

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591462

研究課題名（和文） 食道癌における WNT シグナルの解析

研究課題名（英文） Analysis of Wnt signaling pathway in esophageal cancer

研究代表者

石黒 秀行 (ISHIGURO HIDEYUKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10363920

研究成果の概要（和文）：

1. microRNA の promoter 領域の TCF7L2 結合部位の検索を行い mir-129 の上流に TCF7L2 結合部位となりうる配列を確認した。
2. Si  $\beta$  カテニンによる細胞死誘導の実験を食道癌細胞株 TE11 を用いて行った。コントロール si と比較して、WST1 アッセイで細胞死が誘導された。
3. ベータカテニン、E カドヘリン、TCF4 の免疫染色を食道癌臨床検体を用いて行い、臨床病理学的因子との比較検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

1. We found TCF7L2 binding site in the promoter domain of microRNA. Especially, we found the TCF7L2 binding site in the promoter region of mir-129 which is involved in the poor prognosis of the patients with esophageal cancer.
2. We performed siRNA of beta catenin using esophageal cancer cell line TE11. And si-beta catenin induced the cell death of esophageal cancer cell.
3. We analyzed the comparison between the clinico-pathological factor and the data of immunohistochemistry of beta catenin, E cadherin and TCF4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食道外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：WNT シグナル、食道癌

## 1. 研究開始当初の背景

我々は以前より食道癌において、その Wnt シグナルの重要性について論じてきた。Wnt シグナルと microRNA の関係について報告した論文はほとんどないが、遺伝子発現制御という点でクロストークしていることは、間違いない。

## 2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達経路と近年急速に研究の進んでいる microRNA との関係明らかにすることで、食道癌研究の進歩に貢献する。

### 3. 研究の方法

(1) DNASIS を用いた、microRNA の promotor 領域の TCF 結合部位の検索  
現在までに報告されている 500 種の microRNA について、300~400bp の primary microRNA の情報は得られている。NCBI のホームページなどのゲノム情報を用い、microRNA の転写開始部位から上流の約 1500 bp を検索する。TCF の結合部位は、CTTTGA/TA/T の 7 bp (4 パターン) であり、この 1500 bp を DNASIS ファイルに保存し、7bp の match する箇所の有無を検索していく。まずは、500 種類の microRNA を TCF の結合部位のある microRNA とない microRNA を区別した。

(2) 1500bp の中で TCF 結合部位 CTTTGA/TA/T をもつ microRNA のプロモーターアッセイを行う。これは TCF の結合部位を含む領域と含まない領域を PCR にて増幅したのち、それぞれを pGL3 ベクターへクローニングする。クローニングされたベクターの 3' 側にはルシフェラーゼタンパクの発現領域があるため、転写活性が上昇すれば、そのルシフェラーゼ活性が上昇するという原理である。食道癌細胞株、胃癌細胞株を用いて、そのルシフェラーゼ活性を測定する。この時点で TCF 結合部位のあるベクターにルシフェラーゼ活性があれば、この TCF 結合部位によって microRNA が転写活性を TCF によって制御されていることを示唆するものである。

### (3) 食道癌臨床検体および食道癌細胞株における免疫染色

食道癌臨床検体および食道癌細胞株 TE シリーズ、KYSE シリーズ、および食道正常細胞株 HET1A を用いて、免疫染色を行う。Wnt シグナルの現在の status を解析するため、TCF4、ベータカテニン、E カドヘリン、CyclinD1 のそれぞれの一次抗体を用い、status を解析した。臨床検体については、T 因子、N 因子、予後など臨床病理学的因子との比較検討を行い、Wnt シグナルの分子と臨床病理学的因子との関連を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) TCF binding site の検索

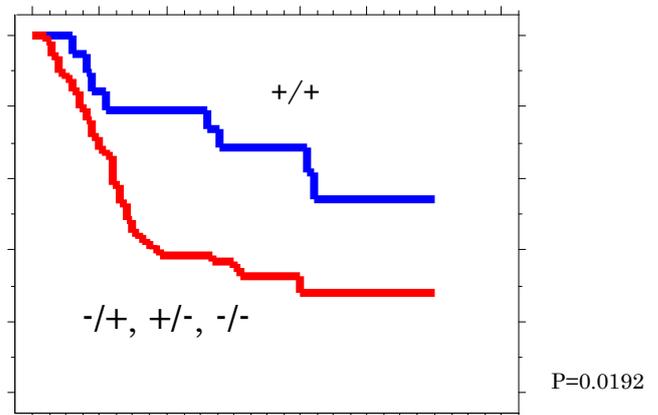
CF の binding site は miR20b, 129-1, 138-1, 15b, 16, 103, 106a, 107, 134, 262, 10a, 15a, 23b, 26a1, 27b, 28, 29c, 34a のプロモーター領域に存在することが判明した。この中で特に、miR129-1 は、すでに我々が食道癌の予後との関わりについて論文報告している miRNA でもあり、この miRNA にターゲットをしばって、以後の解析を行うことにした。

(2) microRNA のプロモーターアッセイ  
microRNA129 の上流に TCF 7L2 binding site を指摘しえたため、そのプロモーター領域の TCF binding site を含むベクターと含まないベクターを作成予定であったが、ベクター作成に非常に難渋し、現時点で有意な結果は得られていない。

(3) ベータカテニンと E カドヘリンの免疫染色では、どちらかが細胞膜から消失している症例では予後不良というデータが得られた。

(図 1)。両方のタンパクが陽性か、それ以外かの臨床病理学的因子との比較では、T 因子、N 因子、Ly、V 因子との相関を認めた。

図 1 (ベータカテニンと E カドヘリンの細胞膜染色と生存曲線)



