様　式　C−１９、F−１９、Z−１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号： ２４３０３
研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2012～2014
課題番号： ２４７９１４４１

研究課題名（和文） ゲノム構造解析による食道癌の新規癌関連遺伝子の同定と臨床応用

研究課題名（英文） Identification of novel oncogenes, as targets for amplification in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者
小松　周平（Komatsu, Shuhei）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：４０５７８９７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：癌の発生と進展の過程には多くの遺伝子異常が認められる。申請者らは、申請者らは43種類の食道扁平上皮癌細胞株に対してアジレント244KオリゴアレイCGH解析を行い、既知の増幅・欠失領域の再評価を行った。（Komatsu S. et al. Carcinogenesis 2009）。本研究は、食道扁平上皮癌株の1q増幅領域に坐位し、高発現するＤTL，TMEM206遺伝子について、①食道癌臨床検体を用いたDTL，TMEM206の蛋白発現解析による予後、悪性度に対する評価、②発癌、悪性度に関するDTL、TMEM206分子機構の解明、臨床応用技術の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Recent progress in the human genome project prompted us to re-evaluate additional target genes in cancers. In this study, we tested whether DTL and TMEM206, located at previously reported 1q32-q41 amplicon, acts as a cancer-promoting gene in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC. Overexpression of DTL and/or TMEM206 protein was frequently detected in primary ESCCs, and significantly correlated with the status of recurrence. Patients with DTL and/or TMEM206-overexpressing tumors had a worse overall survival than those with non-expressing tumors, and DTL and/or TMEM206 was independent prognosticator in the multivariate analysis. Knockdown of DTL or TMEM206 inhibited and ectopic overexpression of DTL and/or TMEM206 promoted the growth of ESCC cells. These findings suggest that DTL and TMEM206 plays an important role in tumor cell growth, and highlight its usefulness as a prognosticator and potential therapeutic target in ESCC.

研究分野： 食道外科学

キーワード： 増幅遺伝子　癌遺伝子　食道癌　胃癌　遊離核酸　予後因子　分子生物学　アレイCGH

1．研究開始当初の背景

食道癌は、極めて悪性度の高い難治性の癌であり、手術、化学放射線療法、抗癌剤治療等の集学的な治療が望まれる。申請者らは、43 種類の食道扁平上皮癌細胞株に対してアジレント 244K オリゴアレイ CGH 解析を行い、既知の増幅領域の再評価により新しい癌関連遺伝子 SMYD2 を同定した（Komatsu S. et al. Carcinogenesis 2009）。また微細なホモ欠失から新しい癌抑制遺伝子候補 PCDH17 を同定した（Haruki S, Komatsu S et al. Carcinogenesis 2010）。今回、1q 増幅領域に坐位し、食道扁平上皮癌で高頻度に高発現する新規の癌関連遺伝子 DTL, TMEM206 の解析をおこなった。

2．研究の目的

これまでの機能解析結果に基づき、詳細な分子機構の解明と他癌種を含めた予後予測分子、治療感受性予測分子、標的治療分子としての開発･臨床応用を目指す。

3．研究の方法

今回の申請では、食道癌の増幅領域に坐位する DTL, TMEM206 遺伝子に対して①食道癌臨床検体を用いた蛋白発現解析による予後、悪性度に対する評価、②発癌、悪性度に関する分子機構の更なる解明（下流分子、標的分子の同定）、③化学療法、化学放射線療法の感受性予測や耐性作用の解明、④遺伝子発現の診断マーカーとしての応用、⑤血中遊離 DNA の遺伝子コピー数の定量による血液･体腔液診断、早期診断への応用、⑥他臓器癌における発現亢進による腫瘍の増殖･悪性度への関与の評価、を研究計画として研究を進めた。

