

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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591704

研究課題名（和文） 食道扁平上皮癌の microRNA 発現異常における DNA メチル化の意義

研究課題名（英文） Effect of DNA methylation on the regulation of microRNA in squamous cell carcinoma of the esophagus

研究代表者

渡邊 雅之（WATANABE MASAYUKI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80254639

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌における DNA メチル化異常の網羅的解析として pyrosequencing technology を用いた LINE-1 のメチル化レベルの解析を行い、食道扁平上皮癌においては global hypomethylation が認められ、予後不良因子であることを明らかにした。食道扁平上皮癌における microRNA (miR) の発現解析により miR-29c の高発現が食道癌の予後因子となること、miR-223 の高発現が ubiquitin ligase である FBXW7 の発現を制御することを明らかにした。また食道癌患者では血清中の miR-21 が有意に高値であり治療効果のマーカーとなりうることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We clarified that global hypomethylation was observed in squamous cell carcinoma of the esophagus (ESCC) and the hypomethylation of LINE-1 was a significant indicator for poor prognosis in patients with ESCC. We also identified that overexpression of microRNA (miR)-29c was a prognostic factor of patients with ESCC and miR-223 regulated FBXW7 in ESCC. We examined miR-21 expression in the serum and clarified that the serum miR-21 levels of ESCC patients was significantly higher than those of healthy controls and the serum miR-21 expression could be a marker for treatment effect for ESCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学、食道外科学

キーワード：DNA メチル化異常、SYBR green 法、microRNA、ホルマリン固定標本、化学療法感受性、食道癌

1. 研究開始当初の背景

<食道扁平上皮癌の危険因子と DNA メチル化異常について>

食道扁平上皮癌の発癌には飲酒・喫煙等の危険因子への暴露が関与することが報告されている。中でもアルコール多飲に関係する

食道癌症例においては末梢血の Mean corpuscular volume (MCV) が高値を示すことが報告されている。食道扁平上皮癌患者の MCV 値は喫煙のみが危険因子となる肺癌や飲酒・喫煙への暴露が少ない胃癌患者のそれと比較して有意に高値を示している。また、同程度の危険因子への暴露を受けた肺癌・胃癌

の患者に比較しても食道癌患者の MCV 値は有意に高値であり、MCV 値の上昇は食道癌患者に特異的な現象であることが考えられる。MCV 高値の原因としては、アルコールおよび喫煙による葉酸代謝の異常が考えられており、葉酸の代謝障害は DNA の global hypomethylation と focal hypermethylation を来すことにより様々な遺伝子の発現異常を来して発癌につながる可能性が報告されている。

近年、食道扁平上皮癌において様々な遺伝子のプロモーター領域における CpG island の hypermethylation によるがん抑制遺伝子の発現低下が報告されており、発癌過程におけるメチル化異常の意義が注目されている。研究者らのグループも食道扁平上皮癌において p14ARF 遺伝子のプロモーターの hypermethylation が mRNA の発現低下に関与することを報告している (Anticancer Res, 2007)。

<microRNA (miRNA) の発現制御について>
これまでの RNA 研究で、約 22 前後の塩基配列をもつ small RNA で、タンパク質の翻訳されない Non-coding RNA (ncRNA) が数多く存在することが分かっていたが、機能的意義はないとして無視されてきた。近年、この ncRNA が生理的環境の中で発現し、RNA 干渉のメカニズムにより、生理的に転写後の制御を行っていることが分かり miRNA として注目されている。miRNA の発現調節機序に関しては未だ不明な部分が多いが、近年、miRNA のプロモーターにおける CpG island methylation が epigenetic に miRNA の silencing に関与する可能性が報告されている。さらに histone deacetylase (HDAC) inhibitor や DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor による DNA のメチル化阻害が癌抑制的に働く miRNA の発現を上昇させることが明らかにされ、新たな分子標的治療のターゲットとして注目されている。

<食道癌における miRNA の報告>
現在、各領域で miRNA の報告は急増しているが、食道癌に関与する miRNA の研究報告は僅かである。miRNA の processing enzyme である RANSEN の高発現が予後と相関していた (Clin Cancer Res, 2006)、食道癌患者 (SCC) において miR103 と miR107 は食道癌の予後に相関していた (Cancer Res. 2008)、食道腺癌および扁平上皮癌において miR-203 と miR-205 は正常より発現が低下しており、miR-21, miR342 は増加していた (J Thorac Cardi ovasc Surg, 2008) 等の報告がなされているが、miRNA の発現と組織型との比較検討のみで、その機能的意義についての解析の報告はまだ認めない。

