

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17022

研究課題名(和文) 早期食道癌の増殖・浸潤に関わる特異的マイクロRNA同定と治療戦略への応用

研究課題名(英文) Identification of specific miRNAs as potential biomarkers for the progression of early esophageal cancer

研究代表者

藤原 新太郎 (Fujihara, Shintaro)

香川大学・医学部・寄附講座教員

研究者番号：30612486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌の早期発見と治療において、腫瘍の深達度・脈管浸潤の正確な判定と新たなバイオマーカーの開発が望まれる。本研究では、表在型食道癌の内視鏡切除前に得られた腫瘍組織と隣接する正常組織のマイクロRNA(miRNA)の発現プロファイルと比較した。またmiRNAの発現と食道癌の深達度および脈管侵襲に関連するmiRNAについての発現解析を行った。表在型食道癌の腫瘍組織ではmiR-21-5pなど複数のmiRNAが高発現しており、癌細胞株を用いて機能解析を行った。本研究からこれらのmiRNAが、表在型食道癌の早期診断マーカーや癌初期の細胞増殖浸潤機構に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、癌の次世代早期診断マーカーであるマイクロRNAの表在型食道癌における発現パターンを明らかにした。また食道癌の深達度および脈管侵襲に関連するmiRNAについての発現プロファイルを行いmiRNA signatureを樹立し、これらのmiRNAが診断バイオマーカーとして役割を果たす可能性を示した。表在型食道癌の腫瘍組織では、特にmiR-21-5pとmiR-146b-5pが高発現し、miR-210-3pの低発現していた。合成miR-21-5pの導入で食道扁平上皮癌細胞株の細胞増殖が促進されており、miR-21-5pの過剰発現が初期の腫瘍増殖・浸潤のメカニズムに関与するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the early detection of esophageal cancer, accurate determination of tumor depth and vascular invasion and development of new biomarkers are desirable. In this study, we compared microRNA(miRNA) expression profiles of tumor tissue and adjacent normal tissue obtained before endoscopic resection of superficial esophageal squamous cell carcinoma(ESCC). We also analyzed miRNA expression profile in relation to invasion depth and vascular involvement of superficial ESCC. Several miRNAs, such as miR-21-5p, are highly expressed in tumor tissues of superficial ESCC, and we performed functional analysis using cancer cell lines. This study suggests that these miRNAs may be involved in early diagnostic markers of superficial ESCC and in the mechanism of cancer cell proliferation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：表在型食道癌 マイクロRNA 内視鏡

## 1. 研究開始当初の背景

食道がんは、世界で7番目に多いがんであり(Bray F, CA Cancer J. Clin. 2018)、本邦における食道癌数は約1万3000人と推定されている。食道扁平上皮癌は全症例の約90%を占め、その多くは局所進行もしくは転移を有する進行した状態で発見されることが多い。進行した食道癌患者の5年生存率は15%未満であるが、早期診断された表在型食道癌患者では85%に達する可能性があり、早期発見と迅速な治療が生存率の向上に重要である(Lao-Sirieix P, Nat. Rev. Clin. Oncol. 2012)。内視鏡検査は、表在型食道癌および前癌病変の診断において最も感度の高い方法であり、ゴールドスタンダードとされている。前癌病変や表在型食道癌の診断は、従来の白色光内視鏡のみでは見落としやすいため、拡大狭帯域画像法を併用した検査が早期発見に有用である(Muto M, J. Clin. Oncol. 2010)。それでも癌の深達度・脈管浸潤を正確に判断することは困難であり、手技の侵襲性、高度な訓練の必要性など、内視鏡検査には他にも限界がある(Couch G, Cancer Prev. Res. 2016)。したがって、表在型食道癌の深達度・リンパ管侵襲の診断に対するより良い補助的診断バイオマーカーを同定することが急務となっている。

マイクロRNA(miRNA)は、短い(17-25塩基)ノンコーディング一本鎖RNA分子で、遺伝子発現の転写後調節に極めて重要な役割を担っている。すでにmiRNAは各種の癌腫の早期検出バイオマーカーとして有用の可能性を検討されているが、表在型食道癌に特異的に発現するmiRNAとその機能的役割についてはこれまでの知見では明らかではない。特に内視鏡切除前の表在型食道癌の組織サンプルを用いてmiRNA発現プロファイルを解析したものはなく、それは主にサンプリングの困難さによる。本研究は、食道扁平上皮癌を早期から検出できる特異的なmiRNAを検索し、早期診断への応用と腫瘍増殖・浸潤メカニズムについて明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、内視鏡切除前の表在型食道癌の臨床サンプルをパイオインフォマティクスと統計学的手法を用いて、表在型食道癌の診断補助のバイオマーカーを確立し、臨床応用に繋げる。

## 3. 研究の方法

### (1) 表在型食道癌のmiRNA signatureの樹立

パイオインフォマティクスと統計解析にて、癌部と非癌部の両群間でmiRNA発現を比較し、表在型食道癌で特異的に発現しているmiRNAを同定する。また深達度や血管侵襲の有無についてのmiRNA signatureの樹立する。

