

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10118

研究課題名(和文) MMP-9の発現に関わるmiRNAに着目した食道癌 新規診断・治療法の検討

研究課題名(英文) Development of novel diagnostic methods and therapies based on microRNAs regulating MMP9 expression in esophageal cancer.

研究代表者

宮下 正夫 (Miyashita, Masao)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道癌患者の食道癌細胞におけるMMP-9の発現に着目した。食道癌食道扁平上皮癌におけるMMP-9,CD147,MCT-1と臨床病理学因子との関連性を調べた。その結果、MMP-9,CD147,MCT-1の発現は、癌の浸潤、リンパ節転移及び病期、生存率に関わり、特に共発現は予後低下を示すものと考えられた。また、ヒト食道扁平上皮癌由来細胞株を用いて細胞増殖能の検討、MMP-9の発現量をELISAで計測した。その結果、ヒト食道扁平上皮癌由来細胞株の中で細胞浸潤と細胞増殖の能力、MMP-9の発現量が最も高いのはTE-1であることが明らかになり、TE-1細胞のmiRNA 網羅解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on the MMP-9 expression in esophageal cancer cells. First, we observed increased expression of MMP-9,CD147,MCT-1 in esophageal cancer cells of the patients, which was correlated not only with malignant phenotypes of the cancer such as cancer invasion and lymph node metastasis but also the survival of the patients. Next we performed cell proliferation assays and scratch tests and also measured miRNA expression in several cell lines. The TE-1 cell line showed the highest expression levels of MMP-9 and the highest mobility in the scratch tests. Accordingly, we analyzed miRNA expression profiles of the TE-1 cell line by the miRNA array. We showed enhance miRNA expression.

研究分野：がん

キーワード：miRNA 食道癌

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は、世界的に 8 番目に頻度の高い癌であり、特に男性では、肺、肝臓、胃、大腸、乳癌に次いで 6 番目の頻度である (World Cancer Report 2014)。日本では毎年人口 10 万人当たり 10 人程度発症する消化器癌の一つで、すい臓がんに並んで予後が悪い。平均年齢は 65 歳前後で、男女比は約 5~7:1 と男性に多い (独立行政法人国立がんセンター がん対策情報センター)。食道は他の消化管と異なり、漿膜を有しておらず、周囲に気管、気管支、肺、胸部大動脈、心臓など重要な臓器が隣接する。進行が早いことから、発見された時には既に周囲に浸潤していることが多い。また、手術後に発症する重大な合併症の頻度が多く、手術関連死亡率は全国平均で 3% と高く、全体として食道癌の各病期 (ステージ) の予後は、他の癌種と比べて不良である。しかしながら、食道癌は、手術に抗癌剤、放射線療法を組み合わせた集学的治療への感受性が他癌と比べて高いという生物学的特徴を持っている。そのような背景から、食道癌の治療方針の選択に活用出来る新たなバイオマーカーの開発が急務とされている。

## 2. 研究の目的

食道癌の治療は年々進歩を遂げているが、未だ根治は難しく、予後不良となることが極めて多い。食道扁平上皮癌において、癌の浸潤、転移過程での MMPs (Matrix metalloproteinase) の発現が報告されており、それら MMPs の inducer である CD147 と MCT-1 (Monocarboxylate transporter 1) との共存が、胃癌の予後因子となりうる可能性が報告されているが、食道扁平上皮癌での詳細は明らかでない。MMP-9, CD147, MCT-1 の関連を図 1 で示す (図 1)。本研究では、食道扁平上皮癌における MMP-9, CD147, MCT-1 の発現

と予後との関係を検討すること。また、MMP-9 に着目し、これらの遺伝子の発現調節に関わる microRNA に着目し、食道癌の新たなバイオマーカーを探索、早期診断および治療薬開発を試みることを目的としている。