<Preliminary Data>

我々は消化管癌(食道、胃、大腸)の切除検体

を用いて、幾つかの miRNA をターゲットに TaqMan 法により real time RT-PCR を施行した。その中で、miR-21 の発現は食道癌、胃癌、大腸癌組織で正常より増強していることが分かった。食道癌は癌/正常発現比が高かったため、計 25 の検体について miR-21 の発現を検討した結果、食道癌部では正常より約 3.5 倍の発現量を呈し、腫瘍径との有意な相関性を認めた ($p < 0.05$)。次に endogenous miR-21 の発現量が異なる 3 種の食道癌細胞株 (high, middle, low) を用いて、2' -O-methyl 化処理の Anti-miR-21 を細胞内へ transfection を行い miR-21 の発現を抑制させ、細胞増殖への影響を MTT assay にて検討した。miR-21 の発現の抑制程度に比して、細胞増殖が抑制された。以上より、miR-21 は細胞増殖に関連する遺伝子を制御していることが推察された。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌において特異的に発現が低下している miRNA を同定し、その発現調節におけるプロモーター領域のメチル化の意義を明らかにする。また、この miRNA により制御される遺伝子を同定し、メチル化の阻害によるターゲット遺伝子の発現の変化を調べることにより、DNA メチル化阻害剤による分子標的治療の可能性を明らかにする。内因性に発現される miRNA は約 60%以上の遺伝子を制御していると予想されている。miRNA の発現異常は各種の癌腫において報告されており、癌の発生と進展において大きな意義を持っていることが考えられる。miRNA の epigenetic な制御機構を明らかにすることは、発癌における miRNA の意義をより明確にするとともに、癌研究のみならず、遺伝子の発現制御機構の解明の一端となる可能性がある。食道扁平上皮癌を制御する miRNA の同定とその機能解析 (miRNA のターゲット遺伝子の同定) は、食道癌の将来の診断・治療に直結することが予想される。さらにこの miRNA の発現調節における DNA のメチル化異常による epigenetic な制御機構が関与することが明らかになれば、予後不良な疾患である食道癌の予防につながるとともに、DNA メチル化をターゲットとした新たな治療法の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

食道扁平上皮癌を制御する miRNA の同定とその機能解析 (miRNA のターゲット遺伝子の同定) は、食道癌の将来の診断・治療に直結することが予想される。さらにこの miRNA の発現調節における DNA のメチル化異常による

epigenetic な制御機構が関与することが明らかになれば、予後不良な疾患である食道癌の予防につながるとともに、DNA メチル化をターゲットとした新たな治療法の開発につながることが期待される。

1. 食道癌の組織検体の採取と RNA の精製

熊本大学附属病院において手術された食道癌の切除組織検体を収集する。当院では年間約 50 例の食道癌手術が施行され、その病理学的因子や飲酒・喫煙歴を含めた背景因子についてもすべて把握されている。これらの検体から新鮮凍結組織片が採取され、組織バンクにて保存、管理されている。RNA の精製には、採取時の検体の生物学的特性を正確に反映する RNA を回収するために、ホモジネートを行わず、magnetic beads を使用し、容易に高品質の RNA が大量に溶解精製できる Total nucleic acid isolation system (MELT)

(Latham GJ, Nature Methods, 23 Aug 2005) を用いる。検体は癌部、非癌部、リンパ節転移巣に分け RNA を回収する。また、検体の一部は固定し、後日、Laser microdissection により癌部、非癌部、浸潤先進部など、部位別に回収し、RNA を精製する。

2. 食道癌の miRNA 発現の網羅的解析

miRNA を登録管理している Sanger Institute から発信されている最新 version10(2007.8) を参考にした miRNA の microarray (Agilent 社の miRXplore microarray kit) を用いて食道癌の miRNA profile を検証する。この microarray には既存の miRNA (ヒト 728, マウス 584, ラット 426, ウイルス 122 など) がコートされ哺乳類間の homology により新たな miRNA を同定できる可能性もある。

Microarray で得られた結果を食道癌患者の飲酒・喫煙歴と対比することにより、危険因子への曝露の程度と miRNA profile の関連について検討する。