### (2) 臨床凍結サンプルによるmiRNAの検証

(1)で得られたmiRNAの発現を、表在型食道癌凍結組織を用いてリアルタイムPCR法で検証し候補となるmiRNAをさらに絞り込む。

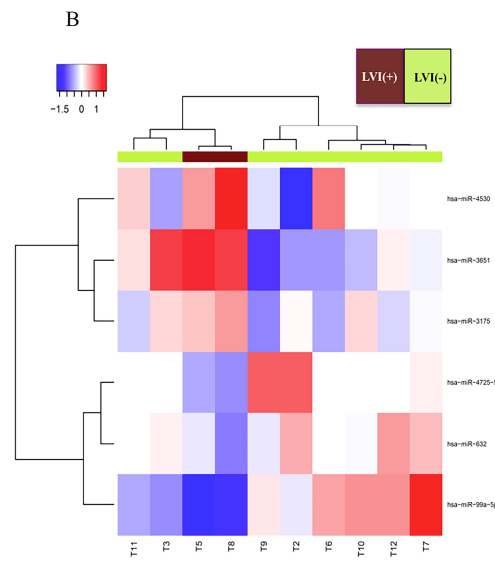
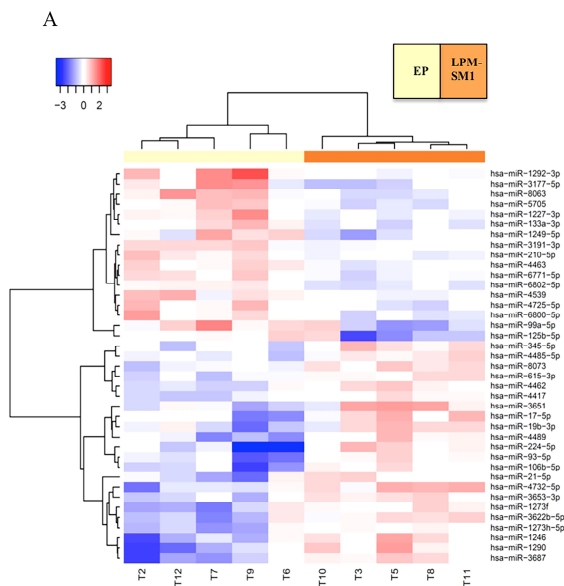
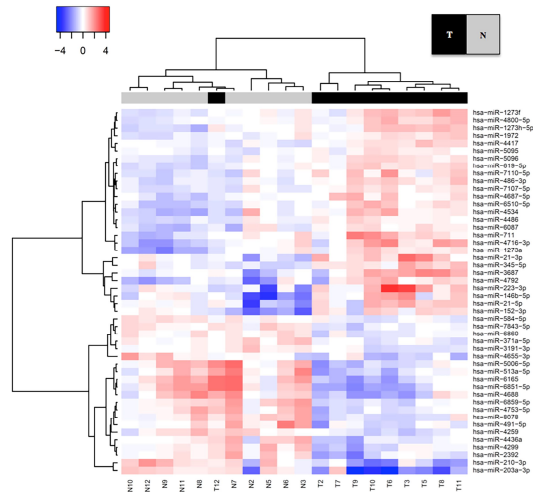
### (3) 食道扁平上皮癌細胞株を用いた腫瘍増殖・浸潤に関するmiRNAの機能解析

複数の合成miRNAを3種類の食道扁平上皮癌細胞株(KYSE-150, KYSE-180, KYSE-850)に導入し、細胞増殖・浸潤アッセイを用いて検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 表在型食道癌のmiRNA signatureの樹立