4．研究成果

①に関して、国立がん研究センター(現 防衛医科大学病態病理学教授）津田 均博士のもと、食道癌臨床検体を用いた蛋白発現解析による予後、悪性度に対する評価を行った。TMEM206 遺伝子に関しては、高発現症例で中･低分化型、静脈浸潤、再発の頻度が有意に高く、全生存期間、無再発生存期間ともに有意に短く、予後不良であった。多変量解析でも独立した予後因子であった。②の機能解析として、TMEM206 遺伝子は、アジレント 244K_CGH アレイで KYSE150 株の 1q 増幅領域に存在することを明らかにした。FISH 解析でも RP11-384C4 b バクテリアル染色（BAC)を用いて Homogenous staining region (HSR)を KYSE150 株で確認した。mRNA の発現解析で、食道扁平上皮癌細胞株 43 株（KYSE、TE シリーズ）で 60.4%(26/43）に過剰発現を認めた。高発現株 KYSE150 を TMEM206 特異的 siRNA によりノックダウンをしたところ 72 時間でコントロールに比し、43%の著しい細胞増殖抑制を認めた。また、PARP を誘導した。また、FACS 解析で高発現株 1170 株では TMEM206 ノックダウンにより、G1-S アレストによる細胞周期停止を、KYSE590 では Sub-G1 の増加によりアポトーシスを認めた。低発現株の KYSE510、KYSE200 に pCMV-3tag4A 発現プラスミドを用いて発現ベクターを導入し遺伝子を過剰発現させてコロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、コントロールに比し有意にコロニー形成を認めた。③の抗がん剤耐性との機序との関連は現在も解析中である。④⑤に関しては、血中での遊離 DNA の予後･診断のバイオマーカーとしての意義を示すように試みたが、同じ増幅領域の SMYD2 は示せたが、DTL や TMEM206 遺伝子については現在まで示せていない。⑥に関しては、DTL 遺伝子についても他癌種の胃癌での分子機構と臨床的意義を示すことができ、英文誌に現在投稿中である（Kobayashi H, Komatsu S. Oncotarget in press)。同じ 1q 増幅遺伝子である SMYD2 遺伝子については、胃癌での分子機構と臨床的意義を英文誌に報告した（Komatsu S. et al. Br J Cancer 2015）。以上、1q 増幅領域の遺伝子に関しては今後も解析に内外の学会、英文誌に報告の予定である。

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 13 件）

1. Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Kawaguchi T, Morimura R, Hirajima S, Okajima W, Ohashi T, Imamura T, Konishi H, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Taniguchi H, Otsuji E. Malignant potential in pancreatic neoplasm; new insights provided by circulating miR-223 in plasma. Expert Opin Biol Ther. 2015 Jun;15(6):773-85.（査読あり）
2. Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Nagata H, Nishimura Y, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E. Overexpression of SMYD2 contributes to malignant outcome in gastric cancer. Br J Cancer. 2015 Jan 20;112(2):357-64.（査読あり）
3. Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Arita T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Yagi N, Otsuji E. Plasma microRNA profiles: identification of miR-25 as a novel diagnostic and monitoring biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2014 Oct 14;111(8):1614-24.（査読あり）
4. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Morimura R, Hirajima S, Tsujiura M, Kawaguchi T, Miyamae M, Nagata H, Konishi H, Shiozaki A, Otsuji E. Circulating miR-18a: a sensitive cancer screening biomarker in human cancer. In Vivo. 2014 May-Jun;28(3):293-7. Review.（査読あり）
5. Tsujiura M, Komatsu S, Ichikawa D, Shiozaki A, Konishi H, Takeshita H, Moriumura R, Nagata H, Kawaguchi T, Hirajima S, Arita T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating miR-18a in plasma contributes to cancer detection and monitoring in patients with gastric cancer. Gastric Cancer. 2015 Apr;18(2):271-9.（査読あり）
6. Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Takeshita H, Shiozaki A, Fujiwara H, Kawaguchi T, Miyamae M, Konishi H, Kubota T, Okamoto K, Yagi N, Otsuji E. Clinical impact of predicting CCND1 amplification using plasma DNA in superficial esophageal squamous cell carcinoma. Dig Dis Sci. 2014 Jun;59(6):1152-9.（査読あり）
7. Nishimura Y, Komatsu S, Ichikawa D, Nagata H, Hirajima S, Takeshita H, Kawaguchi T, Arita T, Konishi H, Kashimoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Otsuji E. Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. Br J Cancer. 2013 Apr 2;108(6):1324-31.（査読あり）
8. Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, Morimura R, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Arita T, Hirajima S, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. Br J Cancer. 2013 Feb 5;108(2):361-9.（査読あり）
9. Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Konishi H, Shiozaki A, Morimura R, Tsujiura M, Nagata H, Kawaguchi T, Arita T, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Clinical impact of circulating miR-18a in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2013 May 14;108(9):1822-9.（査読あり）

