

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461987

研究課題名(和文)食道癌におけるmicroRNAの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of microRNA 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・准教授

研究者番号：10363920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前の発表論文においては、miR-23a、miR27b、miR96、miR128b、miR129が予後に関与していると発表し、miR34bが正常部で発現しておらず、癌部での発現が高かった。miR34bのターゲットはDLL1、NOTCH1であり、miR27bのターゲットのひとつがNOTCH1であることから、NOTCH1に着目し、食道癌におけるNOTCH1 pathwayの関わりを解析した。NOTCH1抗体を用いた免疫組織染色では、NOTCH1が核に染色された症例では、予後不良の傾向があり、NOTCHシグナルが重要であると認識した。

研究成果の概要(英文)：We reported in our previous paper that miR-23a, miR27b, miR96, miR128b and miR129 are involved in the prognosis of esophageal cancer patients. Especially, miR34b didn't express in the normal tissue, and had high expression in the cancerous tissue. Because the target genes of miR34b were DLL1 and NOTCH1, and one of a target of miR27b was NOTCH1, we analyzed NOTCH1 pathway in esophageal cancer. We recognized that nuclear expression of NOTCH1 was involved in the poor prognosis of esophageal cancer patients. Therefore, NOTCH signal was important in the esophageal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：microRNA 食道癌

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌の治療成績、予後改善のためにその発癌メカニズムの詳細を解明することは不可欠である。特に手術療法単独では、その予後成績向上には限界がみられているため、抗癌剤療法、放射線治療など集学的治療をおこなって、治療成績をあげることを試みている。しかしながら劇的に予後を改善するには至っていない。

近年の microRNA 研究の進歩により、すでにヒトで1,000種類以上の microRNA が同定されている。microRNA は 21-24 塩基で構成される small RNA であり、主に遺伝子の発現調節を行う。ターゲット遺伝子は、100-500 程度あると予想され、ターゲットとなる遺伝子の機能に応じて、oncomir や tumor suppressor としての機能を果たしていると考えられている。インターネット上では、予想スコアをもとにコンピューターによるターゲット遺伝子の割り出しが可能である。

我々の教室では以前から、食道癌と microRNA の解析について取り組んできており、processing に関わる分子の解析、食道癌での発現プロファイル、それらをもとにした miR34b の解析、miR21 の解析で、論文発表をしてきた。特に miR34b は他臓器では tumor suppressor として機能するが、食道癌では oncomir として機能することを発表し、臓器によって機能の異なることを証明した。他臓器癌で詳しく解析されていても、amplification や LOH の状態、もしくはターゲット遺伝子の変異の有無などで、臓器別に機能が異なることと推測している。つまり、他癌で重要な microRNA でも、食道癌にとっても同様のことが起こるとは限らないため、食道癌におけるひとつひとつの microRNA の解析が必要とされることが明らかにした。

ただし、当時の問題点として、まだソフトによる microRNA のターゲット予測が不十分で、予想スコアをもとにタンパク解析を行うも、ほとんど関連しないことも多く、その後の機能解析が進まなかった事情がある。現在は、miRDB や miRecords、PicTar、TargetScan など優秀なオンラインソフトが充実しており、ターゲットの予想も容易になっている。そのため、以前解析を途中で終えた microRNA に関してももう一度ターゲット遺伝子を予想しなおし、再度解析を行いたい。

また我々は、以前より食道癌と Wnt シグナルおよび Notch シグナルパスウェイの関わりについても研究を進めてきた。Wnt シ

グナルの下流遺伝子、あるいは NOTCH 1 の発現が食道癌の予後に関わることを報告してきた。これらのパスウェイにも、microRNA は密接にかかわっていることが予想されている。Preliminary な data ではあるが、NOTCH1 のリガンドである DLL 1 は miRNA34b に制御されており、DLL 1 の発現は食道癌の予後不良因子のひとつであった。こういった重要なパスウェイにも深く関わる microRNA を同定し、従来の我々が発表してきた遺伝子発現のデータなどとも照合せながら、食道癌メカニズムの理解を深めなければならないと考える。

## 2. 研究の目的

この研究の最終目的は、すでにスクリーニングしてある microRNA からさらに重要な microRNA を探し出し、それについて解析し、診断、治療に用いることを最終目標とする。多くの癌腫で重要視されているメカニズム (Wnt シグナル伝達系や NOTCH シグナル伝達系) に関与する microRNA も解析に加えたいと考えているため、食道癌のみならず、大腸癌、胃癌、肝癌などにも臨床応用可能な分子標的薬剤の創薬、および診断・治療への応用への道が開けると思われる。