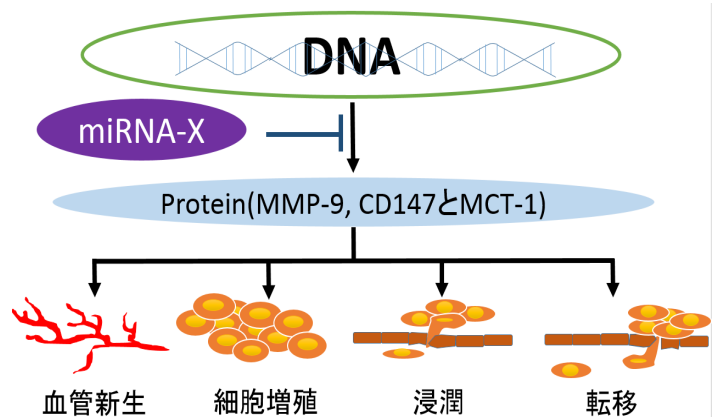


図 1. 本研究のコンセプト

## 3. 研究の方法

### 食道癌患者組織における MMP-9, CD147 と MCT-1 の発現レベルの確認

患者の同意を得て食道サンプルを採取する。サンプル収集後、パラフィン切片を作成する。作成した切片の免疫染色を行い、食道癌患者組織における MMP-9, CD147, MCT-1 の発現レベルを確認する為に、それぞれの症例に対し、癌部 3 切片、正常粘膜部 3 切片に対し MMP-9, CD147, MCT-1 に対する抗体を用い免疫染色を施行し、陽性細胞数及び染色強度に対し半定量的にスコア化し判定した。

### 食道癌扁平上皮培養細胞の細胞株の選択検討

理化学研究所から購入した培養細胞 TE-1, TE-4, TE-5, TE-6, TE-8, TE-9, TE-10 を凍結から起こし、stock を作成。TE 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS) を加えた RPMI 1640 (Gibco) にて 37 5%

CO2, 4~5日間隔で継代培養したものを使用した。それぞれの細胞株の増殖能を MTT [3-(4,5-Dimethylthial-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] 処理によって生成されるホルマザンの量を計測することで検討した。MMP-9の発現量は MMP-9 ELISA kit (invitrogen, cat# KHC3061)を用いて測定した。

### 食道癌扁平上皮培養細胞(TE-1 細胞) における細胞遊走能と miRNA の発現

細胞増殖実験では、TE-1 細胞を 6 well plate に播種し、24 時間培養後にスクレイピングし、PBS で洗浄し剥離した細胞を除去した。その後 1、2、3 日間経過時の wound closure の状態を位相差顕微鏡で観察し、写真を撮影した。miRNA は、RNA Mini Kit (QIAGEN, cat# 217004) で精成、分光光度計と Agilent2100 Bioanalyzer で Total RNA の品質の解析を行った。その後、GeneChip miRNA 4.0 Array で miRNA の網羅解析を行った。

#### 4. 研究成果

### 食道癌患者組織における MMP-9, CD147, MCT-1 の発現レベルの確認

CD147, MCT-1 は癌細胞の細胞膜、MMP-9 は癌細胞及び周囲間質細胞の細胞質に局在を認めた。CD147 は、43 例中 29 例 (67.4 %)、MCT-1 は 30 例 (69.7 %)、MMP-9 は 26 例 (60.5 %) に発現を認め、CD147 陽性の 29 例中、MCT-1 陽性は 25 例 (86.2 %)、MMP-9 陽性は 23 例 (79.3 %) であった。

