

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10089

研究課題名(和文)新規樹立食道神経内分泌癌細胞株を用いた治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of molecular targets to predict postoperative outcomes in patients with neuroendocrine cell carcinoma of the esophagus

研究代表者

小島 博文 (Kojima, Hirohumi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：60750114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道原発NEC5例の切除標本FFPEブロックを用いてマイクロアレイによるmiRNA発現解析を行い、410分子のクラスタリング解析によって術後無再発生存例と早期再発例に一致した異なる2つのクラスターに分けられる可能性を示した。また、マイクロアレイによって探索したmiRNAのなかで無再発例において発現が有意に亢進するものとしてmiR-625をはじめとした8分子が抽出され、TYUC-1にアンチセンスRNAを導入しmiR-625発現を抑制したところトランスウェルにて評価した細胞移動能が有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Background: Neuroendocrine cell carcinoma of the esophagus (ENEC) is a rare but very aggressive disease with poor prognosis. The aim of this study was to identify a molecular signature to predict postoperative outcomes in patients with ENEC. Methods: Expression of microRNA was detected in surgically-removed ENEC tumors using microarrays. A SCCE cell line (TYUC-1) was established to investigate the biological role of differentially expressed microRNAs. Results: Hierarchical clustering of microRNA expression revealed two discrete clusters that were identical to the cases with rapid tumor relapse and the cases with long-term survival, respectively. Migration of TYUC-1 was significantly inhibited by downregulation of miR-625. Conclusion: The expression profiles of microRNAs in tumors may represent a novel predictor for postoperative outcomes in patients with ENEC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：NEC esophagus Esophageal cancer miRNA

### 1. 研究開始当初の背景

食道原発神経内分泌癌 (neuroendocrine carcinoma:NEC) は希少であるために標準治療が確立されておらずその細胞生物学的特性の解析も遅れている。我々はヒト食道原発 NEC 細胞株 (TYUC-1) を世界に先駆けて樹立した。

### 2. 研究の目的

食道原発 NEC 切除組織および TYUC-1 を用いてマイクロ RNA の発現および機能解析を行い、新規治療標的分子の探索および治療効果予測システムの開発につなげる

### 3. 研究の方法

食道原発 NEC 切除組織を用いたマイクロ RNA 発現解析：切除標本 FFPE ブロックから RNA を抽出し、マイクロ RNA をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。TYUC-1 を用いた miRNA 機能解析：マイクロアレイ解析から食道 NEC 特異的分子としてリストアップされた分子について TYUC-1 を用いて機能解析を進め診断・治療標的分子を探索する。

### 4. 研究成果

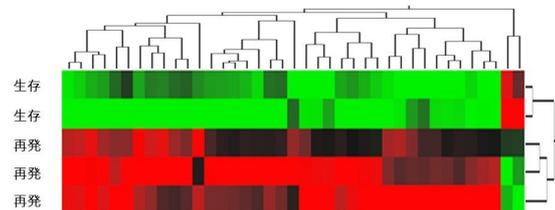
外科切除を施行した食道原発 NEC 6 例について検討したところ、臨床病期 / : 2 例、 / : 4 例に対して治療切除および CDDP を含む術後補助化学療法が施行され無再発生存 3 例 (209.0 ヶ月、180.7 ヶ月、56.1 ヶ月)、癌死 3 例 (1.7 ヶ月、5.1 ヶ月、8.5 ヶ月) と手術を含む集学的治療により長期生存が期待できる症例が少なからず存在することが示唆された。一方、これら 2 群においては臨床病理学的因子と予後に有意な相関を認めず、分子生物学的手法を用いた治療感受性予測や予後不良例における新たな治療標的分子の探索が必要と考えられた。

食道原発 NEC 5 例の切除標本 FFPE ブロックを用いてマイクロアレイによる miRNA 発現解析を行い、410 分子のクラス

タリング解析によって術後無再発生存例と早期再発例に一致した異なる 2 つのクラスターに分けられる可能性を示した (Okumura T, et al. Anticancer Res 2015)。

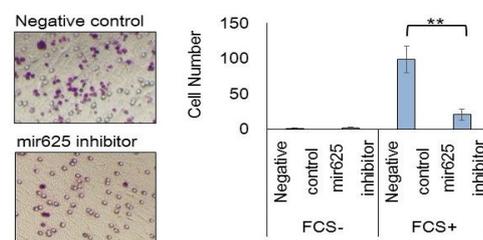
この結果に基づき、「食道原発神経内分泌癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイルを用いた分子生物学的サブクラスの同定と治療効果予測分子マーカーセットの探索」を日本神経内分泌腫瘍研究会 (JNETS) の多施設共同プロジェクト研究として開始した。この研究は本科学研究費分担研究者である奥村が主任研究者となり富山大学が主たる研究機関となって実施されるもので、富山大学および JNETS の倫理審査委員会で承認され、2016 年 10 月より症例登録とサンプル収集が開始されている。

