

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09077

研究課題名（和文）食道扁平上皮癌・機能性RNA統合理解に基づく治療抵抗性分子機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma based on comprehensive functional RNA analysis

研究代表者

和田 真澄（Wada, Masumi）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60836112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌におけるマイクロRNA発現プロファイルを用い、miR-143-5p、miR-143-3pが腫瘍抑制型マイクロRNAとしての機能を示すことを証明した。新たなターゲット遺伝子としてHMGA2、KRT80を見出し、食道扁平上皮癌関連癌遺伝子であり、それらを制御する機能性RNAネットワークの中で重要な役割を示していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有効な治療法の少ない食道扁平上皮癌において、新規の食道扁平上皮癌マイクロRNAを解析することで、食道扁平上皮癌に関連するターゲット遺伝子を発見し、未だ報告のない新規分子やそれらの制御する機能性RNAネットワークの探索を行うことが可能だった。しかし、CRISPER-Cas9システムで癌促進型マイクロRNAのゲノム編集を行なった癌細胞の作成、食道癌オルガノイド作成については手技確率と報告に至らず、今後継続した研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：Using the microRNA expression profile in Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), it was demonstrated that miR-143-5p, miR-143-3p, function as ESCC-suppressing microRNA. HMGA2, KRT80 were found as new target genes, and their functional analysis was performed as esophageal squamous cell cancer genes. Furthermore, we demonstrated that these genes are associated with ESCC and play an important role in the functional molecular network of ESCC.

研究分野：消化器外科

キーワード：マイクロRNA 食道扁平上皮癌 機能性RNAネットワーク がん遺伝子 がん抑制遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

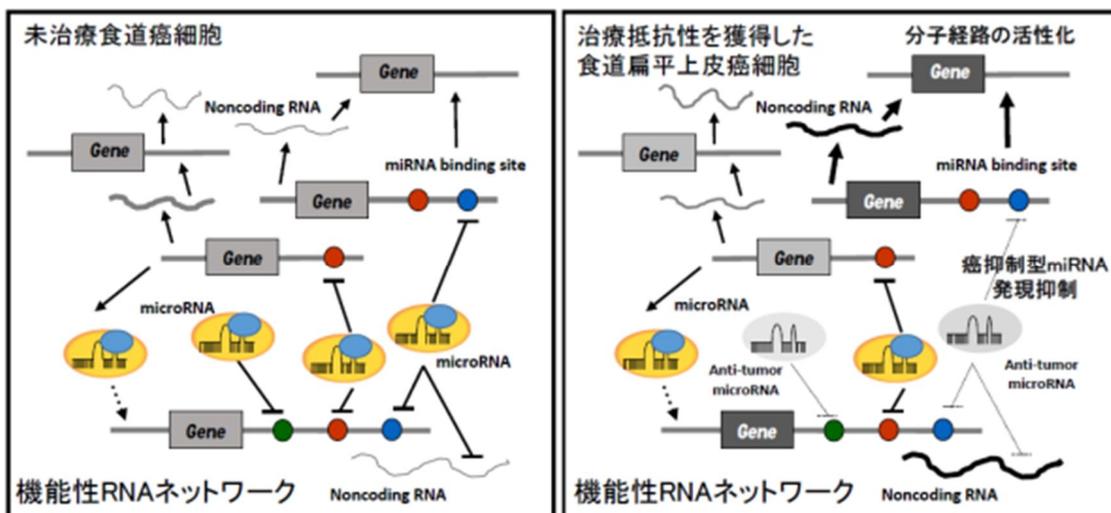
## 1. 研究開始当初の背景

食道癌に対しては、近年、化学療法、放射線療法、手術を組み合わせた集学的治療が行われている。JCOG9907 試験(1999~2006年)では、シスプラチン + 5-FU による補助化学療法の施行時期についての検討が行われ、術前化学療法群が、術後補助化学療法群に比べて、全生存期間(5年生存率 55% vs 43%)が有意に良好であることが示された。この結果、現在わが国における切除可能な cStage Ⅰ 胸部食道癌に対しては、シスプラチン + 5-FU による術前化学療法を行なった後に根治手術を施行する治療戦略が標準的となっている。しかしながら、術前化学療法または化学放射線治療に対して、治療効果が乏しい患者が少なからず存在する。そのため、手術加療や放射線化学療法を併用した集学的治療の進歩にも関わらず、本疾患の 5 年生存率は 35%程度と、消化器癌の中でも予後不良な癌の一つである。また、食道癌根治手術後の再発症例・遠隔転移症例は、28~47%に認められる。このような症例に対する、有効な治療法は殆どない。近年開発が相次いでいる、分子標的治療薬や、免疫チェックポイント阻害剤も、食道扁平上皮癌の再発症例・遠隔転移症例に対して効果は限定的である。

