

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300341

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌の新たな治療体系の構築を目指した統合的ゲノム・エピゲノム解析

研究課題名(英文)Comprehensive genomic and epigenetic analysis of ESCC to construct new therapeutic modality

研究代表者

河野 辰幸 (Kawano, Tatsuyuki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00186115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌(ESCC)における有用なバイオマーカー・治療標的分子を同定すべく、臨床検体を用いたゲノム・エピゲノム解析を中心に解析を進めてきた。食道内多発癌のゲノム解析からは、2カ所の癌部で比較的多くの共通変異が認められ、field cancerizationを説明し得る興味深い知見であった。網羅的メチル化解析からは、リンパ節転移と関連のあるメチル化異常を抽出してきた。さらに、ESCCにおいてしばしば発現低下が見られる腫瘍抑制性のmicroRNAを同定し、治療応用への可能性について検討してきた。今後さらに詳細な検討を加え、予後不良なESCCにおける新規治療体系の確立を模索したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the cancers with poor prognosis, and there are no effective molecular targeted drugs to ESCC yet. To clarify valuable biomarkers or therapeutic targets, we analyzed ESCC clinical samples mainly using a technique of genomic or epigenetic analysis. Whole-exome sequencing revealed some common mutations between two distinct tumors in the same patient, which might explain the mechanism of field cancerization. A comprehensive analysis of methylation status revealed several differentially methylated regions (DMRs) which relate to lymph node metastasis. This might be a novel diagnostic tool to predict lymph node metastasis in ESCC patients. Moreover, we identified tumor-suppressor microRNA which expression was often down-regulated in ESCC clinical samples. This microRNA might be a novel therapeutic agent in ESCC. Though it requires further investigations, we expect that these findings contribute to improve the prognosis of ESCC patients.

研究分野：食道外科

キーワード：食道扁平上皮癌 ゲノム解析 エピゲノム解析 マイクロRNA 全エクソンシーケンス Field cancerization heterogeneity

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道癌は予後不良な消化器癌の一つであり、本邦ではその9割以上を食道扁平上皮癌(以下ESCC)が占める。現時点で有効な分子標的治療薬は存在せず、特に術後再発症例や切除不能進行癌症例においてはシスプラチン(以下CDDP)を中心とした化学療法や放射線療法が行われるが、その治療は限られているのが現状である。よって、予後改善のためにも、新規バイオマーカーの同定、分子標的治療薬をはじめとした新規治療薬の台頭が望まれている。

(2) 申請者らが所属する東京医科歯科大学食道外科においては、年間約60症例の食道癌手術症例を有している。また、このうち約40症例が術前未治療症例(術前化学療法等未施行症例)であり、現在までにこれらの症例における、癌部・非癌部ペア検体を収集・保存してきた。これらの検体において、ゲノム・エピゲノム解析を中心とした分子生物学的解析を進め、予後等の臨床病理学的情報との相関を比較検討することで、ESCCにおける新規バイオマーカー、治療法の構築を期待することができる。

2. 研究の目的

(1) 未だ有効な分子標的治療薬の存在しないESCCにおいて、新たな治療体系の構築を目指し、鍵となるゲノム・エピゲノム異常の同定を試みる。これにより、ESCC治療において有用なバイオマーカーや、治療標的分子の同定を試みる。

(2) ESCC症例においてしばしば見られる食道内多発癌や、他臓器癌との重複癌症例における解析から、背景に存在するfield cancerizationの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 継続してESCC症例の癌部・非癌部ペア検体の収集を行うと共に、特に予後等の臨床病理学的情報との比較検討が可能なESCC症例を抽出し、網羅的ゲノム・エピゲノム解析を行う。網羅的ゲノム解析に関しては、次世代型シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行う。また網羅的エピゲノム解析に関しては、Illumina社のBeadArray法を用いて網羅的メチル化解析を行う。特に、食道内多発癌症例に関しては、field cancerizationの解明に寄与する可能性もあり、同一症例におけるそれぞれの癌部で比較検討を行う。

