

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19390356

研究課題名(和文) 食道癌細胞および正常食道上皮細胞における機能性リボ核酸の発現と機能解析

研究課題名(英文) The expression and function of microRNA in esophageal cancer cells and normal esophageal epithelial cells

研究代表者：嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：30216072

## 研究成果の概要：

正常食道上皮で発現が見られない Polo-like kinase 1 (PLK1)が食道扁平上皮癌細胞株 11 株で発現しており、この PLK1 をターゲットとする miR-593\*を同定した。一方、Barrett 腺癌では miR-106b-25 クラスターが高発現しており、miRs -93 と -106b のターゲットは p21 で、miR-25 のターゲットは Bim と考えられた。以上の事から食道扁平上皮癌では miR-593\*が、腺癌では miR-106b-25 クラスターが食道癌における有力な分子標的となりうるものと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道外科、食道癌、正常食道上皮、miRNA、PLK-1、miR-593\*、miR-106b-25 polycistron

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌の治療成績は拡大郭清の導入、周術期管理の向上、集学的治療により向上してきているが、いまだ不十分で、現行の治療手段とは異なった治療方法の工夫が必要である。その為には食道癌の悪性化機構の解明が不可欠であり、我々は独自に樹立した食道癌細胞 50 株 (Shimada Y et al. Cancer1992) と正常食道上皮細胞株 8 株により食道癌の発癌、増殖、転移、浸潤のメカニズム解析を行

い、同定したいくつかの分子標的は siRNA によるノックダウンによりその制御が可能であることを明らかとしてきた。さらに患者個別化治療のために、従来のマイクロアレイチップの数百倍高感度の次世代チップを作成し (Nagino K et al. J Biochemistry 2006)、網羅的遺伝子発現解析による癌診断、リンパ節転移診断を行い、現在マイクロアレイによる化学放射線感受性予測の共同研究をおこなっている。これらの研究過程で、食道癌患

者の分子生物学的背景が我々の予測以上に多様であることが判明してきた。その多様化の一因として近年、機能性リボ核酸（以下、機能性 RNA）が注目されている。機能性 RNA として non coding RNA や micro RNA が知られ、幹細胞の再生、分化で注目されているが、個体差への関与、さらには癌における発癌増殖進展や薬剤感受性にも幅広く関与していることが明らかとされつつある。しかしながら消化器癌、特に食道癌では機能性 RNA の代表である micro RNA の発現や機能解析は国内外を含めて全く行われておらず、食道癌における機能性 RNA の役割は不明である。本研究では食道癌および食道正常上皮において特異的に発現している機能性 RNA（以下、micro RNA）の同定とその機能解析を行うことにより、新たな食道癌の個性化診断および分子標的治療に役立てることを目的とした。

## 2. 研究の目的

(1) 食道癌細胞において特異的に発現している micro RNA を同定し、その機能解析を行い、標的遺伝子を明らかとしたい。

(2) 食道正常上皮および組織幹細胞候補において発現している micro RNA を同定し、再生・分化における micro RNA の役割を解析したい。

(3) 既に解析が終了しているマイクロアレイ解析と対比することにより遺伝子発現と対応する micro RNA を同定したい。

(4) 薬剤(5fu, CDDP, Docetaxel 投与により発現が変動する micro RNA を同定し、薬剤感受性への関与を解明したい。

(5) 31 種の食道癌細胞株の CGH アレイで、我々が既に明らかとしてきた染色体異常部に対応する micro RNA の同定と機能解析を行いたい。

(6) 同定した micro RNA における癌細胞の制御を行いたい。

(7) 同定した micro RNA および micro RNA マイクロアレイによる患者個性化を試みたい。

## 3. 研究の方法

(1) 食道癌細胞株と食道正常上皮における non coding RNA 発現の検討

①我々がこれまでに樹立してきた食道癌細胞株において普遍的に発現している micro RNA をマイクロアレイによる網羅的解析で抽出する。

②既知の micro RNA で癌の発癌進展、補助療法感受性に関係するとされている micro RNA の発現を real time RT-PCR にて micro RNA のマイクロアレイと平行して解析する。

③細胞株の検討と平行して切除組織による発現解析を進める

④薬剤感受性について CDDP, DTX, PTX,

5Fu に対する感受性株、抵抗性株を 27 種の KYSE 細胞株より選別出来ているのでこれらの感受性発現に關与する miRNA を同定する。

2) 同定された micro RNA の機能解析

①アレイ実験で抽出された micro RNA についてハイスループットの real time PCR (ABI TaqMan) やノーザンブロット法により特異的発現の確認、定量、経時測定を実施する。

②MTT assay にて増殖、flow cytometry にて細胞周期、western blot にて蛋白発現、トランスウエルおよびマトリゲルチャンパーによる転移浸潤能への関与を解析する。

③定量的ルシフェラーゼ assay により同定された micro RNA が実際に機能するかどうかを検討する。

④RNAi によるノックダウン実験や遺伝子導入、pre-mir miRNA precursor molecule および anti-mir miRNA inhibitor による発現解析を行い、in vitro レベルでの micro RNA の機能解析を行う。特に表現型が判明している細胞株において、表現型の変化に關与する micro RNA の同定を目指す。