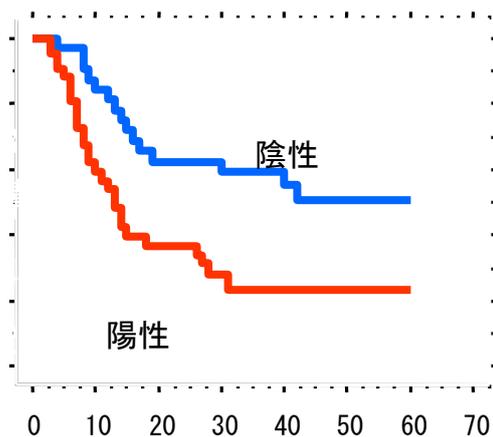
E カドヘリンとその裏打ちタンパクであるベータカテニンともに接着因子として機能するため、どちらか一方のタンパク発現低下により癌細胞の接着能が低下することが、原発巣からの遊離機序の一因と考えられ、予後不良の原因と示唆された。

Eカドヘリンかベータカテニンのどちらかのタンパクの減弱もしくは消失が細胞の遊走、転移能の獲得に寄与している可能性を考慮し追加実験を行っていく予定である。

(4) TCF4の免疫染色では、TCF4は79例中45例で陽性であった。TCF4の核陽性か否かと臨床病理学的因子との比較検討は、T因子、N因子、Ly因子、V因子と相関がみられた。またTCF4の核発現症例は予後不良であった。(図2)

TCF4は、食道癌の増殖、転移に関わっている可能性が示唆された。ベータカテニンが核に移行していない症例でもTCF4は核に移行しており、食道癌においてもWntシグナルがonになっている状態が示唆された。

図2 (TCF4核免疫染色と生存曲線)



(5) siベータカテニンによる細胞死誘導  
食道癌細胞株TE11を用いて、siベータカテニンによる細胞死誘導を行った。WST1法による評価をしたところ、siベータカテニンはコントロールと比較して細胞死を誘導できた。さらにCCDN1 (Wntシグナルの下流遺伝子)の抗体を用いてWestern blottingを行ったところ、CCDN1の発現低下を認めた。このため、TE11においては、ベータカテニンが核に移行してはいないが、WntシグナルがOnになっている可能性が示唆された。

## 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4件)

- ① Kimura M, Kuwabara Y, Ishiguro H, Takeyama H. Esophageal cancer with racemose hemangioma of the bronchial arteries. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 60, 149-152, 2012  
DOI: 10.1007/s11748-011-0804-2.
- ② Shiozaki M, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Naganawa Y, Shibata T, Fujii Y, Takeyama H. Expression of CD44v6 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Lett, 2, 297-301, 2011  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=22866099>
- ③ Naganawa Y, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Katada T, Tanaka T, Shiozaki M, Fujii Y, Takeyama H. Decreased expression of FBXW7 is correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Exp Ther Med, 1, 841-846, 2010  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=22993608>
- ④ Kimura M, Kuwabara Y, Mitsui A, Ishiguro H, Sugito N, Tanaka T, Shiozaki M, Naganawa Y, Takeyama H. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in esophageal cancer. Oncol Lett, 2, 297-301, 2011  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=22866080>

[学会発表] (計12件)

- ① 石黒秀行、食道扁平上皮癌における好中球/リンパ球比と臨床病理学的因子の検討、第74回日本臨床外科学会総会、2012年11月30日、京王プラザ(東京都)
- ② 石黒秀行、食道扁平上皮癌における膜タンパク(Eカドヘリン、ベータカテニン)の関わり、第54回日本消化器病学会大会、2012年10月10日、神戸国際会議場(兵庫県)
- ③ 石黒秀行、膀胱癌におけるLeptinの細胞増殖効果の検討、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、ロイトン札幌(北海道)
- ④ 石黒秀行、食道扁平上皮癌におけるGPS(Glasgow Prognostic Score)の有用性、第67回日本消化器外科学会総会、2012年7月19日、富山国際会議場(富山県)

- ⑤石黒秀行、食道癌における microRNA 発現、第 66 回日本食道学会学術集会、2012 年 6 月 22 日、軽井沢プリンスホテル（長野県）
- ⑥Takahashi H, Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis in gemcitabine-sensitive and -resistant pancreatic cancer cells. 7th Annual Academic Surgical Congress, 2012/2/15, Encore Las Vegas, Nevada, USA
- ⑦Ando T, Relationship between expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes and 5-fluorouracil sensitivity in esophageal carcinoma cell lines. 21st World Congress of the International Association of Surgeons Gastroenterologists and Oncologists, 2011/11/12, Keio Plaza Hotel, Tokyo
- ⑧長縄康浩、食道扁平上皮癌における WRNmRNA の発現と臨床病理学的意義、第 65 回日本食道学会学術集会、2011 年 9 月 26 日、仙台国際センター（宮城県）
- ⑨塩崎みどり、大腸癌における CD44variant6 発現の臨床病理学的意義、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月、震災の影響により紙上開催
- ⑩長縄康浩、食道扁平上皮癌における FBXW7 の発現と臨床病理学的意義、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、下関市民会館（山口県）
- ⑪石黒秀行、食道癌患者において NOTCH1 遺伝子高発現は予後不良である、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、下関市民会館（山口県）
- ⑫塩崎みどり、食道癌における CD44variant6 の発現とその臨床的意義、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、下関市民会館（山口県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石黒 秀行（ ISHIGURO HIDEYUKI ）  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10363920

### (2) 研究分担者

塩崎 みどり（ SHIOZAKI MIDORI ）  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90531004

堅田 武保（ KATADA TAKEYASU ）  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医  
研究者番号：70529164