(2) 候補となる分子(microRNAを含む)に関し、臨床病理学的情報との比較検討を行い、臨床応用への可能性について評価を行うと共に、*in vitro*, *in vivo*の実験系において詳細な機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 現在までに、ESCC症例における癌部・非癌部ペア検体を約150例収集してきた。この中で、約20症例において全エクソンシーケンスを施行し、解析を行ってきた。奇しくも、最近になってESCCにおける遺伝子変異の大規模解析結果が相次いで報告されており(Song Y et al. Nature 2014, Lin DC et al. Nat. Genet. 2014)、その結果も踏まえて、現在最終的な解析の段階に入っている。興味深い知見として、同一食道内に2カ所の進行癌を認めたとの症例において、両病変間での共通変異が72、それぞれの腫瘍特異的な変異が38(口側病変特異的)、4(肛門側病変特異的)という結果となった(図1)。つまり、field cancerizationを説明する共通変異、そこからのheterogeneityという可能性があり、食道癌発生の背景やこれを標的とした治療への応用につながる可能性を考えている。今後さらなる検討を加えて報告したいと考えている。

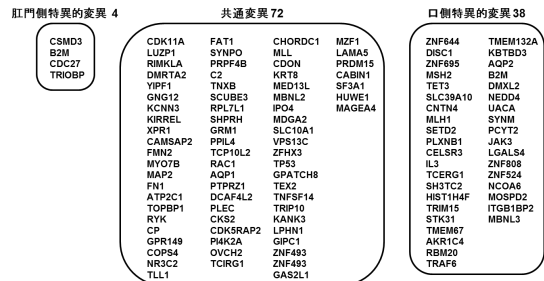


図1 食道内多発癌症例における全エクソンシーケンス解析

(2) エピゲノム解析に関して、67例のESCC症例において、Illumina社のBeadArray法を用いて網羅的メチル化解析を行ってきた。その後、独自の解析アルゴリズムを確立し、特にUICCのTNM分類第7版における病理学的N0症例とN3症例との比較において、differentially methylated regions (DMRs)を同定してきた。これらに関しては、パイロシーケンスによる検討で、裏付けを取っている。最終的に3候補遺伝子に絞り込みを行ったが、これらのメチル化状況をスクリーニングすることで、新たなESCC症例のリンパ節転移予測モデルとなり得る可能性を考えている(投稿準備中)。

(3) ESCCを含む扁平上皮癌において、しばしば高発現しており、化学療法抵抗性などとの相関も報告されているNRF2に注目し、特にこれを負に制御するmicroRNAの同定を試みてきた。最新の知見でも、NRF2の遺伝子変異は稀ならず認められており(4.5%; Song Y et al. Nature 2014, 5.7%; Lin DC et al. Nat. Genet. 2014)、ESCCの治療において鍵となり得る可能性がある。現在までに、NRF2を負に制御するmicroRNAを4つ同定してきたが(Yamamoto et al. Mol. Cancer Res. 2014)、これらmicroRNAの発現低下

や *NRF2*, *KEAP1* の遺伝子変異が ESCC において予後不良との相関を示すことが判明した (図 2)。つまり、これらが ESCC 症例の中でも予後不良な一群を見分けるバイオマーカーとなり得ること、またそのような症例に対してこれらの microRNA を補うことが治療へつながる可能性があることが示唆された。

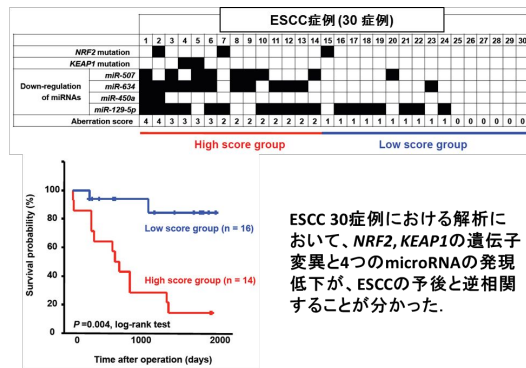
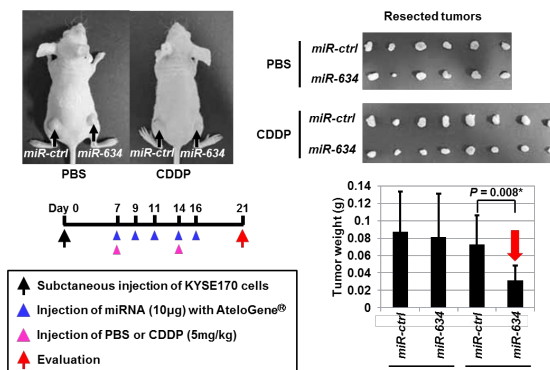


