

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461996

研究課題名(和文) miRNAを標的とした食道癌幹細胞の治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapy for cancer stem cell targeting miRNA in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

福田 和正 (Fukuda, Kazumasa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師

研究者番号：50348786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道癌幹細胞様クローンや癌患者血中におけるmiRNAの発現変動や機能について検討を行った。食道癌治療薬剤であるドセタキセルの薬剤抵抗性について67個のmiRNAの発現変動が確認され、データベース解析及び機能解析の結果miR-125a-5pの関与が示唆された。また、リンパ節転移について血清中におけるmiRNA網羅的発現変動を3D-Geneシステムにより解析を行った結果、33個のmiRNAが有意に発現変動を示した。このmiRNAの発現変動よりターゲット遺伝子群を解析した結果、細胞増殖や細胞外マトリックスの制御に関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated miRNA expression profile and function in CSC-like clones and serum derived from esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patients. The result exhibited common 67 miRNAs differentially expressed between CSC-like clones and their parent cell lines. The genes predicted to be targets of candidate miRNAs were chosen and analyzed using the database of miRNA.org site. miR-125a-5p has important roles in docetaxel resistance by regulating protein expression of the ICIS gene. Analysis of comprehensive expression of miRNA in serum was performed using the 3D-Gene system. Between lymph node metastasis group and non-metastasis group, 33 miRNAs significantly showed expression fluctuation. These findings suggest that it may be helpful to develop novel strategies for targeted therapies in ESCC patients.

研究分野：分子生物学

キーワード：miRNA 食道癌

1. 研究開始当初の背景

ゲノムから転写される小さな RNA に注目が集まっている。次世代高速シーケンサー (NGS) が登場し、ポストゲノム時代の象徴ともいえる大規模転写解析 (トランスクリプトーム解析) が進められ、タンパク質の遺伝子配列をもたないノンコーディング領域から膨大な数の RNA (non-coding RNA: ncRNA) の転写が起きていることが明らかとなっている。ヒト全ゲノムの 98% は、ノンコーディング領域であり、タンパク質の設計図部分はわずか 2% ほどにすぎない。これまで特別な生理活性をもたないと考えられてきた ncRNA に遺伝子転写制御などの重要な機能が備わっていることが明らかになりつつある。ゲノムから転写される ncRNA の長さは、20 残基ほどの短いものから 200 残基長を超えるものまで様々である。これらの中で「機能性 RNA」として注目されているのがマイクロ RNA (microRNA: miRNA) と呼ばれる 18~25 残基長の ncRNA 集団である。miRNA は、small RNA 分子ファミリーの 1 つで、細胞内の遺伝子発現抑制 (遺伝子サイレンシング) を引き起こす、いわゆる RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 分子である (図 1)。われわれは、この miRNA のサイレンシング機能が癌細胞における細胞周期の静止期を制御していることに注目している。一方、研究対象である食道癌は、罹患率数・死亡者数ともに 7 番目に多いがんであり、国内において食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma: ESCC) が食道癌の 9 割以上を占める。ESCC は、近年の外科治療及び放射線化学療法の進歩にもかかわらず、高頻度に遠隔転移、再発を起こす悪性度の高いがんであり、いまだ

に有効な分子標的やバイオマーカーは見いだされていない。

近年、がん研究においては「がん幹細胞理論」が注目されている。「がん幹細胞」自体は非常に数が少なく、それ自体はほとんど増殖しない (冬眠状態 = 静止期)。しかし、その子孫である「がん細胞」は急速に増殖し、最終的に生命を脅かす。従来の抗がん剤や放射線療法は、この急速に増殖する「がん細胞」を一時的に殺すことができて、あまり増殖しない「がん幹細胞」にはほとんど効果が期待できない¹⁾。治療後に残存したがん幹細胞から再びがん細胞が生じ再発や転移を引き起こすと考えられるため、がんの根本的な治療にはなっていないことが示唆されている²⁻⁶⁾。つまり、がんを完全に治療するためには、このがん幹細胞を根本的に根絶する方法の開発が必要であり、がん幹細胞が静止期を制御しているメカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