⑤micro RNA の活性を変化させ、それに対応して変動する mRNA を我々の開発した高感度マイクロアレイで解析し、ターゲット遺伝子を抽出する。

⑥標的遺伝子が不明な micro RNA については標的遺伝子を推定するアルゴリズムにより同定を試みる。

⑦すでに癌細胞と正常細胞株間で発現差を検出した let-7b, mir125b, mir145, mir155, mir196b, についてより多くの細胞株で発現を検討し、増殖能、転移能、浸潤能、薬剤耐性などの観点から詳細に検討する。

## 4. 研究成果

(1) マイクロ RNA マイクロアレイの開発

マイクロ RNA の数は現在までにデータベースに登録されたヒト由来とヒトに感染するウイルス由来のものを合わせても 1000 個未満である。そこで、コントロールプローブを含めて、Duplicate でプローブを搭載した DNA チップを開発した。ラベル方法も、当初 total RNA 5ug から small RNA 分画を抽出してからラベルしていた方法を、total RNA 500 ng から直接ラベルしても検出感度が下がらないように改良した。再現性に関して、市場で入手可能な他の 4 種類の microRNA マイクロアレイチップとの比較を行い、最も再現性が高い方法である事を示した。

(2) 食道扁平上皮癌のドセタキセル (DTX) 感受性

①まず DTX (1 μM) に対する感受性を WST1 法により食道扁平上皮癌由来細胞株 (KYSE cell lines) 26 種において調べたところ、感受性

株（無刺激時と比較して30%以下に減少）として KYSE-170、190、850、1240 の4種を同定した。一方、抵抗性株（80%以上）として KYSE-450、520、1170、3410 の4種を同定した。

②次に、これら2群において発現に差のある microRNA を microRNA マイクロアレイにより網羅的に探索し、リアルタイム PCR 法により検証した結果、感受性株において miR-98、224、335、452 の発現が有意に亢進していること、miR-31、149、152 の発現が有意に低下していることを見いだした。

③そこで、これらの microRNA が実際に DTX 感受性に関与するかどうかを明らかにするために、それぞれの microRNA を過剰発現させて DTX 感受性に対する効果を検証した。その結果、miR-452 の過剰発現により DTX 感受性が亢進し、miR-149 の過剰発現により DTX 抵抗性が亢進した。以上の結果より、miR-452 が DTX 感受性に、miR-149 が DTX 抵抗性に寄与している可能性が見いだされた。

(3) 正常食道上皮と食道癌細胞における発現差のある microRNA の網羅的同定

① 正常食道上皮として正常食道細胞株 HE3-1、HEEPic-2 の2株と、食道癌細胞株 KYSE150、KYSE170、KYSE190、KYSE450、KYSE510 の5株において、human microRNA oligo chip (TORAY 471miRNA)を用いたマイクロアレイ解析を行った。

② 7細胞株間でシグナル値の差が少なくとも3倍以上あった microRNA 群を抽出し、クラスター解析 (heatmap) を行い、正常細胞と KYSE 株の違いに大きく寄与していると推測される microRNA (normal tissue > cancer : 5種、normal tissue < cancer : 15種)が見いだされた。このうち14種類について定量 PCR 法により再評価を行ったところ、5種類の microRNA において正常食道細胞株と食道癌細胞株における発現差が確認された。

③ また既知の250種の microRNA に関して real time RT-PCR 法を用いて解析を行った。Real time PCR ではマイクロアレイと異なり2倍変動で microRNA を抽出した。主成分分析で第二軸において正常食道細胞株と KYSE 株のベクトルが逆の方向性を示し、両者の違いに貢献する microRNA 群が示唆された。その中にはマイクロアレイ解析から選抜された microRNA も選択されており、解析法の妥当性が確認された。

(4) 食道癌特異的 PLK1 発現に関与する microRNA 解析

① 正常食道上皮で発現が見られない Polo-like kinase 1 (PLK1)が食道癌細胞株 11株で発現しており、SiPLK1によりその発現レベルが抑制された。

② さらに SiPLK は食道癌細胞に G2/M arrest を生じさせ、増殖抑制と異種移植による腫瘍形成を抑制した。

③ データベースサーチにより PLK1 のターゲットとする miR-593\* が同定された。miR-593\* は15株中10株の食道癌細胞株および食道癌組織14症例で発現低下が認められた。

④ miR-593\* は食道癌細胞株 HAS/c において PLK1 の発現を69-73%抑制するとともに G2/M arrest による細胞増殖抑制を来した。

⑤ 一方 miR-593\* の阻害剤は PLK1 発現を11-37%上昇させた。さらにルシフェラーゼ assay にて miR-593\* は HAS/c の PLK 発現を57-71%減少させた。