10. Komatsu S, Ichikawa D, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Kawaguchi T, Hirajima S, Arita T, Shiozaki A, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Prognostic impact of circulating miR-21 in the plasma of patients with gastric carcinoma. Anticancer Res. 2013 Jan;33(1):271-6.（査読あり）
11. Kashimoto K, Komatsu S, Ichikawa D, Arita T, Konishi H, Nagata H, Takeshita H, Nishimura Y, Hirajima S, Kawaguchi T, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Otsuji E. Overexpression of TRIM44 contributes to malignant outcome in gastric carcinoma. Cancer Sci. 2012 Nov;103(11):2021-6.（査読あり）
12. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Konishi H, Nagata H, Hirajima S, Kawaguchi T, Arita T, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. Expert Opin Biol Ther. 2012 Jun;12 Suppl 1:S53-9.（査読あり）
13. Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, Otsuji E. Circulating microRNA in digestive tract cancers. Gastroenterology. 2012 May;142(5):1074-1078. （査読あり）

〔学会発表〕（計 10 件）

1. 血漿遊離 microRNA の網羅的発現解析に基づく食道癌術前化学療法の効果予測法の開発　小松 周平　日本癌学会総会 (2014.09.25-27　横浜市)
2. 網羅的アレイ解析により同定した食道癌患者血漿中遊離 microRNA-25 の有用性　小松 周平　日本癌学会総会 (2013.10.3-5　横浜市)
3. 消化器癌個別化治療に向けた次世代への試み 消化器癌血漿中遊離 microRNA を指標とした次世代個別化バイオマーカーの探索と展望　小松 周平　日本消化器外科学会総会 (2013.07.17-19　宮崎市)
4. 胃癌における新規癌関連遺伝子 DTL の癌化機構の解明と臨床応用　小林 博喜, 小松 周平　日本胃癌学会総会 (2014.03.20-22　横浜市)
5. 胃癌における新規癌関連遺伝子 YWHAZ の癌化機構の解明　西村 幸寿, 小松 周平　日本外科学会 (2014.04.3-5　京都市)
6. 胃癌における新規癌関連遺伝子 DTL の癌化機構の解明と臨床応用　小林 博喜, 小松 周平　日本外科学会 (2014.04.3-5　京都市)
7. 網羅的アレイ解析による食道癌患者血漿中遊離 microRNA を指標とした次世代抗癌剤感受性バイオマーカーの探索　小松 周平　日本外科学会 (2014.04.3-5　京都市)
8. 増幅遺伝子を指標とした食道癌血中遊離 DNA における新規バイオマーカーの探索　小松 周平　日本食道学会学術集会 (2013.06.13-14　大阪市)
9. 癌抑制 miR-375 の標的癌関連遺伝子 YWHAZ を用いた胃癌の臨床応用　西村 幸寿, 小松 周平　日本消化器外科学会総会 (2012.07.18-20　富山市)
10. 胃癌における新規癌関連遺伝子 TRIM44 遺伝子の発現意義と臨床応用　柏本 錦吾, 小松 周平　日本消化器外科学会総会 (2012.07.18-20　富山市)

〔図書〕（計 1 件）

【最新胃癌学-基礎と臨床の最新研究動向-】
胃癌の検査･診断　バイオマーカー　miRNA　小松 周平(京都府立医科大学 消化器外科) 日本臨床(0047-1852)72 巻増刊 1 最新胃癌学 Page333-337(2014.01)

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
　小松　周平（Komatsu Shuhei）
　京都府立医大学・医学研究科・助教
　研究者番号：40578978

(2)研究分担者
　該当なし