図2 *NRF2*を負に制御するmicroRNAのESCC症例における検討

また、これらの中で *miR-634* が特に強い抗腫瘍効果を示すことが判明し、さらに ESCC において key drug である CDDP の抗腫瘍効果を増強させることが判明した (論文投稿中、図 3)。



ヌードマウスの背部皮下にESCC細胞株を移植し、AteloGene®を媒介として局所投与を行った。特にCDDPとの併用投与時において、*miR-634*は有意な腫瘍抑制効果を示した。

図3 *miR-634*の治療応用への可能性

ESCC 症例の中でも、術後再発症例や切除不能進行癌症例などにおいては、現在古典的な化学療法剤である CDDP が数少ない有効な治療法として用いられている。上記の知見は、これらの治療に上乘せ効果を期待でき、今後予後不良な ESCC において、新たな治療戦略となり得る可能性を示していると考えている。

引用文献

- Song Y et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature*. 509(7498):91-5. doi: 10.1038 / nature13176.
- Lin DC et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat. Genet.*

2014. 46(5):467-73. doi: 10.1038 / ng.2935.

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)

Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Omura K, Inazawa J. The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of *NRF2*-stabilized tumors. *Mol. Cancer Res.* 12(1):58-68, 2014. (査読有)

Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J, Kozaki K. miR-655 Is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*. 2013. 8(5):e62757. doi:10.1371 / journal.pone.0062757. (査読有)

(学会発表)(計 8 件)

Kozaki K, Nagata H, Tanimoto K, Fujiwara N, Imoto S, Ichikawa D, Miyano S, Kawano T, Otsuji E, Inazawa J. Genome-wide screening of DNA methylation markers to predict the presence of lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. AACR annual meeting 2014. 4/7/2014. San Diego, U.S.A

Muramatsu T, Kozaki K, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Miyano S, Inazawa J. Exploring target gene(s) within chromosome 19-amplification detected in a subclone from metastatic tumors in mouse transplantable OSCC. AACR annual meeting 2014. 4/8/2014. San Diego, U.S.A

Fujiwara N, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Inazawa J. MicroRNA-634 induces caspase-dependent apoptosis by targeting anti-apoptotic and mitochondria-related genes in human cancer cells. AACR annual meeting 2014. 4/9/2014. San Diego, U.S.A

藤原 直人、井上 純、山本 信祐、中島 康晃、小村 健、河野 辰幸、小崎 健一、稲澤 譲治. MicroRNA を用いた *NRF2* 活性化癌に対する診断治療戦略. 第 69 回日本消化器外科学会総会. 2014 年 7 月 18 日. 郡山総合体育館、福島.

藤原 直人、井上 純、河野 辰幸、小崎 健一、稲澤 譲治. Identification of Mir-634 as novel tumor-suppressor microRNA in human cancers. 第 73 回日本癌学会総会. 2014 年 9 月 25 日. パシフィコ横浜、横浜.

永田 啓明、小崎 健一、谷本 幸介、藤原直人、井元 清哉、市川 大輔、宮野 悟、河野 辰幸、大辻 英吾、稲澤 譲治、食道扁平上皮癌におけるリンパ節転移予測マーカー同定を目指した網羅的 DNA メチル化探索 .第 72 回日本癌学会総会 .2013 年 10 月 3 日 . パシフィコ横浜、横浜 .
ヌイラン ミシェル、井上 純、河野 辰幸、稲澤 譲治、食道癌における LAPTM5 遺伝子の発現低下 .第 72 回日本癌学会総会 .2013 年 10 月 4 日 . パシフィコ横浜、横浜 .
藤原 直人、井上 純、河野 辰幸、小崎 健一、稲澤 譲治、複数癌種における、MicroRNA-634 による細胞死誘導機構 .第 72 回日本癌学会総会 .2013 年 10 月 5 日 . パシフィコ横浜、横浜 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 辰幸 (Kawano, Tatsuyuki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00186115

(2)研究分担者

稲澤 譲治 (Inazawa, Johji)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551

江石 義信 (Eishi, Yoshinobu)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70151959

小村 健 (Omura, Ken)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10334434

(平成 26 年度より退職に伴い研究分担者から削除)

(3)連携研究者

小崎 健一 (Kozaki, Ken-ichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50270715