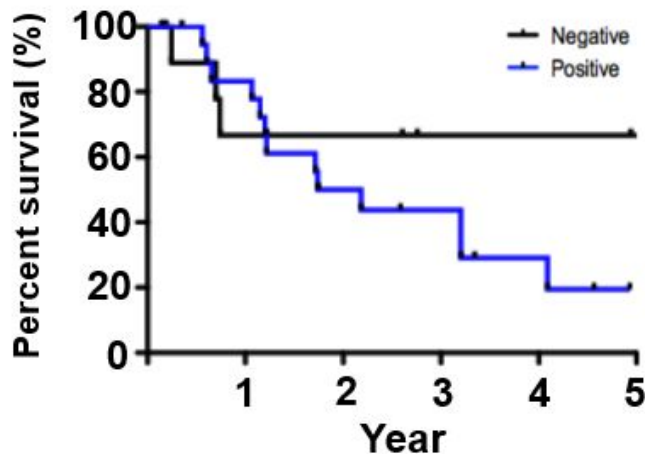


図 2. MMP-9 の発現量と予後

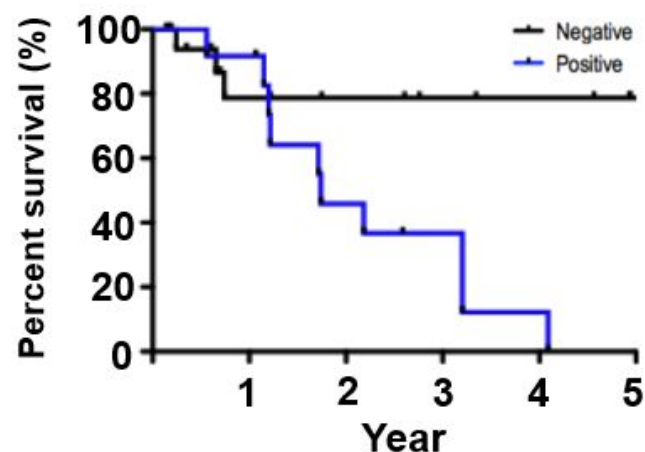


図 3. MMP-9, CD147, MCT-1 の発現量と予後

CD147, MCT-1 共存発現と臨床病理学的因子との関連では、深達度 (T1 33.0 %、T2 60.0 %、T3 以深 71.4 %)、リンパ節転移 (N0 46.1%、N1 以上 66.3 %) 及びステージ (I 37.5 %、II 41.6 %、III 以上 73.7 %) に関連性が認められたが、組織型による発現の差は認めなかった。5 年生存率は、MMP-9 の発現で低下する傾向が観察された。また、MMP-9, CD147, MCT-1 の共存発現ではさらに顕著な生存率の低下が見られた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) (図 2, 3)。

### 食道癌扁平上皮培養細胞の細胞株の選抜検討

理化学研究所から購入した培養細胞 TE-1,

TE-4, TE-5, TE-6, TE-8, TE-9, TE-10を凍結から起こし、stock を作成。TE 細胞、それぞれの細胞株の増殖能を MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]処理によって生成されるホルマザンの量を計測することで検討した。TE 細胞を96 well plate に播種。その後1、2、3日間経過時の増殖能を MTT 10 ul/well 加えて Plate reader で測定した(図4)。MMP-9の発現量を MMP-9 ELISA を用いて測定した結果は図5のとおりであった。

