

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591950

研究課題名(和文)食道癌生検のmicroRNA発現による化学療法感受性予測に基づく個別化治療の確立

研究課題名(英文) Individualized treatment strategy for esophageal cancer based on the expression of microRNAs in preoperative biopsy specimens.

研究代表者

渡邊 雅之 (Msayuki, Watanabe)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：80254639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは食道癌治療前生検組織におけるmicroRNA(miR)の発現による治療効果予測の可能性を明らかにすることを目的とした。食道癌部では正常食道粘膜と比較してmiR-223が高発現し、FBXW7の発現制御を介して化学療法感受性に関与することを明らかにした。また、食道癌組織におけるRibophorin II(RPN2)の発現がドセタキセルに対する感受性予測因子となることを明らかにした。一方、食道癌患者においては健常人と比較して血清中あるいは血清中に含まれるexosome中miR-21の高発現が認められ、血清中のmiR-21は化学療法感受性のバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the possibility of individualized treatment strategy for esophageal cancer based on the expression of microRNAs in pretreatment biopsy specimens. We revealed that miR-223, which influenced sensitivity to chemotherapeutic agents through regulating the expression of FBXW7, was overexpressed in esophageal cancer tissues compared to normal esophageal epithelium. We also demonstrated that the expression levels of Ribophorin II (RPN2) can be a predictor of sensitivity to Docetaxel. In addition, we found the levels of serum miR-21 or exosomal miR-21 were higher in esophageal cancer patients than in controls and they can be biomarkers for chemosensitivity.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 化学療法感受性 個別化治療 mircoRNA FBXW7 Ribophorin II microRNA-223 microRNA-21

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 食道扁平上皮癌に対する補助療法の現状  
わが国では臨床的ステージ II/III の食道扁平上皮癌に対して術前化学療法後の切除が標準治療となった。

(2) より強力な補助化学療法としての DCF 療法

食道扁平上皮癌に対する標準化学療法はシスプラチン+5-FU (FP)療法であるが、より強力な化学療法の候補として DCF 療法が注目されている。

(3) 化学療法感受性マーカーとしての microRNA

microRNA (miR)は 19 から 25 塩基からなる、タンパク質をコードしない small RNA のひとつであり、遺伝子転写後の発現を制御する。近年、化学療法を含む治療感受性のマーカーとして miR 発現解析の意義が注目されているが、食道扁平上皮癌に対する DCF 療法感受性に関する報告はない。

## 2. 研究の目的

食道癌の化学療法感受性予測因子となる microRNA を同定しその機能を明らかにすることにより食道扁平上皮癌の個別化治療を実現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 食道癌に対する術前 DCF 療法の奏効度と予後の関連

(2) 食道扁平上皮癌症例および細胞株からの RNA 精製

(3) 食道癌血清および血清中の exosome からの RNA 精製

(4) 食道癌ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE)からの miR 抽出

(5) 定量的 real-time RT-PCR 法による miR 発現レベルの解析

(6) small interfering RNA (siRNA)、pre-miR、anti-miR の transfection による機能解析

(7) 免疫組織化学染色 (IHC)

## 4. 研究成果

(1) 食道癌切除例における術前 DCF 療法の効果と予後の関連

術前 DCF 療法施行後に食道切除再建術を施行した 50 例の予後を解析し、臨床効果・組織学的効果とも、治療奏効例の予後が有意に良好であることを明らかにした<sup>1</sup>。

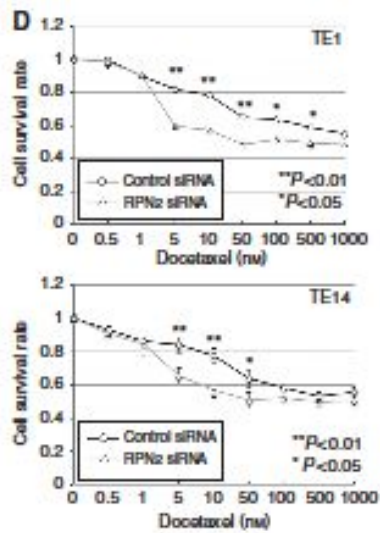
(2) 食道癌における miR-223 の高発現は FBXW7 の発現を制御する

食道癌部においては正常粘膜に比較して miR-223 が高発現し、また miR-223 の発現レベルは FBXW7 のタンパク発現と負の相関を示した<sup>2</sup>。

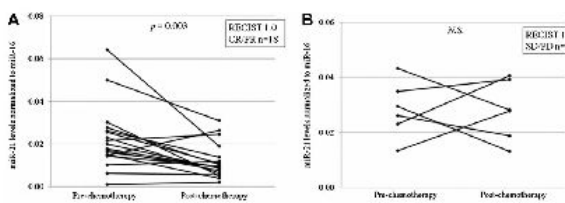
また、食道癌細胞株に pre-miR-223 を導入すると FBXW7 の発現が有意に低下し、一方、anti-miR-223 を導入すると FBXW7 の発現が有意に上昇することが示された<sup>2</sup>。