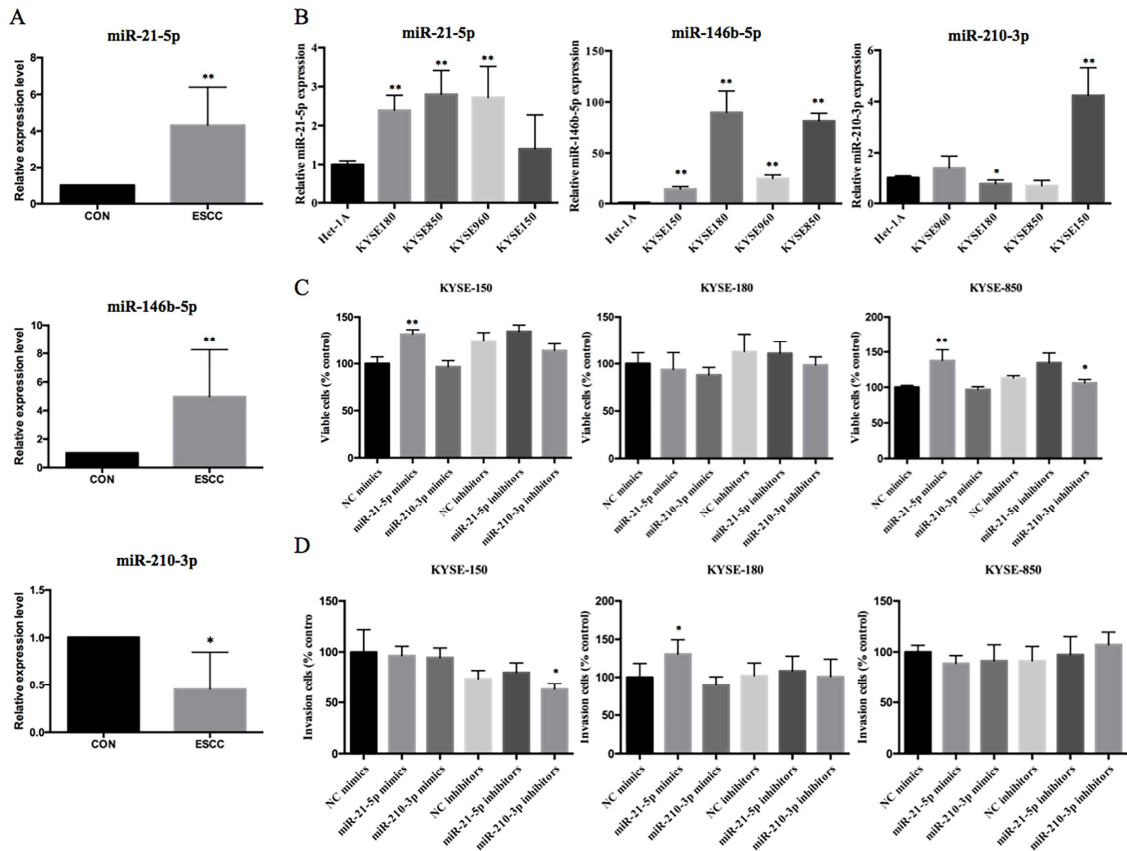
表在型食道癌とその隣接する正常組織のペアで発現の異なる miRNA を miRNA Oligo chip を用いて網羅的に解析した。クラスタリング分析により、2つの組織グループ間で発現の差異が明らかになり、48の miRNA が同定された(図1)。ESCC 組織では隣接する正常組織と比較して、27の miRNA が高発現し、21の miRNA が低発現していた。次に、腫瘍の浸潤度とリンパ管侵襲で層別した患者サブグループ間で miRNA の発現を比較した。EP 群(腫瘍が粘膜上皮に局限)と LP/MM/SM1 群(腫瘍が粘膜固有層から粘膜下層に局限)を比較して、22の miRNA が高発現し、17は低発現した(図2A)。一方、リンパ管侵襲なし群ではリンパ管侵襲あり群と比較して3の miRNA が高発現し、3つが低発現していた(図2B)。



## (2) 臨床凍結サンプルによる miRNA の検証

癌と密接な関係のある miRNA(oncomiR)として、miR-21-5p、miR-146b-5p、miR-210-3p の発現を、表在型食道癌の凍結組織を用いてリアルタイム PCR 法で評価した。マイクロアレイ解析と一致して、ESCC 組織では隣接する正常組織と比較して、miR-21-5p と miR-146b-5p がそれぞれ 4.32 倍 ± 2.08 (標準偏差) と 4.96 倍 ± 3.30 で発現上昇し、miR-210-3p は 0.45 倍 ± 0.06 で低下していた(図3A)。さらに、4つの ESCC 細胞株 KYSE150、KYSE180、KYSE850、および KYSE960 も、Het-1A 正常食道上皮細胞と比較して、有意に高いレベルの miR-21-5p および miR-146b-5p を発現し、有意に低いレベルの miR-210-3p を発現した(図3B)。

(3)



### (3) 食道扁平上皮癌細胞株を用いた腫瘍増殖・浸潤に関する miRNA の機能解析

ESCC における miR-21-5p と miR-210-3p の食道癌の細胞増殖・浸潤に関する役割を探るため、KYSE-150、KYSE-180、KYSE-850 細胞に miR-21-5p と miR-210-3p mimics または阻害剤を導入し、細胞増殖と浸潤に対する影響を評価した (図 3C-D)。合成 miR-21-5p mimics を遺伝子導入した KYSE-180 細胞の増殖および浸潤は、コントロール (NC) と比較して有意に促進され、miR-210-3p 阻害剤では KYSE-850 の細胞増殖が抑制された一方、合成 miR-146b-5p の導入では細胞増殖・浸潤に影響しなかった。これらのデータは、miR-21-5p の過剰発現が、限定された ESCC 細胞の細胞増殖および浸潤を促進することを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Fujihara Shintaro, Kobara Hideki, Nishiyama Noriko, Hirose Kayo, Iwama Hisakazu, Masaki Tsutomu  | 4. 巻<br>22                |
| 2. 論文標題<br>MicroRNA Expression Profiles in Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma before Endoscopic Submucosal Dissection: A Pilot Study | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>4789 ~ 4789 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms22094789  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|