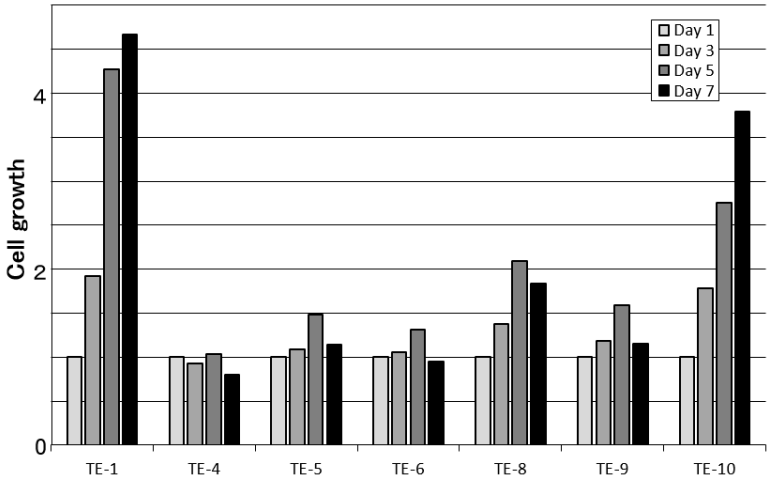


図 4. TE 細胞と Growth Assay

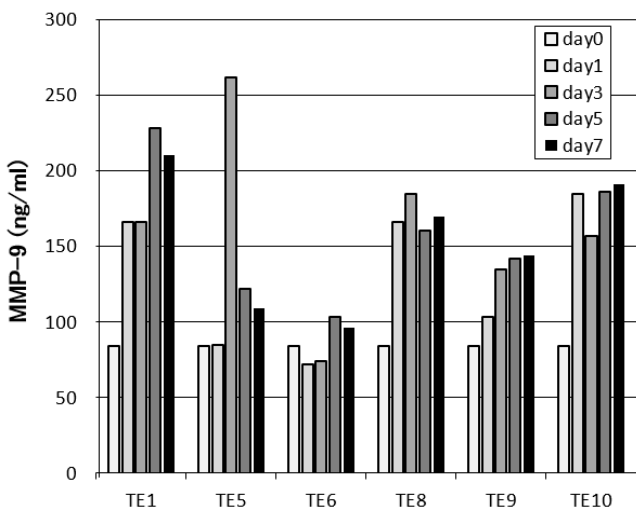


図 5. TE 細胞と MMP-9 発現量

各種細胞株で増殖能力と MMP-9の発現量を測定した結果から、TE-1細胞が本試験の

検討に適することが解った。

**食道癌扁平上皮培養細胞(TE-1 細胞) における細胞遊走能と miRNA の発現**

TE-1 細胞に対する MMP-9 処理の有無による細胞遊走能の差を創傷治癒アッセイで確認した。その結果、Control 群と比べて MMP-9 の処理群では、細胞が遊走する能力が高くなっていることが明らかになった(図 6)。

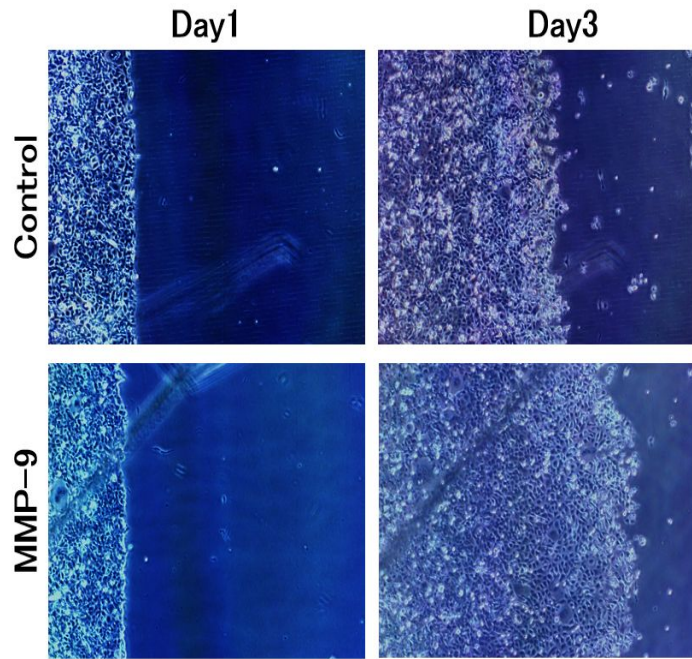


図 6 .MMP-9 と細胞遊走能

次に GeneChip miRNA 4.0 Array を用いて TE-1 細胞における miRNA の網羅解 Labeling kit を用いて、Biotin-labeled sample を作製した後、GeneChip Hybridization oven 645 を用いてインキュベート、GeneChip Fluidics station 450 を用いて洗浄を行った後、GeneChip Scanner 3000 7G を用いてアレイ結果はス



