

- 7) 田原栄俊,テロメア検査、マイクロRNA 検査を用いた健康管理への活用,第24回日本医療薬学会年会シンポジウム,名古屋市,2014年9月28日,名古屋国際会議場
- 8) 田原栄俊,老化誘導型核酸医薬の開発,新適塾「未来創薬への誘い」第28回会合,大阪府,2014年10月6日,千里ライフサイエンスセンター

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし