

平成30年6月14日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10104

研究課題名(和文)食道癌におけるプロモーター領域のメチル化とmicroRNA発現の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the relationship between DNA methylation and miRNA expression in esophageal carcinoma

研究代表者

齋藤 誠哉 (SAITOU, Seiya)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00594475

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)：miRNAのプロモーターが癌細胞で高メチル化されることで癌の発育を抑制するmiRNAが抑制される。miRNAのarray解析を行い、食道扁平上皮癌においてメチル化により発現が変化するmiRNAの同定を行った。Arrayにより差を認めたmiR-146a、miR-142、miR-155の発現レベルを測定した。これらの発現レベルは臨床病理学的因子、疫学的因子、抗癌剤の使用有無、奏効率、予後と有意な関係性を認めなかった。以上より、食道癌においてDNAのメチル化の変化はmiRNAの発現レベルに影響を与えるが、癌の悪性度に寄与するmiRNAの同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation change is common epigenetic change in cancer. The promoter CpG island hypermethylation is one of the most common mechanisms by which tumor suppressor miRNAs are inactivated during tumorigenesis. However, microRNA (miRNA) regulations by epigenetic alteration, especially CpG island hypermethylation, have been not yet substantially understood in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Therefore, we performed the screening of miRNAs which should be up-regulated by DNA methylation in ESCC cell lines, then from up-regulated miRNAs, we focused on several miRs. Since miRNA-145-5p attracts an increasing attention as a tumor suppressor miRNA in ESCC, we evaluated miRNA-145 promoter methylation level and miRNA-145-5p expression level in ESCC. We evaluated expression level of miR-146a, miR-142, miR-155. However, these expression levels were not associated with clinical feature, including prognosis. Therefore, we could not identify miRNA which regulate malignant behavior of ESCC.

研究分野：消化器癌研究

キーワード：エピジェネティクス miRNA(キーワード3) メチル化 食道扁平上皮癌

### 1. 研究開始当初の背景

癌における DNA メチル化異常の特徴としてはゲノム全体の低メチル化 (global DNA hypomethylation) と CpG island における部分的な高メチル化 (CpG island methylation phenotype) がある (図 1)。前者は染色体不安定性を引き起こすと考えられ (Science 2003)、後者は高メチル化した遺伝子の mRNA への転写を抑制することにより遺伝子の不活化を引き起こすとされる (Nature Rev Genet 2002)。

18 ~ 25 ヌクレオチドの小さな RNA 配列である microRNA は、主に翻訳阻害と mRNA の切断、分解という 2 つのプロセスで複数の標的遺伝子の発現を調節しており、発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっている (Oncogene 2008)。癌細胞では microRNA 発現の発現異常 (発現低下および上昇) がしばしば見られ、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子を制御している microRNA が多数あると考えられている (Nat Rev Genet 2009)。

最近では microRNA の発現がエピジェネティックに制御されていることが報告されている (Cancer Res 2013)。癌遺伝子の発現を制御している microRNA は正常部と比較して癌部ではプロモーター領域が高メチル化であり、その発現が制御されている (Cancer Res. 2011)。高メチル化による microRNA の抑制は、癌遺伝子の発現を上昇させ、癌化や癌細胞の悪性度と深く関わっている (図 2)。

胃癌、肝臓癌、大腸癌等の消化器癌において、プロモーター領域の高メチル化と microRNA の発現の関係は徐々に明らかになりつつある (Biochem Biophys Res Commun. 2012、Epigenetics. 2012、Cancer Res. 2011)。しかしながら、食道扁平上皮癌においては DNA メチル化と microRNA 制御の関係はまだ不明瞭なところが多い。

### 2. 研究の目的

今回我々は、食道扁平上皮癌における DNA メチル化酵素阻害剤による microRNA 発現の変化を解析し、エピジェネティックに制御された miRNA 遺伝子を網羅的に解析することで、新規癌関連 microRNA の同定を試みる。

