

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月18日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590685

研究課題名（和文） 食道扁平上皮癌特異的マイクロRNAの血中同定と臨床診断への応用

研究課題名（英文） Clinical significance of esophageal squamous cell carcinoma-specific microRNA in circulation and tissue

研究代表者

磯本 一 (Isomoto Hajime)

長崎大学・大学病院・准教授

研究者番号：90322304

研究成果の概要（和文）：

内視鏡下に食道癌症例の癌部・周辺非腫瘍粘膜から生検サンプルを用いてマイクロアレイで同定した12種のヒトマイクロRNA（食道扁平上皮癌部で2倍以上の発現変化）を定量的に分析してみると、miR-1246、miR-1290、miR-196a、miR-196b、miR-1914、miR-424、miR-130b、miR-7、miR-455-3pが2倍以上発現上昇した。miR-203が2分の1以下に発現低下した。食道扁平上皮癌組織のmiR発現と臨床病理学的因子の関連性を明らかにするために、多段階に食道癌が発癌する過程においてmiRが果たす役割を解析する。しかしながら、異形成～上皮内癌～早期癌のサンプルが十分でなく、内視鏡下粘膜下層剥離術を用いて切除標本、施行時の血液サンプルを集積して、臨床病理 database を構築した。化学放射線療法前後における非腫瘍部食道粘膜のmiRの変動を、6症例において統計的に解析した結果で有意差がなかったが、2倍以上増加したmiR-1914については放射線応答性miRである可能性があり、症例を追加し治療前後でその発現変動を追求する。食道扁平上皮癌における特性をさらに検討するため、アカラシア患者の食道粘膜における発現変化を検討した。対照群と比べて、アカラシアの食道粘膜では12種類のmiRで有意差がみられた。7つが有意に上昇、5つが有意に低下したmiRであった。注目すべき点は、食道癌をはじめとする多くの癌腫で発現上昇が報告されているmiR-21がアカラシア食道粘膜で上昇している点である。miR-21の標的分子として報告されているPDCD4、SPRY1やCCDC12のmRNAが低下している。しかし、一方でmiR-1246、miR-196a、miR-196b、miR-1914、miR-424、miR-130b、miR-7、miR-455-3p、miR-203はいずれもアカラシア食道粘膜では変動しておらず、食道扁平上皮癌の発癌過程における特性が示唆された。miR-1290は食道扁平上皮癌において血清miRが上昇している。miR-1290をターゲットに、食道扁平上皮癌特異的miRの特定を確かなものにした。

研究成果の概要（英文）：

Using endoscopic samples obtained from esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and the surrounding non-tumor tissues, we quantitated microRNA (miR) that were identified via microarray. The expression levels of miR-1246, miR-1290, miR-196a, miR-196b, miR-1914, miR-424, miR-130b, miR-7, and miR-455-3p were elevated more than 2-fold, while miR-203 expression levels were down-regulated more than 2-fold. The miR-1914 expression levels were altered more than 2-fold before and after chemoradiotherapy, and might be specific for ESCC-chemoradiation. Achalasia is considered as the high-risk condition for ESCC, and we explored the miR expression profile in esophageal mucosa of achalasia patients compared to normal controls. It was found that 12 miRs were significantly altered; 7 were elevated and 5 were down-regulated. Of significance, miR-21 expression was significantly elevated in the non-ESCC samples from achalasia patients. Moreover, the target molecules were down-regulated, suggesting the function roles of miR-21. On the other hand, the expression of miR-1246, miR-196a, miR-196b, miR-1914, miR-424, miR-130b, miR-7, and miR-455-3p was not significant, implying the ESCC specific miR, albeit the blood levels were not substantial. The circulating miR-1290 was found to be elevated in the studies, and it is warrant to be explored as the ESCC-specific miR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科

キーワード：マイクロ RNA、食道扁平上皮癌、内視鏡的粘膜下層剥離術、化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

食道癌は消化器癌の中で極めて予後不良の癌の1つである。組織学的には、扁平上皮癌と逆流性食道炎やバレット上皮との連関が知られている腺癌に大別される。欧米特に白人で腺癌の発生率が高いのに対し、本邦では扁平上皮癌が90%以上を占めている。食道扁平上皮癌の発症には、喫煙や飲酒、パピローマウイルスといった環境要因に加え、p53遺伝子変異を始めとする遺伝子異常などの多因子が関与している。発癌に関与する遺伝子や癌抑制遺伝子の一部は、プロモーター領域のDNAメチル化やマイクロRNAによるエピジェネティック機構によって転写・翻訳制御されていることが明らかになってきた。miRは18~25塩基からなるnon-coding RNAで、標的となるmessenger RNAの3'側非翻訳領域に相補的に結合し翻訳を阻害する。ヒトで1000種類に及ぶmiRが発見され、細胞の増殖や細胞死、分化に重要な役割を果たしている。癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現を制御するmiRも同定され、発癌や癌の悪性形質獲得との関与が明らかになってきた。食道癌とmiR発現に関しては、米国における扁平上皮癌では腺癌に比しmiR-21とmiR-375の発現がそれぞれ有意に増強・減弱しており、独立した予後予測因子であると報告された。また、腫瘍組織のみならず体液中にもmiRが存在することが明らかになり、exosomeとして血漿に分泌されたmiRの発現を解析することで、幾つかの癌で診断応用が試みられている。