## 2. 研究の目的

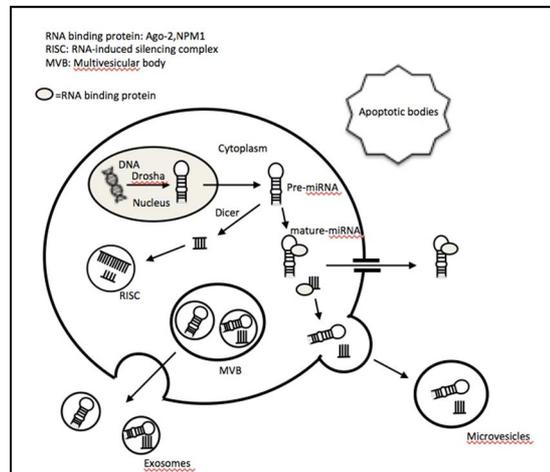
ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒト細胞中には極めて多くの RNA 分子が転写され存在している事が明らかとなった。最近の研究から、これら RNA 分子は、生体内で様々な機能を有している事が明らかになりつつある。マイクロ RNA は、機能性 RNA 分類される 19~22 塩基の低分子 RNA である。この RNA 分子は、最終的に 1 本鎖の RNA 分子として機能し、機能性 RNA (蛋白コード・非蛋白コード遺伝子)の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御をしている。マイクロ RNA の特徴として、1 種類のマイクロ RNA は、数十~数百種類の機能性 RNA を制御している事から、マイクロ RNA の発現異常は、細胞内の機能性 RNA ネットワークの破綻を引き起こし、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している事が報告されている。ポストゲノムシーケンス時代において、生物学の理解には、蛋白コード遺伝子のみならず、機能性 RNA を包括的に解析し、細胞内の複雑な機能性 RNA ネットワークを探索する事が必要である。食道扁平上皮癌細胞において、化学療法・化学放射線治療に対する治療抵抗性の分子機構について、機能性 RNA を加味した理解が必要である。

本研究の目的は、治療抵抗性に至った食道扁平上皮癌患者の組織およびエクソソーム由来のマイクロ RNA 解析から、治療抵抗性・再発・遠隔転移に関わる「食道扁平上皮癌・癌促進型マイクロ RNA」を探索する事。「食道扁平上皮癌・癌促進型マイクロ RNA」が制御する機能性 RNA ネットワーク解析から、治療の標的となる分子および分子経路を探索する事である。本研究の成果は、治療抵抗性・食道扁平上皮癌に対する新規治療法の開発に向けて、有用な情報を提供できると考えた。



### 3. 研究の方法

当教室は、機能性 RNA の 1 種である「マイクロ RNA」を起点として、細胞内の機能性 RNA ( 蛋白コード遺伝子・蛋白非コード遺伝子 ) の分子ネットワークを描写する方法論を考案し、この方法論を用いる事により、食道扁平上皮癌における転移に關与する分子経路を明らかにしてきた実績を有する。発現プロファイルには、これまでに報告の無い、マイクロ RNA が多数含まれている事である。これまでの概念では、マイクロ RNA の生成において、2 本鎖 RNA のマイクロ RNA は、guide strand と、passenger strand



に分離する。このうち、guide strand のみが機能するとされている。申請者の研究グループは、これまでに、miR-145-3p、miR-150-3p、miR-199a-3p などの passenger strand が、癌抑制型マイクロ RNA として機能している事を明らかにした。

これまでの解析において得られている、治療抵抗性・食道扁平上皮癌 ( 組織 ) マイクロ RNA 発現プロファイルにおいて、高発現しているマイクロ RNA と、現在、解析を続けている、患者エクソソーム由来マイクロ RNA 発現解析で、高頻度に検出されるマイクロ RNA を候補として以下の実験を行う。

(1) 高悪性度食道扁平上皮癌・癌細胞に、候補となるマイクロ RNA の inhibitor を加え、癌細胞の、細胞増殖能、遊走能、浸潤能、アポトーシス誘導能、抗癌剤感受性試験の機能解析を行う。

低悪性度食道扁平上皮癌・癌細胞に、マイクロ RNA を核酸導入し、(1-1)同様に、機能解析を行う。

(2) 癌促進型マイクロ RNA の seed 配列を、CRISPR-Cas9 システムで、ゲノム編集する。ゲノム編集を施した癌細胞を作製する。

ゲノム編集を行った癌細胞と、未編集の癌細胞について、網羅的な遺伝子発現解析を行い比較する事から、癌促進型マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワークの探索を行う。治療標的となる分子・分子経路を探索し、ドラッグ・リポジションの考案を行う。

ゲノム編集を行った癌細胞から食道癌オルガノイドを作成し、抗癌剤感受試験を行う。また、ドラッグ・リポジションの候補について検討する

### 4. 研究成果

2019 年、2020 年は食道扁平上皮癌における機能性 RNA ネットワークを解析するため、当教室における食道扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルを用い、miR-143-5p、miR-143-3p の食道扁平上皮癌抑制効果を機能解析した。いずれのマイクロ RNA も癌抑制型マイクロ RNA としての機能を示した。更に、新たに膀胱癌遺伝子として HMGA2、KRT80 を見出した。miR-143-5p 投与によって、HMGA2 の発現は抑制され、同様に miR-143-3p 投与によって KRT80 の発現は抑制された。ルシフェラーゼアッセイを行うことで miR-143-5p、miR-143-3p は HMGA2、KRT80 を遺伝子配列依存的に制御することを証明した。HMGA、KRT80 が食道扁平上皮癌の癌遺伝子であり、miR-143-5p、miR-143-3p が扁平上皮癌の癌抑制型マイクロ RNA であることを報告した。