Id	Expression	Transcript ID Array Design	Sequence T	Species	Scientific Name	Alignment	Sequence L	Sequence	Prob
110	1052111	hca-miR-7a-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:12201	22	UUGGAGGAGG	0.9999
110	1049231	hca-miR-7b-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr22:49529	22	UUGGAGGAGG	0.9999
110	1052120	hca-miR-7c-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr21:12912	22	UUGGAGGAGG	0.9999
110	1052120	hca-miR-7d-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr9:92941	22	UUGGAGGAGG	0.9999
110	1052121	hca-miR-7e-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:52126	22	UUGGAGGAGG	0.9999
110	1052122	hca-miR-15-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:50522	22	UUGGAGGAGG	0.9999
120	1478220	hca-miR-17-5p	GAAGAAGGAG	homo	Homo sapiens	chr12:22002	22	GAAGAAGGAG	0.9999
140	1052121	hca-miR-20a-3p	AGAAAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22002	22	AGAAAGGAGG	0.9999
145	1052121	hca-miR-22-3p	AGAAAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr17:19172	22	AGAAAGGAGG	0.9999
147	1052124	hca-miR-23a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:12947	22	UUGGAGGAGG	0.9999
148	1052124	hca-miR-23b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:12947	22	UUGGAGGAGG	0.9999
152	1423299	hca-miR-25-3p	GAAGAAGGAG	homo	Homo sapiens	chr12:50911	22	GAAGAAGGAG	0.9999
153	1401312	hca-miR-25a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:50911	22	UUGGAGGAGG	0.9999
150	1783220	hca-miR-27a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:12947	22	UUGGAGGAGG	0.9999
162	182221	hca-miR-29a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr7:12091	22	UUGGAGGAGG	0.9999
162	1808220	hca-miR-29b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr7:12122	22	UUGGAGGAGG	0.9999
170	182220	hca-miR-30a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22002	22	UUGGAGGAGG	0.9999
174	1049231	hca-miR-32-5p	GAAGAAGGAG	homo	Homo sapiens	chr12:50911	22	GAAGAAGGAG	0.9999
182	1701312	hca-miR-102a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22002	22	UUGGAGGAGG	0.9999
192	120221	hca-miR-102b-3p	AAAGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22004	22	AAAGAGGAGG	0.9999
197	1007221	hca-miR-107	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:21222	22	UUGGAGGAGG	0.9999
422	1002211	hca-miR-205-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr14:12222	22	UUGGAGGAGG	0.9999
442	8722207	hca-miR-151a-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:10022	22	UUGGAGGAGG	0.9999
447	154421	hca-miR-181b-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:10022	22	UUGGAGGAGG	0.9999
447	1012220	hca-miR-183-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr7:129410	22	UUGGAGGAGG	0.9999
462	1472220	hca-miR-205-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22002	22	UUGGAGGAGG	0.9999
462	1027221	hca-miR-221-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:45022	22	UUGGAGGAGG	0.9999
467	1477221	hca-miR-223-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:45022	22	UUGGAGGAGG	0.9999
710	1784221	hca-miR-125b-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:12122	22	UUGGAGGAGG	0.9999
722	1027220	hca-miR-223a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:45022	22	UUGGAGGAGG	0.9999
724	124221	hca-miR-27b-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr9:79477	22	UUGGAGGAGG	0.9999
726	726221	hca-miR-120a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:127400	22	UUGGAGGAGG	0.9999
762	1314220	hca-miR-191-3p	GAAGAAGGAG	homo	Homo sapiens	chr24:40501	22	GAAGAAGGAG	0.9999
765	1011221	hca-miR-125a-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22122	22	UUGGAGGAGG	0.9999
780	112221	hca-miR-149-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr22:12222	22	UUGGAGGAGG	0.9999
790	1001221	hca-miR-125-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr22:22002	22	UUGGAGGAGG	0.9999
840	1002209	hca-miR-125b-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr22:22002	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1027	1002207	hca-miR-200b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:70722	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1150	1192220	hca-miR-100b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr7:99910	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1177	1000221	hca-miR-92b-3p	GAAGAAGGAG	homo	Homo sapiens	chr12:51122	22	GAAGAAGGAG	0.9999
1192	1404221	hca-miR-120b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr22:22007	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1199	1844221	hca-miR-201-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:25122	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1244	8712299	hca-miR-271a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr21:49112	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1281	1044221	hca-miR-125-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr14:10027	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1287	1404221	hca-miR-151a-5p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:10022	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1299	5072099	hca-miR-151a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr9:141742	22	UUGGAGGAGG	0.9999
1329	8122099	hca-miR-329-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr7:10622	22	UUGGAGGAGG	0.9999
2122	826221	hca-miR-423-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr17:22944	22	UUGGAGGAGG	0.9999
2120	8712099	hca-miR-423-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr24:40075	22	UUGGAGGAGG	0.9999
2220	5322099	hca-miR-23c-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22002	22	UUGGAGGAGG	0.9999
2620	8922099	hca-miR-120c-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:14227	22	UUGGAGGAGG	0.9999
4278	132221	hca-miR-92b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:12122	22	UUGGAGGAGG	0.9999
4282	1472220	hca-miR-205b-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:12124	22	UUGGAGGAGG	0.9999
4284	1401220	hca-miR-205c-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:12122	22	UUGGAGGAGG	0.9999
5700	5212099	hca-miR-744-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr7:111925	22	UUGGAGGAGG	0.9999
9071	1844221	hca-miR-202a	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:41201	19	UUGGAGGAGG	0.9999
17601	5202299	hca-miR-429b	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:10027	22	UUGGAGGAGG	0.9999
17620	1044221	hca-miR-505b	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:70722	18	UUGGAGGAGG	0.9999
19022	100221	hca-miR-4454	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr4:14014	20	UUGGAGGAGG	0.9999
19022	8172099	hca-miR-4497	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:11027	17	UUGGAGGAGG	0.9999
19214	5272099	hca-miR-4216	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:21021	17	UUGGAGGAGG	0.9999
19240	1227221	hca-miR-2090	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr21:20540	20	UUGGAGGAGG	0.9999
19290	132221	hca-miR-1717-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr23:20712	22	UUGGAGGAGG	0.9999
20232	5222099	hca-miR-1272a-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:40025	21	UUGGAGGAGG	0.9999
22020	1044221	hca-miR-507	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:20027	18	UUGGAGGAGG	0.9999
22022	1452220	hca-miR-5090	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr10:22712	24	UUGGAGGAGG	0.9999
22022	1254220	hca-miR-5090	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:12020	19	UUGGAGGAGG	0.9999
24026	7892099	hca-miR-5122	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr12:22024	20	UUGGAGGAGG	0.9999
24221	7422099	hca-miR-5722-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:20622	22	UUGGAGGAGG	0.9999
25700	1842220	hca-miR-5952-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr20:12722	22	UUGGAGGAGG	0.9999
26724	1306221	hca-miR-7704	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr21:77022	19	UUGGAGGAGG	0.9999
29140	8262099	hca-miR-7947-3p	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr11:10012	21	UUGGAGGAGG	0.9999
29700	8712099	hca-miR-9029	UUGGAGGAGG	homo	Homo sapiens	chr21:10025	22	UUGGAGGAGG	0.9999