次世代型高速シーケンサー (NGS) によるトランスクリプトーム解析によりノンコーディング領域 (non-coding) から膨大な RNA の転写が起きていることが明らかとなっている。近年、18~25 残基長の ncRNA である microRNA (miRNA) が、機能性 RNA として遺伝子発現を制御しているが注目されている。本研究では、これまで当教室で食道癌幹細胞の候補として同定されている細胞集団について **(1) 高性能リアルタイム PCR システムによる microRNA (miRNA) の網羅的発現解析及び同定、(2) 食道癌幹細胞における細胞静止活動等に関する miRNA の機能解析、(3) IPA**

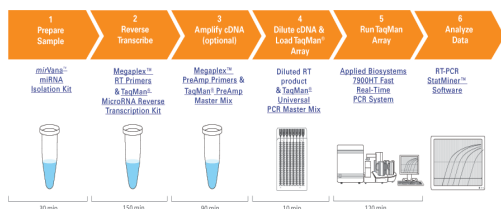
による分子間ネットワーク解析, (4) 臨床検体(組織, 細胞, 血液)における発現と miRNA 内包型エクソソーム検出法および病勢との相関性の評価を目的とする.

3. 研究の方法

(1) 高性能リアルタイム PCR システムによる microRNA(miRNA)の網羅的発現解析及び同定

・対象サンプル: 食道扁平上皮癌細胞株由来癌幹細胞、食道癌臨床検体

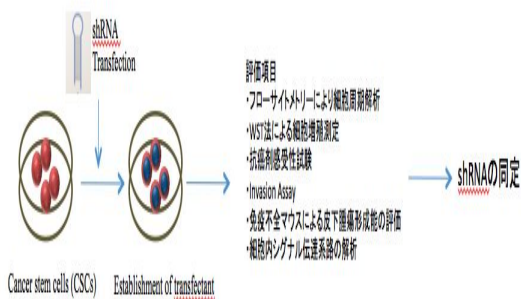
・Array Card: TaqMan Array Human MicroRNA Card Type A ver.2 and Type B ver.3



(2) IPA による分子間ネットワーク/パスウェイ解析

microRNA データセットの生物学的解釈を microRNA-mRNA のペアリングツールと mRNA のフィルタリングツールで実現する.

TargetScan/TarBase 論文よりキュレートされた知見から, microRNA の mRNA ターゲットを予測. ②microRNA と mRNA の発現値のペアリング, フィルタリングをすることで相互作用のある可能性の高い mRNA-microRNA の組合せを検出. ターゲットとしての mRNA を, 生物種, 疾病, 組織, パスウェイ, 細胞株などでフィルタリング.



(3) 細胞生理活性を制御する miRNA の機能解析

miRNA の網羅的解析及び IPA システムによる分子間相互作用の解析結果より食道癌幹細胞の細胞周期静止機能, 薬剤抵抗性機能, 造腫瘍性機能, EMT 機能に関する miRNA を同定する.

(4) 臨床検体(組織, 細胞, 血液)における発現と病勢との相関性の評価

同定された miRNA 検出プローブにより臨床検体における発現を定量化し, 背景因子との統計解析を IBM SPSS Statistics 解析ソフトにより検証する.

4. 研究成果

(1) 誘導性食道癌幹細胞様クローンにおける miRNA の発現解析

食道扁平上皮癌細胞株 (TE1, TE4, TE8, TE10, TE11, TE15) を用いて薬剤誘導法により癌幹細胞様クローンを誘導させた. miRNA を抽出し cDNA 合成を経て, TaqMan® array system により miRNA の網羅的解析を施行した. ExpressionSuite Software v1.0 により解析を行った結果, 親株と誘導性食道癌幹細胞様クローンにおいて miRNA の発現変動が共通しているものが 67 個検出された(図 1). この

変動 miRNA 群に基づき miRBase データベースを使用し mirSVR score を用いて標的 mRNA 遺伝子の検索を施行した。また、パスウェイ解析ソフト Reactome を使用しターゲット遺伝子セットに関する pathway の検索を施行した。その結果、extracellular matrix organization signaling pathway が活性化して示唆された。