3. 食道癌特異的 miRNA の発現の検証

食道癌関連として同定された miRNA について、real-time RT-PCR、Northern blotting を用いて結果の検証を行う。poly A tailed RT-PCR を用いて検証する。miRNA に poly A polymerase を用いて poly A を付加する。Poly A 配列を考慮した RT primer を用いて RT を行う。miRNA の cDNA に対して、特異的 primer を用いて SYBR green based real time PCR を行う。この方法は、一般に市販されているキットと比して 1/10 のコストで可能であり、新規の miRNA についても可能であり、応用性が高い。また、Northern blotting は Acrylamide による PAGE を行い、semidry による electronic transfer にて membrane を作成する。probe は Sanger Institute の miR data base を用いて配列を確認の上作成し高感度の LNA 修飾を行う。

4. DNA methylation の解析

食道癌で特異的に発現が低下している miRNA について、そのプロモーター領域を同定し、その CpG island のメチル化について解析する。ヒト線維芽細胞の細胞株から genomic library を作製し miRNA の promoter 領域を cloning し、pGL3-promoter vector (Promega) の MCS に挿入する。その vector を HEK293 細胞へ transfection し、luciferase assay にてその main site を決定していく。食道癌切除標本の癌部・非癌部より抽出した DNA を用いて miRNA のプロモーター領域をターゲットとした MSP を

行い、癌部における hypermethylation の有無を検索する。また、食道癌細胞株についても MSP を施行し、CpG site の methylation を bisulfite sequencing を用いて確認する。

5. 食道癌細胞における miRNA の機能解析とターゲット遺伝子の同定

In-vitro において mature miRNA もしくは anistense-oligonucleotide を用いて食道癌細胞内へ transfection を行い、miRNA の gain of function もしくは loss of function の細胞を構築する。miRNA レベルの機能制御を軸に、癌細胞増殖・転移活性機能解析を行う。また microarray などによる網羅的解析により、遺伝子の発現の変化で間接ターゲットを予想することができる。また、Sanger Institute の Target Scan を用いて食道癌特異的 miRNA のターゲット遺伝子を予想し、pMIR-REPORT (Ambion) vector にターゲット遺伝子の 3' UTR を挿入し、Luciferase assay を行い、miRNA のターゲット遺伝子を同定していく。

6. DNA メチル化阻害剤による miRNA の up-regulation の検証

Methylation による miRNA の silencing が確認された食道癌細胞株に histone deacetylase (HDAC) inhibitor や DNMT inhibitor を作用させることにより、同定した miRNA の up-regulation がおこるか否かを real-time RT-PCR にて検証する。また、5 にて同定されたターゲット遺伝子の発現の変化を検討するとともに、細胞増殖や浸潤能の変化について検討する。

7. in vivo における治療応用の検証

食道癌細胞株に対して histone deacetylase (HDAC) inhibitor や DNMT inhibitor を作用させることにより miRNA のターゲット遺伝子の発現上昇が認められるか否かを検討する。また、これらの薬剤を作用させたときの細胞増殖活性や浸潤能の変化を検討する。また、食道癌細胞を移植した Xenograft model (増殖・転移) に対しての治療の応用について検証する。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌における DNA メチル化異常の解析と食道癌・胃癌における microRNA (miR) の機能解析に関して研究を行った。まず DNA メチル化異常の網羅的解析として新たに pyrosequencing technology を用いた LINE-1 のメチル化レベルの解析を行った。この結果、食道扁平上皮癌においては非癌部正常粘膜に比較して有意に LINE-1 の低メチル化が認められること、LINE-1 メチル化レベルの低下例は有意に予後不良であることを明らかにし報告した。このことは食道扁平上皮癌の発生および進展に DNA メチル化異常が重要な意味を持っていることを示唆する。

一方、miR の発現異常に関して、食道癌における miR-29c の高発現が食道癌の予後因子となることを明らかにした。また、血清中の miR-21 の発現を食道癌症例で検討し、食道癌患者では健常者に比較して血清中の miR-21 が有意に高値であること、化学療法の奏効例においては治療後の miR-21 が有意に低下し、治療効果のマーカーとなりうることを明らかにした。さらに食道癌患者と健常者の血清から exosome を抽出し、その中に含まれる miR-21 の発現レベルが食道癌患者において有意に高いことを明らかにした。miR の発現異常の意義に関しては、食道扁平上皮癌における miR-223 の高発現が ubiquitin ligase である FBXW7 の発現を制御することを明らかにした。FBXW7 は近年注目されている癌抑制遺伝子の一つであり、食道癌の発生および進展を解明する上で重要な知見と考えられる。胃癌においては miR-200b が ZEB-2 の発現を制御し、上皮間葉形質転換にかかわることを明らかにした。