図 7. miRNA の網羅解析

キャニングを行っている。その結果、評価しうる 1,996 プロブセットの miRNA の中、75 以上の miRNA の発現が確認できた (図 7)。その中でも miR-16、miR-23、miR24、miR-31、miR-205 の発現が有意に高かった。現在、今回確認された高発現の miRNA と MMP-9 の発現調節の関係をそれぞれ確認している。最終的に、その結果を新規診断方法および治療方法の開発に繋がりたいと考えている。

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 2 件)

Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Oncologic Outcomes of Esophageal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. Yodying H, Matsuda A, Miyashita M, Matsumoto S, Sakurazawa N, Yamada M, Uchida E Ann Surg Oncol. 23(2):646-54. 2015 年 2 月

Impact of Neoadjuvant Chemoradiation on Short-Term Outcomes for Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients: A Meta-analysis. Sathornviriyapong S, Matsuda A, Miyashita M, Matsumoto S, Sakurazawa N, Kawano Y, Yamada M, Uchida E Ann Surg Oncol. 23(11):3632-3640. 2016 年 10 月

〔学会発表〕(計 1 件)

「食道扁平上皮癌での CD147, MCT-1, MMP-9 の発現意義」, 第 69 回日本食道学会学術集会, 横浜, 堀場光二, 宮下正夫, 山田真吏奈, 櫻澤信行, 牧野浩司, 野村務, 内田英二, 2015 年 7 月 2 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮下正夫 (MIYASHITA, Masao)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70229847

(2)研究分担者

堀場光二 (HORIBA, Koji)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10328833

山田真吏奈 (YAMADA, Marina)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70508621