### 3. 研究の方法

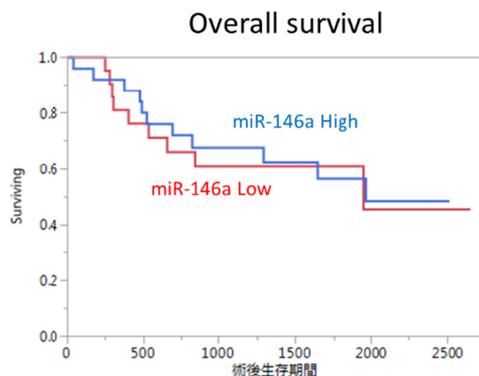
当科にて所有している食道癌細胞株 10 例を使用し、5 AZA 処理による脱メチル化で発現が変化する microRNA を Microarray を用いて網羅的に同定する。次に食道扁平上皮癌 200 例以上の多数の臨床検体を用いて、定量的 real-time PCR による候補 microRNA の発現量の測定、Bisulfite-Pyrosequencing 法による DNA メチル化の定量的測定を行う。その結果を SAS program (SAS Institute, Cary, NC) を用いて候補 microRNA とそのプロモーター領域のメチル化レベルとの相関を解析する。

更に、予後、臨床病理学的因子、疫学的因子との関係を網羅的に解析する。食道癌細胞株を用いた in vitro assay では候補 microRNA の強制発現系、抑制系を用いて、細胞浸潤能 (invasion assay)、増殖能 (proliferation assay)、抗アポトーシス作用 (flow cytometry)、抗癌剤感受性を解析する。更に、microRNA のターゲット遺伝子を同定し、作用機序を解明する。

### 4. 研究成果

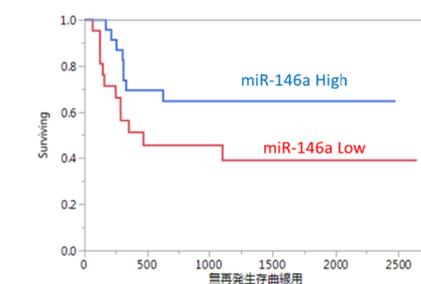
食道扁平上皮癌の細胞株である TE-1 と KYSE30 に 5AZA 処理することで DNA のメチル化レベルが低下し、miR-145 の発現レベルがそのプロモーター領域により発現が制御されていることを報告した。食道扁平上皮癌の診断で根治的手術が施行された 88 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織からマクロダイセクション法により癌組織を採取し、miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN) を用いて miRNA を含む Total RNA を抽出し、miRNA の発現レベルは qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction) 法を用いて測定した。Mir-145 以外にも 5AZA 処理により発現が変化する miR-146a の発現レベルを臨床検体 88 例で測定した。しかしながら、miR-146a の発現レベルは臨床病理学的因子とまったく関係を認めなかった。全生存期間に差を認めなかった (図 1)。

図 1: miR-146a の発現レベルと全生存率



無再発生存期間 (図 2) に関しては艇発現症例が有意さは無いものの予後不良の傾向にあったが、仮説とは反対の結果であった。

図 2: miR-146a の発現レベルと無再発生存期間



Array にて発現に差があった miR-142 と miR-155-5p の発現レベルも測定したが、これ

らの発現レベルも臨床病理学的因子（TNM stage、静脈浸潤、リンパ管浸潤、家族歴、腫瘍部位など）、疫学的因子（喫煙歴、飲酒歴、BMI index など）、抗癌剤の使用有無、奏効率、と有意な関係性を認めなかった。また、全生存期間（図3）、無再発生存期間（図4）に差を認めなかった。

図3: miR-142の発現レベルと全生存率

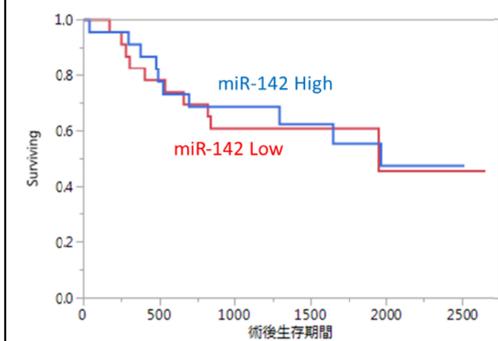
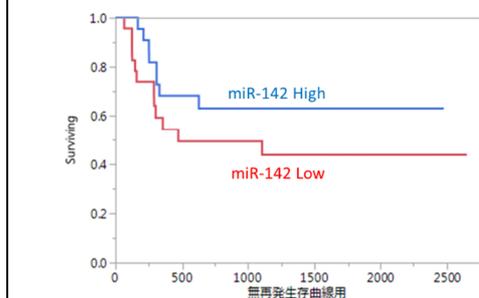