(3) 食道癌における RPN2 の発現は Docetaxel の感受性予測因子である

食道癌の術前生検組織の FFPE を用いて RPN2 の IHC を行い、RPN2 陽性群と陰性群で Docetaxel に対する治療効果を比較した。この結果、RPN2 陰性群では陽性群に比較して有意に治療効果が良好であることが明らかになった。RPN2 高発現の食道癌細胞株に siRNA を用いて RPN2 の発現を低下させると、Docetaxel に対する感受性が有意に改善することが示された<sup>3</sup>。



(4) 食道癌患者の血清における miR-21 の発現レベルは治療効果のバイオマーカーとなる  
食道癌患者と健常人の血清中の miR-21 の発現レベルを比較すると、食道癌患者において有意にその発現レベルが高いことが示された。また、DCF 療法を施行した食道癌症例の治療前と治療後の血清 miR-21 の発現の推移を検討すると、治療奏効例では miR-21 の発現が有意に低下するのに比べて、治療費奏効例では有意な低下が認められず、血清中の miR-21 の発現レベルは治療効果のバイオマーカーとなる可能性が示された<sup>4</sup>。



(5) 食道癌患者の血清から抽出した exosome 中の miR-21 発現レベルは健常者に比較して高値である。  
食道癌患者と健常者の血清から抽出した exosome 中の miR-21 の発現レベルを検討すると、食道癌患者において有意に高値であることが示された<sup>5</sup>。

<引用文献>

1. Watanabe M, et al. Outcomes of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil followed by esophagectomy in patients with resectable node-positive esophageal cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2014; 21:2838-44.
2. Kurashige J, Watanabe M, et al. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2012; 106:182-8.
3. Kurashige J, Watanabe M, et al. RPN2 expression predicts response to docetaxel in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2012; 107:1233-8.
4. Kurashige J, Watanabe M, et al. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*. 2012; 106:188-92.
5. Tanaka Y, Watanabe M, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013; 119:1159-67.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Kurashige J, Watanabe M, et al.: Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 106(1):182-8,

2012. DOI: 10.1038/bjc2012.396
2. Kurashige J, Watanabe M, et al.: Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **J Surg Oncol** 106(2):188-92, 2012. DOI: 10.1002/jso.23064
  3. Kurashige J, Watanabe M, et al.: RPN2 expression predicts response to docetaxel in oesophageal squamous cell carcinoma. **Br J Cancer** 107(8):1233-8, 2012. DOI: 10.1038/bjc.2012.396
  4. Tanaka Y, Watanabe M, et al.: Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer** 119(6):1159-67, 2013. DOI: 10.1002/cncr.27895
  5. Watanabe M, et al.: Outcomes of Preoperative Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and 5-Fluorouracil Followed by Esophagectomy in Patients with Resectable Node-Positive Esophageal Cancer. **Ann Surg Oncol** 21(9):2838-44, 2014. DOI: 10.1245/s10434-014-3684-8
  6. Sugihara H, Watanabe M, et al.: Identification of miR-30e\* regulation of Bmi1 expression mediated by tumor-associated macrophages in gastrointestinal cancer. **PLOS ONE** 8(11):e81839, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0081839
  7. Ishimoto T, Watanabe M, et al.: Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. **Carcinogenesis** 35(5):1003-11, 2014. DOI: 10.1093/carcin/bgt402
  8. Eto K, Watanabe M, et al.: The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab. **Ann Surg Oncol** 21(1):343-50, 2014. DOI: 10.1245/s10434-013-3325-7
  9. Yoshida N, Watanabe M, et al.: Influence of preoperative docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil on the incidence of complications after esophagectomy for resectable advanced esophageal cancer. **Dis Esophagus** 27(4):374-9, 2014. DOI: 10.1111/dote.12117
  10. Baba Y, Watanabe M, et al.: Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. **Surg Today** 44(10):1807-16, 2014. DOI: 10.1007/s00595-013-0763-6
  11. Baba Y, Watanabe M, et al.: Neoadjuvant treatment for esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastrointest Oncol** 6(5):121-8, 2014. DOI: 10.4251/wjgo.v6.i5.121
  12. Ida S, Watanabe M, et al.: Changes in Body Composition Secondary to Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Esophageal Cancer are Related to the Occurrence of Postoperative Complications After