以上、食道癌において DNA メチル化異常が高頻度に認められ、また global hypomethylation が食道癌の予後不良因子となることを示すことができた。また、食道癌・胃癌における様々な miR 発現の意義について、その機能的意義も含めて明らかにすることができたと考えている。

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 10 件)

(1) Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ida S, Nagai Y, Takatsugu I, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H

「Pyrosequencing Assay to Measure LINE-1 Methylation Level in Esophageal Squamous Cell Carcinoma」Annals of Surgical Oncology、査読有、印刷中、2012

(2) Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita

K, Saito S, Baba Y, Baba H

「MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma」Ann Surg Oncol、査読有、印刷中、2012

(3) Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H

「Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma」J Surg Oncol、査読有、印刷中、2012

(4) Watanabe M, Baba Y, Nagai Y, Baba H

「Minimally invasive esophagectomy for esophageal cancer; an updated review」Surg Today、印刷中、2012

(5) Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamaki K, Ohashi Y, Baba H

「Line-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma」Annals of Surgery、査読有、印刷中、2012

(6) Watanabe M, Nishida K, Kimura Y, Miyazaki M, Baba H

「Salvage lymphadenectomy for cervical lymph node recurrence after esophagectomy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus」Dis Esophagus、査読有、25 巻 62-6、2012

(7) Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Kamohara H, Baba H, Mimori K

「Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in esophageal squamous cell carcinoma」Br J Cancer、査読有、106 巻 182-188、2012

(8) Watanabe M, Nagai Y, Kinoshita K, Saito S, Kurashige J, Karashima R, Hirashima K, Sato N, Imamura Y, Hiyoshi Y, Baba Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Hayashi N, Baba H

「Induction chemotherapy with docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil for patients with node-positive esophageal cancer」Digestion、査読有、83 巻 146-152、2011

(9) Hiyoshi Y, 「MicroRNA-21 regulates proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma」. Clin Cancer Res 15、査読有、6 巻 1915-1922、2009

(10) Hiyoshi Y, 「p12cdk-2AP1 is associated with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.」Oncol Rep、査読有、22 巻 35-39、2009

〔学会発表〕(計 30 件)

- (1) 馬場祥史、「食道扁平上皮癌における LINE-1 メチル化レベルの網羅的解析 -Pyrosequencing technology を用いて-」、第 8 回日本消化管学会総会学術集会、2012 年 2 月 10 日、宮城県仙台国際センター
- (2) 蔵重淳二、「胃癌における microRNA-200family の発現と臨床病理学的検討」、第 84 回日本胃癌学会総会、2012 年 2 月 9 日、大阪府グランキューブ大阪
- (3) Iwagami S、「The association between smoking and LINE-1 hypomethylation (global DNA hypomethylation) in normal esophageal epithelium of patients with esophageal squamous cell carcinoma.」、ASCO 2012 Gastrointestinal Cancers Symposium、2012 年 1 月 19 日、San Francisco USA
- (4) Baba Y、「Prognostic significance of LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma」、ASCO 2012 Gastrointestinal Cancers Symposium、2012 年 1 月 19 日、San Francisco USA
- (5) 田中洋平、「食道癌患者の血清中のエクソソームが内包する microRNA 発現の検討」、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、愛知県名古屋国際会議場
- (6) 蔵重淳二、「胃癌における microRNA-200 b による浸潤転移機構の制御」、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、愛知県名古屋国際会議場
- (7) 木下浩一、「食道癌の発育進展における mTOR の関与と miRNA による制御」、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、愛知県名古屋国際会議場
- (8) Iwatsuki M、「The Identification of novel micro RNAs and Genes in bone marrow regulating gastric cancer metastasis」、the 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer、2011 年 9 月 22 日、グランキューブ大阪
- (9) Kurashige J、「MicroRNA-200b regulates Epithelial Mesenchymal Transition by targeting ZEB2 in Gastric Cancer」、the 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer、2011 年 9 月 22 日、グランキューブ大阪
- (10) 蔵重淳二、「胃癌における microRNA-200 b による浸潤転移機構の制御」、2011 年 7 月 1 日アクトシティ浜松 コンgressセンター・オークラアクトシティホテル浜松
- (11) 木下浩一、「食道癌予後因子としての miR-29c の発現の意義 / MicroRNA-29c expression as a new prognostic marker as esophageal cancer」、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26 日、誌上発表
- (12) 田中洋平、「食道癌患者血清から抽出し