⑥ 以上の事から miR-593\* は PLK を転写後調節しており食道癌における有力な分子標的となりうるものと考えられた。

(5) Barrett 腺癌における microRNA 解析

① miR-106b-25 クラスターが高発現しており、癌細胞の増殖、抗アポトーシス効果ならびに異種移植の腫瘍形成能を亢進した。

② miRs -93 と -106b のターゲットは p21 で、miR-25 のターゲットは Bim と考えられた。

③ miRs -93 と -106b は p21 の mRNA を直接抑制するが Bim に対しては mRNA 発現に変化はなく転写抑制と考えられた。

④ 食道腺癌では miRs -106b-25 クラスターが p21 と Bim の抑制を介して増殖に関与している。

(5) 以上の検討により網羅的なマイクロ RNA 発現解析が可能となった特殊形状 DNA チップとその実験プロトコルが構築された。また食道扁平上皮癌、腺癌、正常食道上皮、癌の薬剤感受性において microRNA が深く関与しており分子標的になりうる可能性が示唆された。これらの成果は、食道癌の個性化診断および個別化治療に繋がる成果である。

## 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8件)

1) Shimada Y, Tsujimoto G et al. cDNA microarray analysis of esophageal cancer: Discoveries and prospects. Gen Thorac Cardiovasc Surgery. In press 2009

2) Iriyama T, Shimada Y et al. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. EMBO Journal advance online publication 12

February 2009

3) Ito T, Shimada Y et al. PTTG1 increases cell motility and promotes lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 68: 3214-3224, 2008

4) Ortiz C, Shimada Y et al. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its clinical significance. *Int J Cancer*, 122: 325-332, 2008

5) Ruike Y, Tsujimoto G et al. Global correlation analysis for micro-RNA and mRNA expression profiles in human cell lines. *J Hum Genet*. 53:515-23,2008

6) Ito T, Tsujimoto G, Shimada Y et al An ultrasensitive new DNA microarray chip provides gene expression profiles for preoperative esophageal cancer biopsies without RNA amplification. *Oncology* 2007, 73:366-375

7) Shimada Y and Sato F. Molecular factors related to metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 4, 7-18, 2007

8) Tanaka E, Shimada Y et al. The suppression of Aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemo-sensitivity to Docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 1331-1340. 2007

[学会発表] (計 11 件)

1) 佐藤史顕、土屋創建、嶋田裕、清水一治 Polo-like kinase 1 の食道癌細胞増殖能に於ける役割とmicroRNA-593\*による転写後制御 第 6 7 回日本癌学会学術総会. 名古屋 2008. 10. 29

2) Shimada Y, Shinoda M, Kato K, Tsujimoto G, Predicting lymph node metastasis by DNA microarray analysis of preoperative endoscopic biopsy specimens from esophageal cancer patients. UICC World Cancer Congress Geneva 2008. 8. 30

3) Ito T, Shimada Y, et al. Down-regulation of PTTG1 by siRNA suppresses tumorigenesis and lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma in vivo. 109th

annual meeting of the AGA institute. San Diego 2008. 5. 19

4) Ortiz C, Shimada Y, et al. Fascin modifies the expression of c-erbB-2/HER-2 and beta -catenin in the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) 2008. annual meeting of AACR. San Diego 2008. 4. 14

5) Ito T, Shimada Y, et al. Down-regulation of Polo-like kinase 1 by siRNA drastically suppresses proliferation of esophageal cancer cells. 2008 annual meeting of AACR San Diego 2008. 4. 13

6) Shimada Y, et al. Significance of Karyopherin alfa 2 (KPNA2) expression in esophageal squamous cell carcinoma. 2008 annual meeting of AACR San Diego 2008. 4. 12

7) Tsujimoto G, Okuno Y, Terasawa K, Tuchiya S. Comprehensive analysis of microRNA target networks. The Uehara Memorial Foundation Symposium-2008, Hyatt Regency Tokyo Japan, June 30-July 2,2008.

8) Ito T, Shimada Y, et al. Downregulation of PTTG1 by SiRNA suppress cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. 2007 Annual meeting of AACR. Los Angeles 2007. 4. 17

9) Shimada Y, Fujimoto J et al. Prognostic significance of PTTG1/securin in esophageal cancer patients. 2007 Annual meeting of AACR. Los Angeles 2007. 4. 15

10) Ortiz C, Shimada Y et al. Role of Fascin in anoikis and tumor formation in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). 2007 Annual meeting of AACR Los Angeles 2007. 4. 16

11) Shimada Y, Fujimoto J et al. SiRNA treatment for esophageal cancer cells. 42nd Congress of the European Surgical Research (ESSR) Rotterdam 2007. 5. 26

[図書] (計 1 件)

1) Tsuchiya S., Okuno Y. and Tsujimoto G. (2008) MicroRNAs and discovery of new targets. In Innocenti, F. (ed.), *Genomics and Pharmacogenomics in Anticancer Drug Development and*

Clinical Response. Humana Press,  
Totowa, NJ.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：30216072

### (2) 研究分担者

辻本 豪三 (TSUJIMOTO GOZOH)

京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：80172013

篠田 雅幸 (SHINODA MASAYUKI)

愛知県立がんセンター中央病院・病院長  
研究者番号:00416166

塚田 一博 (TSUKADA KAZUHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：90171967

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90199373