- Esophagectomy. **Ann Surg Oncol** 21(11):3675-9, 2014. DOI: 10.1245/s10434-014-3737-z
13. Ishimoto T, Watanabe M, et al. Chronic inflammation with helicobacter pylori-infectionis implicated in CD44 overexpression through miR-328 suppression in the gastric mucosa. **J Gastroenterol** 2015; 50: 751-757. DOI: 10.1007/s00535-014-1019-y
  14. Eto K, Watanabe M, et al: The sensitivity of gastric cancer to trastuzumab is regulated by the miR-223/FBXW7 pathway. **Int J Cancer** 2015; 136: 1537-1545. DOI: 10.1002/ijc.29168
  15. Watanabe M, et al.. Salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for patients with esophageal squamous cell carcinoma: Who really benefits from this high-risk surgery? **Ann Surg Oncol** 2015; 22: 4438-4444. DOI: 10.1245/s10434-015-4556-6
  16. Harada K, Watanabe M, et al: Suppressor microRNA-145 is epigenetically regulated by promoter hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2015; 35: 4617-4624. DOI: なし
  17. Sugihara H, Watanabe M, et al: Noncoding RNA expression aberration is associated with cancer progression and is a potential biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Mol Sci** 2015; 16: 27824-27834. DOI: 10.3390/ijms161126060
- [学会発表] (計 14 件)
1. 藏重淳二、渡邊雅之、他. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2012. (2012 年 4 月 2 日~3 日、シカゴ).
  2. 田中洋平、渡邊雅之、他. The expression of exosomal microRNA-21 in serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2012. (2012 年 4 月 2 日~3 日、シカゴ).
  3. 藏重淳二、渡邊雅之、他. 食道扁平上皮癌において microRNA-223 は癌抑制遺伝子ユビキチンリガーゼ複合体基質ユニット FBXW7 の発現を抑制する. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 (2012 年 4 月 12 日~14 日、千葉).
  4. 田中洋平、渡邊雅之、他. 食道癌患者と非癌患者の血清中に存在するエキソソームの microRNA 発現の比較検討. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 (2012 年 4 月 12 日~14 日、千葉).
  5. 田中洋平、渡邊雅之、他. 食道癌患者と非癌患者の血清中に存在するエキソソームの microRNA 発現の比較検討. 第 67 回日本消化器外科学会総会 (2012 年 6 月 18 日~20 日、富山).
  6. 田中洋平、渡邊雅之、他. 食道癌における血清エキソソーム中の microRNA 発現の検討~biomarker としての意義. 第 50 回日本癌治療学会学術集会 (2012 年 10 月 25 日~27 日、神奈川).

7. 渡邊雅之、他. 食道癌に対する術前 DCF 療法の有用性と今後の展望. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013 年 4 月 11 日~13 日、福岡).
8. 石本崇胤、渡邊雅之、他. 消化器癌における microRNA を介した CD44 発現制御の解明. 第 51 回日本癌治療学会学術集会 (2013 年 10 月 24 日~26 日、京都).
9. 馬場祥史、渡邊雅之、他. 食道癌に対する術前 DCF 療法の効果予測 1 コース後の PET SUV 値を用いて. 第 68 回日本食道学会学術集会 (2014 年 7 月 3 日~4 日、東京)
10. 渡邊雅之、他. 安全性と根治性からみた食道癌に対するサルベージ手術の適応. JDDW2014 (2014 年 10 月 23 日~26 日、神戸)
11. 渡邊雅之、他. 局所進行 Near T4 食道癌に対する集学的治療と食道切除の意義. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 (2015 年 4 月 16 日~18 日、愛知).
12. 吉田直矢、渡邊雅之、他. Near T4 食道癌に対する化学放射線療法および手術の治療成績. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 (2015 年 4 月 16 日~18 日、愛知)
13. 吉田直矢、渡邊雅之、他. 食道癌に対する術前補助化学療法無効例の背景と術後合併症に及ぼす影響に関する検討. 第 69 回日本食道学会学術集会 (2015 年 7 月 2 日~3 日、神奈川).
14. 志垣博信、渡邊雅之、他. 化学療法により CT-pStage I となった胸部食道辺エピ上皮癌の成績. 第 69 回日本食道学会学術集会 (2015 年 7 月 2 日~3 日、神奈川)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)  
 公益財団法人がん研究会・有明病院・食道外科・部長  
 研究者番号：24591950

### (2) 研究分担者

石本 崇胤 (ISHIMOTO, Takatsugu)  
 熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教  
 研究者番号：00594889  
 馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)  
 熊本大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：20599708

### (3) 研究協力者

藏重 淳二 (KURASHIGE, Junji)  
 田中 洋平 (TANAKA, Yohei)  
 志垣 博信 (SHIGAKI, Hironobu)  
 江藤 弘二郎 (ETO, Kojiro)  
 原田 和人 (HARADA, Kazuto)