我々は、食道扁平上皮癌患者の癌部と周囲非腫瘍粘膜からRNAを抽出してmiR発現パターンをマイクロアレイ法で網羅的に解析した結果、10種類に及ぶmiRが特異的に増減している知見を得た。食道癌におけるmiR発現の特異性を究明すると共に、得られたmiRの血漿中の発現を定量解析して、食道癌の進

行度（臨床病期）・病理組織学的因子・転移（遠隔及びリンパ節）・治療効果・予後との相関性などを検討してみたい。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌組織と周囲非腫瘍部のRNAを抽出して特異的miRの同定を行う(miRマイクロアレイ・realtime PCR・non-RI Northern blot)。同定されたmiRの食道扁平上皮癌・異形成組織での局在や発現性を確認する。miRの機能解析に当たっては細胞増殖やアポトーシスに加え、食道癌の浸潤・転移能獲得機構の新たな知見を得ることが目標である。実際我々は、食道扁平上皮癌細胞特異的に有意な変動を示したmiR-205のアンチセンスオリゴ(anti-miR-205)を細胞導入して、MatrigelのTranswell migration assayを行うと、細胞形態の変化と共に浸潤細胞数が増加した。anti-miR-205によりZEB2が増加することで、E-cadherin発現が制御されEMTが誘導される。各種の特異的miRの標的分子はin silicoのプログラムで予測可能であり、各miRの前駆体やアンチセンスオリゴを細胞導入してその標的性を分子生物学的実験(Western blot・luciferase assay等)で明らかにする。血漿miRレベル測定(realtime PCR)による食道癌の新規診断法を確立する。種々の食道良性疾患や他の部位の消化管癌との鑑別や表在癌の早期診断へ向けて、血漿miRレベルのカットオフ値を設定してその診断精度を調べ、CRT前後の血漿miRレベルの推移が治療効果の指標となるか検討する。特異的miRの血漿・癌組織における発現性と、腫瘍の分化度、深達度、浸潤様式、脈管侵襲、リンパ節・遠隔転移の有無や予後との関連性を評価する。保管されたパラフィン標本や血清におけるmiR発現の保存性・定量性を解析することが、miRの食道癌患者の種々の臨床病理学的因子への

関与、特に予後調査において役立つものと考えられる。

### 3. 研究の方法

miR マイクロアレイ・realtime PCRにより食道扁平上皮癌特異的 miR の同定を行う。同定された miR の *in vitro* 機能解析を行い、食道扁平上皮癌・異形成組織での局在や発現性を確認し、併せて標的蛋白の発現 (免疫染色・Western blot) と対比する。種々の食道疾患や消化管癌との鑑別や表在癌の早期診断へ向けて診断精度を調べ、CRT 前後の血漿 miR レベルが治療効果の指標となるか検討する。保管されたホルマリン標本や血清においても各 miR の保存性・定量性を確認し、予後調査などの臨床研究を展開したい。

内視鏡下に食道癌症例の癌部・周辺非腫瘍粘膜から生検サンプルを採取し、RNA を抽出して食道扁平上皮癌に特異的な miR の発現プロファイルをマイクロアレイ法により探索した。470 種のヒト miR を搭載したアジレントマイクロアレイを利用した。miR-21 を含む 12 種のヒト miR において、食道扁平上皮癌部で 2 倍以上の発現減弱或いは発現増強が認められた。これら食道扁平上皮癌に特有の発現パターンを呈する miR は、配列特異的なプライマーとプローブにより realtime PCR で定量的に解析する。種々の深達度・進行度の食道扁平上皮癌の手術標本から組織スライドを作成し、発現解析する。発現強度や発現様式と臨床病理学的因子 (分化度、深達度、浸潤様式、脈管侵襲、リンパ節・遠隔転移) や予後との関連性を評価する。前癌病変とされる異形成については、内視鏡下粘膜下層剥離術 (ESD) によって切除したサンプルを用いて多段階に食道癌が発癌する過程において、miR が果たす役割を解析する。食道癌特異的 miR と食道癌の臨床病理学的因子特に予後との関連を検討するには、多数例でのレトロスペクティブ解析も必要である。ホルマリン固定後パラフィン包埋した食道癌組織から、専用の核酸抽出キットを用いて RNA を抽出後 realtime PCR を用いて発現の保存性や定量性を調べる。保存血清中にも miR が相応に保存されている可能性があるため同様に RNA を抽出し、realtime PCR に供する。食道扁平上皮癌に特異的な miR については、患者から得られた血漿中の RNA を抽出して realtime PCR に供し定量的発現解析を行う。同一患者の癌組織中の miR 発現レベルと対比し、各種臨床病理学的因子との関連性を評価する。生命予後に関しては本研究終了以降も追跡調査する。特に、表在食道癌において手術・ESD 標本の多数サンプルを用いて血中・癌組織中の miR の発現異同を詳細に調べ、早期診断への応用性を検討する。CRT を施行した患者では、治療前・後の経時的発現レベル