食道小細胞癌における miRNA 発現クラスターリング



また、マイクロアレイによって探索した miRNA のなかで無再発例において癌死例と比べて発現が有意に亢進するものとして miR-4323, miR-625, miR-3619 をはじめとした 8 分子が抽出され、TYUC-1 にアンチセンス RNA を導入し miR-625 発現を抑制したところトランスウェルにて評価した細胞移動能が有意に抑制された。

### TYUC-1 を用いたトランスウェルアッセイ



### 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 14件)

Okumura T, Yamaguchi T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Circulating tumor cells detected by the expression of cancer stem cell marker CD90 and CD44 in patients with esophageal cancer. *International surgery* (査読あり) Online First Nov20 2017

Watanabe T, Okumura T, Hirano K, Yamaguchi T, Sekine S, Nagata T, Tsukada K. Circulating tumor cells expressing cancer stem cell marker CD44 as a diagnostic biomarker in patients with gastric cancer. *Oncol Lett.* (査読あり) 2017 Jan;13(1):281-288.

Kojima H, Okumura T, Yamaguchi T, Miwa T, Shimada Y, Nagata T. Enhanced cancer stem cell properties of a mitotically quiescent subpopulation of p75NTR-positive cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* (査読あり) 51: 49-62, 2017

Miwa T, Nagata T, Kojima H, Sekine S, Okumura T. Isoform switch of CD44 induces different chemotactic and tumorigenic ability in gallbladder cancer. *Int J Oncol.* (査読あり) 2017; 51: 771-80

Okumura T, Yamaguchi T, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y. Clinical Relevance of a Candidate Stem Cell Marker, p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR) Expression in Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol.* (査読あり) 2017;994:247-254.

Okumura T, Yamaguchi T, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y. Flow Cytometric Detection of Circulating Tumor Cells Using a Candidate Stem Cell Marker, p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR). *Methods Mol Biol.* (査読あり) 2017;1634:211-217.

Okumura T, Kojima H, Hashimoto I, Watanabe T, Shibuya K, Hojo S, Yoshioka I, Matsui K, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Loss of Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrome-1 (TRPS1) expression as a Biomarker of Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Int J Cancer Res Mol Mech.* (査読あり) 2016; 2(2). Doi: 10.16966/2381-3318.124.

Okumura T, Kojima H, Miwa T, Sekine S, Hashimoto I, Hojo S, Nagata T, Shimada Y. *World J Surg Oncol.* (査読あり) 2016 Aug 26; 14(1): 228. doi: 10.1186/s12957-016-0985-3 .

Shimada Y, Okumura T, Takei Y, Watanabe K, Nagata T, Hori T, Tsuchiya

S, Tsukada K, Shimizu K. Role of fibroblast growth factor receptors in esophageal squamous cell carcinoma. *sophagus* (査読あり) 2016, 13:30-41

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic of the mitotically quiescent cancer stem cell population present in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* (査読あり) 2016; 48: 1943-54.

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, Tsukada K. Detection of circulating tumor cells by p75NTR expression in patients with esophageal cancer. *World J Surg Oncol.* (査読あり) 2016 Feb 20;14(1):40.

Okumura T, Shimada Y, Omura T, Hirano K, Nagata T, Tsukada K. MicroRNA Profiles to Predict Postoperative Prognosis in Patients with Small Cell Carcinoma of the Esophagus. *Anticancer Res.* (査読あり) 2015, 35(2) 719-27.

Okumura T, Shimada Y, Sakurai T, Hori R, Nagata T, Sakai Y, Tsukada K. Abnormal cell proliferation in the p75NTR-positive basal cell compartment of the esophageal epithelium during squamous carcinogenesis. *Dis Esophagus.* (査読あり) 2015, 28(7) 634-43.

Hirano K, Okumura T, Shimada Y, Watanabe T, Yamaguchi T, Nagata T, Tsukada K. Establishment and Characterization of Two Novel Human Pancreatic Carcinoma Cell Lines. *Anticancer Res.* (査読あり) 2015, 35(7) 3821-8.