## 3. 研究の方法

研究計画の骨格となるのは次の5点である。

- (1) 食道癌臨床検体および細胞株における oncomir の同定。
- (2) 予後に関与する microRNA の解析
- (3) 同定した Oncomir の機能解析、ターゲットタンパクの発現解析
- (4) 食道癌臨床検体および細胞株における tumor suppressor microRNA の同定。
- (5) Wnt シグナル、NOTCH シグナルに関与する microRNA の解析

- (1) 食道癌臨床検体および細胞株における oncomir の同定。

我々の発表論文において、microRNA の発現プロファイルで 73 種類の microRNA において食道癌における発現パターンを 30 症例について解析した。

これまでに最も発現が高かった miR34b、他の癌でよく解析されていた miR21 については、さらに症例数を増やして検討した。癌部で発現が亢進している microRNA は oncomir の可能性があり、症例数を 150 例程度まで増やし、癌部と非癌部の発現について検討する。

それらの microRNA について、臨床病理

学的因子と比較し、スクリーニングで発表してきた候補 microRNA をより臨床において重要なものとしてリストアップする。

さらに臨床検体で、統計学的に有意差をもって癌部で発現亢進していた microRNA に関しては、食道癌細胞株 TE シリーズ、KYSE シリーズについても RTPCR で発現を確認しておく。

#### (2) 予後に関する microRNA の解析

miR-23a、miR-26a、miR-27b、miR-96、miR-128b、miR-129 は予後に関与するとあげられた microRNA である。もっとも治療の対象となると考えられる。

まずは、これら microRNA の発現の亢進が予後不良因子であるため、それぞれの microRNA inhibitor を用い、細胞株に導入し発現抑制を行う。そのうえで MTT アッセイを行い、増殖抑制効果を見る。また症例数も 150 例まで増加し、予後との相関を解析する。特に miR129 は 30 例の解析で独立した予後不良因子であったため、最も重要視して解析を予定。

#### (3) 同定した Oncomir の機能解析、ターゲットタンパクの発現解析

(2) で行う予後に関する microRNA の機能解析は、ほぼ手技が同じため、1 で同定した oncomir 候補の解析と並行して行いたい。候補 microRNA についても、inhibitor を用いて発現を抑制し、MTT アッセイにて細胞増殖抑制効果を解析する。

さらに、2, 3 で細胞増殖抑制効果の得られた、microRNA に関しては、miRDB や miRecords、PicTar、TargetScan といった、オンライン上でスコア化されたターゲットで共通にあがってくる遺伝子リストを作成する。

また T 因子、N 因子に関する microRNA に関しては、発現を抑制することによって、cell invasion assay や、癌細胞の遊走の低下などの検討を行いたい。

#### (4) 食道癌臨床検体および細胞株における tumor suppressor microRNA の同定。

本研究期間ではまず oncomir について解析を完了したいと考えるが、逆に癌部で発現が低下し、microRNA を導入した細胞増殖が抑制される tumor suppressor microRNA は治療に用いることのできる microRNA として、oncomir 同様に解析不可避の対象である。基本的には、oncomir 同様、癌部で発現が低下していた microRNA を 150 症例に増加して検討を行い、その後細胞株での実験を行う。Oncomir と異なる

点は inhibitor の代わりに、microRNA をの precursor の状態で発現するベクターを導入し、細胞死誘導ができるか否かを解析する。

#### (5) Wnt シグナル、NOTCH シグナルに関する microRNA の解析

当科で今まで研究してきた Wnt シグナル、NOTCH シグナルに関する遺伝子はその発現に関しては、すでに以前の科研費などで解析しており、データはそろっている。たとえば NOTCH1 の高発現は予後不良であるが、NOTCH1 を制御する microRNA も miRDB などで簡単に検索できる。

NOTCH1 に関しては miR4468 や miR449b、miR34c などが Hit してくる。これらが、NOTCH1 発現に関与しているかあるいはその microRNA の発現低下が予後不良因子になっていないかなど、同様の手法で解析が可能であり、今までのデータとの比較検討を行いたい。

#### 4. 研究成果

##### (1) 食道癌臨床検体および細胞株における Oncomir の同定

臨床検体を用いた microRNA array を検討し、準備中であったが臨床検体の cDNA の作成は終了したが、quality にばらつきがあり、再度抽出、調整をし直した。quality check 済である。Array に関しては、再度データを取り直す意味で、array を検討したが、すでに RTPCR でもデータは得られており、個々の miR の解析を進めることも今後は並行して進めていく予定である。