図4: miR-142の発現レベルと無再発生存期間



更に、miR-155-5p の発現レベルも測定したが、これらの発現レベルも臨床病理学的因子（TNM stage、静脈浸潤、リンパ管浸潤、家族歴、腫瘍部位など）、疫学的因子（喫煙歴、飲酒歴、BMI index など）、抗癌剤の使用有無、奏効率と有意な関係性を認めなかった。また、全生存期間（図5）、無再発生存期間（図6）に差を認めなかった。

図5: miR-155の発現レベルと全生存率

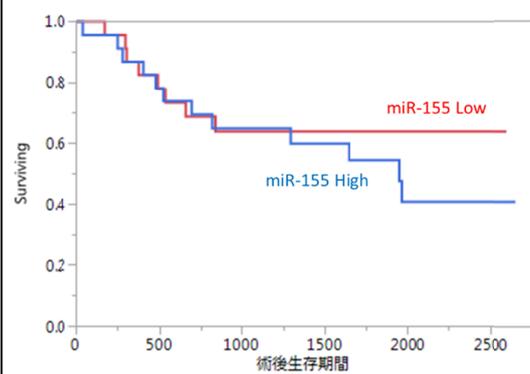
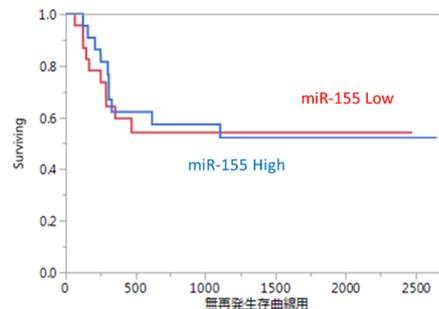


図6: miR-155の発現レベルと無再発生存期間



更に、DNA のメチル化と関係する UHRF-1 の発現レベルと miRNA の発現レベルにも関係性を認めなかった。以上より、食道癌において DNA のメチル化の変化は miRNA の発現レベルに影響を与えるが、癌の悪性度に寄与する miRNA の同定には至らなかった。

#### 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）

〔雑誌論文〕(計1件)

Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Kosumi K, Tokunaga R, Izumi D, Ohuchi M, Nakamura K, Kiyozumi Y, Kurashige J, Iwagami S, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Baba H. Suppressor microRNA-145 Is Epigenetically Regulated by Promoter Hypermethylation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2015;35(9):4617-24. 査読有

DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-3132

〔学会発表〕(計1件)

Suppressor microRNA-145 is epigenetically regulated by promoter hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma; Kazuto Harada, Yoshifumi Baba, Keisuke Kosumi, Ryuma Tokunaga, Daisuke Izumi, Mayuko Ouchi, Kennichi Nakamura, Yuki Kiyozumi, Junji Kurashige, Yukiharu Hiyoshi, Shiro Iwagami, Yuji Miyamoto, Yasuo Sakamoto, Naoya Yoshida, Masayuki Watanabe, Hideo Baba. AACR2015 2015.4.21 Pennsylvania

ConventionCenter(Philadelphia,Pennsylvania)

(4)研究協力者  
( )

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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

齋藤 誠哉 (SAITO, Seiya)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療  
医師  
研究者番号：00594475

### (2)研究分担者

坂本 快郎 (SAKAMOTO, Yasuo)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療  
医師  
研究者番号：00452897

宮本 裕士 (MIYAMOTO, Yuji)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80551259

林 洋光 (HAYASHI, Hiromitsu)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療  
医師  
研究者番号：80625773

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：