- たエクソソーム内の microRNA の発現解析 / Expression profiling of micro-RNAs in exosomes extracted from human esophageal cancer serum」、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26 日、誌上発表
- (13) 蔵重淳二、「胃癌における microRNA-200b による癌浸潤転移の制御機構 / The miR-200b regulates epithelial to mesenchymal transition in gastric cancer」、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26 日、誌上発表
- (14) Baba Y、「Line-1 methylation level (global DNA methylation level) in gastric cancer」9th International Gastric Cancer Congress、2011 年 4 月 23 日、Seoul Korea
- (15) Kurashige J、「MicroRNA-200B regulates epithelial to mesenchymal transition in gastric carcinoma」、9th International Gastric Cancer Congress、2011 年 4 月 22 日、Seoul Korea
- (16) Kinoshita K、「MicroRNA-29c expression as a new prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma」、AACR102nd Annual Meeting 2011、2011 年 4 月 2 日、Orlando USA
- (17) Kurashige J、「Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma」、AACR102nd Annual Meeting 2011、2011 年 4 月 2 日、Orlando USA
- (18) 蔵重淳二、「腫瘍マーカーとしての microRNA の可能性」、JDDW2010 第 8 回日本消化器外科学会大会、2010 年 10 月 15 日、横浜市パシフィコ横浜
- (19) Kurashige J、「MicroRNA-21 and -26a are novel markers to predict the sensitivity of chemotherapy to esophageal squamous cell carcinoma」、12th World congress of the international society for diseases (第 12 回国際食道学会)、2010 年 9 月 15 日、鹿児島市城山観光ホテル
- (20) 蔵重淳二、「microRNA による食道扁平上皮癌抗癌剤効果予測」、第 64 回日本食道学会学術集会、2010 年 8 月 31 日~9 月 1 日、福岡県石橋文化ホール・石橋美術館
- (21) 蔵重淳二、「microRNA による食道癌抗癌剤効果予測の可能性」、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、「福岡県海峽メッセ下関
- (22) 木下浩一、「食道癌における microRNA 発現パターンと予後との相関」、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、「福岡県海峽メッセ下関
- (23) Kurashige J、「MicroRNA-21 and -26a are novel markers to predict the sensitivity to chemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma.」、AACR 101st Annual Meeting、2010 年 4 月 17-19 日、Washington

(24) Hiyoshi Y, 「Micro RNA-101 promotes apoptosis and suppresses proliferation in esophageal squamous cell carcinoma by repressing the polycomb group protein.」、AACR 101st Annual Meeting、2010年4月17-19日、Washington

(25) 日吉幸晴、「食道扁平上皮癌におけるEZH2の発現意義とmicroRNA-101によるEZH2の発現制御」、第110回日本外科学会、2010年4月10日、愛知県名古屋国際会議場

(26) 日吉 幸晴、「PDCD4の発現低下によって食道扁平上皮癌細胞が浸潤能が増加し予後不良となる」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、神奈川県パシフィコ横浜

(27) 日吉 幸晴、「食道扁平上皮癌におけるp12CDK2-AP1発現の意義」、第64回日本消化器外科学会総会、2009年7月16日、大阪府大阪国際会議場

(28) 平島 浩太郎、「食道扁平上皮癌におけるRAD001の有用性の検討」、第63回日本食道学会学術集会、2009年6月25日、神奈川県パシフィコ横浜

(29) Hiyoshi Yukiharu, 「MicroRNA-21 regulates proliferation and invasion in esophagus squamous cell carcinoma.」、AACR 100th Annual Meeting 2009、2009年4月18日、アメリカ Colorado Convention Center

(30) 日吉 幸晴、「食道扁平上皮癌におけるmicroRNAの発現・機能解析」第109回日本外科学会、2009年4月2日、福岡県福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 雅之 (WATANABE MASAYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80254639

(2) 研究分担者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20240905

(3) 蒲原 英伸 (KAMOHARA HIDENOBU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90398222