〔学会発表〕(計 14件)

奥村知之、小島博文、荒井美栄、馬場逸人、山崎豪孔、明石堯久、祐川健太、河合俊輔、渡辺 徹、森山亮仁、関根慎一、渋谷和人、橋本伊佐也、北條莊三、吉岡伊作、長田拓哉、廣川慎一郎、嶋田 裕、藤井 努 食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞の同定 第28回日本消化器癌発生学会総会 2017年11月17日 熊本

奥村知之、小島博文、関根慎一、荒井美栄、馬場逸人、明石堯久、森山亮仁、渋谷和人、橋本伊佐也、北條莊三、吉岡伊作、長田拓哉、廣川慎一郎、藤井 努 食道原発神経内分泌腫瘍における分子生物学的サブクラスの同定 富山 GEP-NET 懇話会 2017年9月8日

奥村知之、小島博文、関根慎一、藤井 努、嶋田 裕、小澤壯治、松原久裕、上本伸二、幕内博康、今村正之。 「JNETS 食道原発

神経内分泌癌 (NEC) プロジェクト」進捗報告. 第 5 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2017 年 9 月 2 日 仙台

奥村知之、小島博文、山口哲司、三輪武史、渡辺徹、関根慎一、橋本伊佐也、吉岡伊作、嶋田裕、長田拓哉、藤井努 食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞マーカー CD271 を用いた血中循環癌細胞の検出 第 72 回日本消化器外科学会総会 2017 年 7 月 21 日 金沢

小島博文、奥村知之、三輪武史、長田拓哉. p75NTR 発現に基づく食道扁平上皮癌における静止期癌幹細胞の同定. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017 Jul 20-22; 金沢

奥村知之 食道癌幹細胞を標的とした新規治療開発に向けて フォーラム富山「創薬」第 45 回研究会パネルディスカッション 2017 年 5 月 18 日

奥村知之、福田卓真、三輪武史、渡辺 徹、小島博文、関根慎一、橋本伊佐也、渋谷和人、北條莊三、吉岡伊作、澤田成朗、長田拓哉、嶋田 裕 食道扁平上皮 多発前癌病変における静止期基底細胞の形質変化 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年 4 月 27 日 横浜

小島 博文、山口 哲司、奥村 知之、三輪武史、平野 勝久、渡辺 徹、長田 拓哉、塚田 一博. p75NTR を用いた食道癌患者の末梢血循環癌細胞の検出. 第 71 回日本消化器外科学会総会; 2016 Jul 14-16; 徳島.

奥村知之、小島博文、三輪武史、河合俊輔、平野勝久、渡辺 徹、森山亮仁、関根慎一、橋本伊佐也、渋谷和人、北條莊三、松井恒志、吉岡伊作、長田拓哉、嶋田 裕、塚田一博. 食道原発神経内分泌癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイルに基づく切除適応症例の選別. 第 71 回日本消化器外科学会総会; 2016 Jul 14-16; 徳島.

奥村知之、小島博文、三輪武史、河合俊輔、平野勝久、渡辺 徹、森山亮仁、関根慎一、橋本伊佐也、渋谷和人、北條莊三、松井恒志、吉岡伊作、長田拓哉、嶋田 裕、塚田一博. 正常食道扁平上皮における静止期基底層細胞の分離と上皮構造の再構築. 第 116 回日本外科学会定期学術集会; 2016 Apr 14-16; 大阪

小島 博文、奥村 知之、山口 哲司、平野 勝久、渡辺 徹、三輪 武史、長田 拓哉、塚田 一博. 食道癌における静止期癌幹細胞の同定. 第 116 日本外科学会定期学術集会; 2016 Apr 14-16; 大阪.

渡辺 徹、奥村知之、平野勝久、三輪武史、山口哲司、小島博文、関根慎一、長田拓哉、塚田一博. 癌幹細胞マーカー CD44 を発現した末梢血循環癌細胞は胃癌患者におけるバイオマーカーとして重要である. 第 74 回日本癌学会学術総会; 2015 Oct 8-11; 名古屋.

奥村 知之、山口 哲司、平野 勝久、渡辺

徹、小島 博文、橋本 伊佐也、渋谷 和人、北條 莊三、吉岡 伊作、松井 恒志、長田 拓哉、嶋田 裕、塚田 一博. 食道扁平上皮癌幹細胞マーカー CD271 を用いた末梢血循環癌細胞の検出. 第 74 回日本癌学会学術総会; 2015 Oct 8-11; 名古屋.

Okumura T, Shimada Y, Watanabe T, Hirano K, Yamaguchi T, Sekine S, Nagata T, Tsukada K. MicroRNA Profiles to Predict Postoperative Prognosis in Patients with Small Cell Carcinoma of the Esophagus. 46th World Congress of Surgery; 2015 Aug 23-27; Bangkok.

〔産業財産権〕

出願状況 (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：

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：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 博文 (KOJIMA, Horohumi)  
富山大学・附属病院・診療助手  
研究者番号: 60750114

### (2) 研究分担者

奥村 知之 (OKUMURA, Tomoyuki)  
富山大学・附属病院・講師  
研究者番号: 10533523