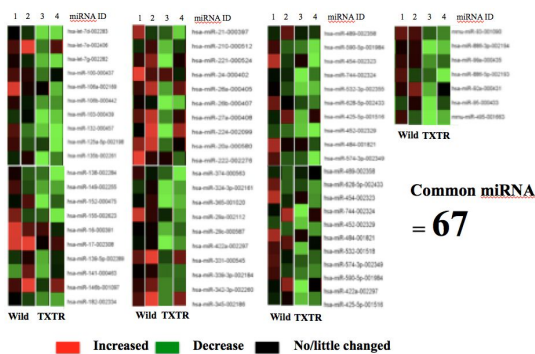


図 1 発現変動 miRNA の Heatmap

(2) miRNA の細胞機能解析

食道癌治療におけるキードラックであるドセタキセルを用いた薬剤誘導法により樹立した誘導性食道癌幹細胞様クローンについて、薬剤抵抗性に関連する miRNA の同定及び機能解析を行った。ドセタキセルの作用機序は、細胞内微小管の脱重合阻害による細胞分裂の抑制である。細胞内において張力発生分子モーターである mitotic centromere-associated kinesin (*MCAK*)とその活性化因子 inner centromere Kinl stimulator (*ICIS*)が微小管の脱重合に重要な役割を担っている。網羅的解析より得られた変動 miRNA のプロファイルをもとに、データベース検索及び PCR 法により標的分子 *ICIS/MCAK* との発現の相関について検証した結果、*miR-125a-5p* の発現変動との相関性が確認された。これらの結果を検証するため、

miR-125a-5p 分子の mimic 及び inhibitor を野生株にそれぞれ導入し発現調整を行った。その結果、*miR-125a-5p* の発現抑制株では、mimic 導入株に比べ *ICIS* 及び *MCAK* 分子の発現上昇が確認された。また、*miR-125a-5p* 発現抑制株を用いてドセタキセルに対する薬剤抵抗性を apoptosis assay により評価を行った。その結果、*miR-125a-5p* の発現抑制株において有意なアポトーシス抵抗性が示された。以上の結果より、癌幹細胞のドセタキセルに対する抵抗性において *miR-125a-5p* 発現変動が関与していることが示唆された。

(3) 臨床検体における発現と病勢との相関性の評価

これまでの研究により癌の転移において、癌幹細胞の関与が示唆されている。更に、癌細胞より分泌された循環型 miRNA が転移先の微笑環境の形成に関与しているとの報告がある。本研究では、リンパ節転移を有する食道癌患者由来血清よりエキソソーム内包循環型 miRNA を抽出し、3D-Gene システムによる miRNA の網羅的発現変動解析を施行した。Chip に搭載されている 2,000 個のプロープとの反応より検出された miRNA についてコントロール群（非リンパ節転移）を対象とした発現変動解析を施行した。

機能性 RNA である microRNA(miRNA)は、mRNA の 3' 末端非翻訳領域に配列相補的に結合することによりその遺伝子の発現を調節しており、癌幹細胞において miRNA によりその特性である薬剤耐性や浸潤・転移が制御されていることが示唆されている。我々は、今年度の研究課題である**食道癌患者血清中における miRNA の網羅的発現変動解析につい**

て東レの 3D-Gene システム(搭載されている miRNA 検出用オリゴ DNA プローブ数は 2,565 個)を用いて解析を行った。リンパ節転移のない群に対し、リンパ節転移がある群(術前化学療法後再発例含む)では、33 個の miRNA (miR-4433b-3p, miR-4513, miR-4717-3p, miR-4726-5p, miR-4728-5p, miR-4731-3p, miR-6499-5p, miR-6511a-3p, miR-6511b-3p, miR-6721-5p, miR-6737-5p, miR-6742-5p, miR-6819-5p, miR-6827-5p, miR-6877-3p, miR-708-5p, miR-125b-1-3p, miR-1273a, miR-1285-3p, miR-138-1-3p, miR-1825, miR-2467-3p, miR-3127-5p, miR-3180-5p, miR-3194-5p, miR-320d, miR-3619-3p, miR-3689d, miR-4281, miR-4433-3p, miR-7106-5p, miR-718, miR-887-5p) が有意に発現変動を示した。この miRNA の発現変動より、ターゲット遺伝子群を解析した結果、細胞増殖や基底膜や細胞外マトリックスの調節に関連することが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 和正 (Kazumasa Fukuda)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：50348786

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()