##### (2) 予後に関する microRNA の解析

発表論文においては、miR-23a、miR27b、miR96、miR128b、miR129 が予後に関与していると発表し、miR34b が正常部で発現しておらず、癌部での発現が高かった。miR34b のターゲットは DLL1、NOTCH1 であり、miR27b のターゲットのひとつが NOTCH1 であることから、NOTCH1 に着目し、食道癌における NOTCH1 pathway の関わりを解析することにし、まずは免疫染色を行った。NOTCH1 抗体を用いた免疫組織染色では、NOTCH1 が核に染色される (Notch1 intracellular domain が核へ移行している) 症例では、予後不良の傾向があり、NOTCH シグナルが重要であると認識した。そこで、Notch1-intracellular domain を発現するベクターを作成し、食道癌に導入する実験を試みた。導入された細胞株は、ギムザ染色、MTT アッセイで細胞増殖を示し、増殖に関わることが示唆された。また食道癌

以外でも胃癌、大腸癌において今後は NOTCH1 の免疫染色をしたところ、核に移行する症例では、予後が不良であった。そこで NOTCH1 をターゲットとした解析、また NOTCH シグナル分子の解析も同時におこなっていく予定である。またそれぞれ予後に関わる miR の inhibitor も準備中であったが、導入に至ってはいない。来年度よりさらに計画を進めていく予定である。

## 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 6 件)

Ishiguro H, Wakasugi T, Terashita Y, Sakamoto N, Tanaka T, Sagawa H, Okubo T, Takeyama H. Nuclear expression of TCF4/TCF7L2 is correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cell Mol Biol Lett. 2016 Jul 28;21:5. DOI: 10.1186/s11658-016-0006-0. eCollection 2016. peer reviewed,

Saito S, Ishiguro H, Kimura M, Ogawa R, Miyai H, Tanaka T, Mizoguchi K, Takeyama H. Clinical significance of NOTCH1 intracellular cytoplasmic domain translocation into the nucleus in gastric cancer. Biomed Rep. 2016 Sep;5(3):344-348. peer reviewed,

Ishiguro H, Wakasugi T, Terashita Y, Sakamoto N, Tanaka T, Mizoguchi K, Sagawa H, Okubo T, Takeyama H. Decreased expression of CDH1 or CTNNB1 affects poor prognosis of patients with esophageal cancer. World J Surg Oncol. 2016 Sep 6;14(1):240. DOI: 10.1186/s12957-016-0956-8. peer reviewed,

Ishiguro H, Kimura M, Takahashi H, Tanaka T, Mizoguchi K, Takeyama H. GADD45A expression is correlated with patient prognosis in esophageal cancer. Oncol Lett, peer reviewed, 11, 2016, 277-282  
DOI: 10.3892/ol.2015.3882 peer reviewed,

Sagawa H, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yamashita Y, Suzuki S, Sato S, Shiomi K, Kato A, Kuno T, Matsuo Y, Kimura M, Takeyama H, Takahashi S. Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development

and its related hepatocarcinogenesis in rats. Carcinogenesis, peer reviewed, 36, 2015, 1539-1549

DOI: 10.1093/carcin/bgv143 peer reviewed,

Mizoguchi K, Ishiguro H, Kimura M, Takahashi H, Sakamoto N, Tanaka T, Takeyama H. Induction of apoptosis by eicosapentaenoic Acid in esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res, 34, 2014, 7145-7150 peer reviewed,

〔学会発表〕(計 3 件)

田中達也、木村昌弘、石黒秀行、溝口公土、竹山廣光、食道癌におけるコネキシン 43 の発現の意義、第 69 回日本食道学会学術集会、2015 年 7 月 2-3 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

石黒秀行、木村昌弘、佐藤幹則、松尾洋一、高橋広城、原賢康、小川了、田中達也、溝口公土、竹山廣光、大腸癌において NOTCH1 がベータカテニン核移行に関与する、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 16-18 日、郡山市民文化センター(福島県・郡山市)

溝口公土、石黒秀行、木村昌弘、小川了、田中達也、竹山廣光、食道癌の増殖能に対するエイコサペンタエン酸(EPA)が及ぼす影響、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 16-18 日、郡山市民文化センター(福島県・郡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

## 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・准教授  
研究者番号：10363920

### (2)研究分担者

木村 昌弘 (KIMURA, Masahiro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10363920

溝口 公士 (MIZOGUCHI, Koji)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50722659  
(平成28年度より研究分担者から削除)