さらに 2021 年度は miR-143 の解析と並行して進めてきた癌促進型マイクロ RNA の seed 配列を、CRISPR-Cas9 システムで、ゲノム編集した癌細胞を作製の作成に取り組んだ。しかし、培養段階で細胞死が促進され、ノウハウの確率に至らなかった。そのため、ゲノム編集を行った癌細胞から食道癌オルガノイドを作成し、抗癌剤感受試験を行い、ドラッグ・リポジションの候補について検討することができなかった。

そのため、miR-143 と食道扁平上皮癌に關連する癌遺伝子として証明することができた HMGA2 family、KRT80 の他癌との關連について機能性 RNA ネットワークの探索を行った。

今までの癌部 vs 非癌部の遺伝子比較だけではなく、術前化学療法の有無、術前放射線療法

の有無、術前化学療法効果判定を考慮した個別での遺伝子発現プロファイルを作成し、新たな機能性 RNA ネットワークの探索を行うことも検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wada Masumi, Goto Yusuke, Tanaka Takako, Okada Reona, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Noda Masahiro, Sasaki Ken, Kita Yoshiaki, Kurahara Hiroshi, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji, Seki Naohiko	4. 巻 65
2. 論文標題 RNA sequencing-based microRNA expression signature in esophageal squamous cell carcinoma: oncogenic targets by antitumor miR-143-5p and miR-143-3p regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0795-x	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 NEPAL PRAMOD, HOZAKA YUTO, TANAKA TAKAKO, WADA MASUMI, ASAI SHUNICHI, MINEMURA CHIKASHI, IDICHI TETSUYA, ARIGAMI TAKAAKI, KURAHARA HIROSHI, SEKI NAOHICO, OHTSUKA TAKAO	4. 巻 41
2. 論文標題 Impact of Oncogenic Targets Controlled by Tumor-Suppressive miR-30a-5p in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4821 ~ 4836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15297	査読の有無 無
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 Hozaka Yuto, Seki Naohiko, Tanaka Takako, Asai Shunichi, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Wada Masumi, Tanoue Kiyonori, Kawasaki Yota, Mataka Yuko, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular Pathogenesis and Regulation of the miR-29-3p-Family: Involvement of ITGA6 and ITGB1 in Intra-Hepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2804 ~ 2804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112804	査読の有無 無
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 Shimomura Hiroki, Okada Reona, Tanaka Takako, Hozaka Yuto, Wada Masumi, Moriya Shogo, Idichi Tetsuya, Kita Yoshiaki, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao, Seki Naohiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of miR-30a-3p Regulation of Oncogenic Targets in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6459 ~ 6459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186459	査読の有無 無
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 Kawagoe Kosuke, Wada Masumi, Idichi Tetsuya, Okada Reona, Yamada Yasutaka, Moriya Shogo, Okubo Keishi, Matsushita Daisuke, Arigami Takaaki, Kurahara Hiroshi, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji, Seki Naohiko	4. 巻 65
2. 論文標題 Regulation of aberrantly expressed SERPINH1 by antitumor miR-148a-5p inhibits cancer cell aggressiveness in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 647 ~ 656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0746-6	査読の有無 無
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 Tanaka Takako, Okada Reona, Hozaka Yuto, Wada Masumi, Moriya Shogo, Satake Souichi, Idichi Tetsuya, Kurahara Hiroshi, Ohtsuka Takao, Seki Naohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular Pathogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Impact of miR-30c-5p and miR-30c-2-3p Regulation on Oncogenic Genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2731 ~ 2731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12102731	査読の有無 無
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 Khalid Muhammad, Idichi Tetsuya, Seki Naohiko, Wada Masumi, Yamada Yasutaka, Fukuhisa Haruhi, Toda Hiroko, Kita Yoshiaki, Kawasaki Yota, Tanoue Kiyonori, Kurahara Hiroshi, Mataka Yuko, Maemura Kosei, Natsugoe Shoji	4. 巻 11
2. 論文標題 Gene Regulation by Antitumor miR-204-5p in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: The Clinical Significance of Direct RACGAP1 Regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 327 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11030327	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 和田真澄
2. 発表標題 Creating of ESCC microRNA expression signature based on RNA-sequencing: Identification of miR-143-5p regulating oncogenic networks
3. 学会等名 日本癌転移学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田真澄
2. 発表標題 Creating of ESCC microRNA expression signature based on RNA-sequencing: Identification of miR-143-5p regulating oncogenic networks
3. 学会等名 消化器癌発生学会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	関 直彦 (Seki Naohiko) (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授  (12501)	
研究分担者	夏越 祥次 (Natsugoe Shoji) (70237577)	鹿児島大学・歯学部医学系・教授  (17701)	

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
---------	---------