の推移を同様に計測し、各種腫瘍マーカーや画像診断による効果判定との相同性を評価する。また、逆流性食道炎 (胃食道逆流症)・食道良性腫瘍 (平滑筋腫など)、アカラシアで特異的 miR の発現を定量する。食道癌の大半を占める扁平上皮癌とバレット食道腺癌における血中・腫瘍組織中での発現レベルを対比して両者の判別が可能か検討してみたい。食道以外の消化管癌患者からも同様に血中の各 miR の発現レベルを計測していく。カットオフ値を設定可能であれば、prospective に患者血漿を採取し食道扁平上皮癌における診断精度 (感度・特異度) を評価して臨床応用に繋げたい。

### 4. 研究成果

内視鏡下に食道癌症例の癌部・周辺非腫瘍粘膜から生検サンプルを用いてマイクロアレイで同定した 12 種のヒトマイクロ RNA (食道扁平上皮癌部で 2 倍以上の発現変化) を定量的に分析してみると、miR-1246、miR-1290、miR-196a、miR-196b、miR-1914、miR-424、miR-130b、miR-7、miR-455-3p が 2 倍以上発現上昇した。miR-203 が 2 分の 1 以下に発現低下した。食道扁平上皮癌組織の miR 発現と臨床病理学的因子の関連性を明らかにするために、多段階に食道癌が発癌する過程において miR が果たす役割を解析すなわち、炎症性変化から、低・高度異形成 (前癌病変)、上皮内癌、早期癌、進行癌の各段階において、miR の発現強度や発現様式と臨床病理学的因子 (分化度、深達度、浸潤様式、脈管侵襲、リンパ節・遠隔転移) や予後との関連性を評価する。しかしながら、異形成～上皮内癌～早期癌のサンプルが十分でなく、内視鏡下粘膜下層剥離術を用いて切除標本、施行時の血液サンプルを集積して、臨床病理 database を構築した。化学放射線療法前後における非腫瘍部食道粘膜の miR の変動を、6 症例において統計的に解析した結果で有意差がなかったが、2 倍以上増加した miR-1914 については放射線応答性 miR である可能性があり、症例を追加し治療前後でその発現変動を追求する。食道扁平上皮癌における特性をさらに検討するため、アカラシア患者の食道粘膜における発現変化を検討した。対照群 (健常者) と比べて、アカラシア患者の食道粘膜では、12 種類の miR で有意差がみられた。7 つが有意に上昇、5 つが有意に低下した miR であった。注目すべき点は、食道癌をはじめとする多くの癌腫で発現上昇が報告されている miR-21 がアカラシア食道粘膜で上昇している点である。そして、miR-21 の標的分子として報告されている PDCD4 の発現性を調べた結果、mRNA レベルで有意に低下した。PDCD4 はアポトーシスに関与 miR-21 が癌化や悪性度に関与することから、アポトーシスの制御と

いう機能を考えると興味深い。さらに、標的分子として、in silico 解析で予想された標的分子の SPRY1 や CCDC12 の mRNA が果たして低下していた。しかし、一方で miR-1246、miR-196a、miR-196b、miR-1914、miR-424、miR-130b、miR-7、miR-455-3p、miR-203 はいずれもアカラシア食道粘膜では変動しておらず、食道扁平上皮癌の発癌過程における特性が示唆された。これらの血清 miR レベルの定量性の検討で有意な変化は確認できていない。miR-1290 は食道扁平上皮癌において血清 miR が上昇している。miR-1290 をターゲットに、さらに症例数の増加、深達度、病理学的因子などの多彩性をもってサンプルを進めていき、食道扁平上皮癌特異的 miR の特定を確かなものになりたい。

#### 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 1 件)

Matsushima K, Isomoto H, Kohno S, Nakao K. MicroRNAs and esophageal squamous cell carcinoma. Digestion. 2010;82(3):138-44.

[学会発表] (計 1 件)

南 ひとみ, 磯本 一, 中山敏幸, 松島加代子, 赤澤祐子, 山口直之, 大仁田賢, 竹島史直, 宿輪三郎, 林 徳眞吉, 中尾一彦. 食道癌の診断. 第 92 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 (2011 年 11 月)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

#### 6. 研究組織

研究代表者

**磯本 一 (Isomoto Hajime)**

長崎大学・大学病院・准教授

研究者番号 : 90322304