

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 4 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591706

研究課題名（和文）食道扁平上皮癌の新規癌抑制遺伝子としての EMP3 の同定と発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of EMP3 as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma and elucidation of its regulation mechanism.

研究代表者

野口 剛 (NOGUCHI TSUYOSHI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：20264335

研究成果の概要（和文）：本研究により、EMP3遺伝子が食道癌における新規癌抑制遺伝子である可能性を示した。特異性の高いEMP3抗体の策定を行い、同時にマイクロアレイによる遺伝子プロファイリング解析により、EMP3の新たな関連遺伝子候補を抽出した。さらに、EMP3発現制御機構解明のために必要な材料として、同遺伝子のプロモーター領域における複数のDeletion mutant（欠失変異体）を構築した。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrates the possibility of EMP3 as a candidate tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The conditions for EMP3 Immunohistochemistry were not known, so we tried to evaluate the specific conditions for the assay. We did a genome wide profiling analysis using oligonucleotide microarray, were EMP3 overexpression in ESCC cells showed novel candidate down-stream target genes. In order to assess the regulatory mechanisms of the EMP3 gene, we constructed deletion mutants in the proximal promoter region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：食道外科学・癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景
食道癌は全悪性腫瘍の中でも最も予後不良な癌の一つであり、その本体解明にむけた様々な研究がなされている。中でも癌の発生促進に関与

する癌抑制遺伝子の研究は進められており、TP53、CDKN2A、FHIT、RARB (RAR β 2)、APC、MGMT、CDH1 (E-cadherin)、TSLCI、RASSF1Aなどの癌抑制遺伝子と食道癌の発生日後と

の関連性を示唆する報告もあるが、未だ全容はあきらかでなく、未知の癌抑制遺伝子の存在も示唆される。*EMP3*は、神経芽細胞腫および神経膠腫において癌抑制遺伝子としての可能性が最近報告された遺伝子であるが (Alaminos M., et al. *Cancer Res.*, 65:2565-2571, 2005)、これまでに食道癌における癌抑制遺伝子としての報告はない。申請者は、網羅的遺伝子発現解析により食道癌細胞20細胞株において正常細胞に比し、普遍的かつ著名に発現低下を来たしている遺伝子群を抽出し、同遺伝子群の中に神経芽細胞腫および神経膠腫において癌抑制遺伝子としての可能性が最近報告された*EMP3*が含まれていることを確認した。そこで、*EMP3*の食道癌における新規癌抑制遺伝子としての解明を進め、以下の知見を得ている。1) 食道癌細胞株 (KYSE-170、-2270) への*EMP3*強制発現により細胞形態は変化し、細胞増殖が抑制される、2) 食道癌組織においては、正常組織と比較して*EMP3*発現レベルは必ずしも低下していない、3) *EMP3*低発現サンプルにおけるプロモーター領域 (転写開始点から413塩基上流までの領域)、高発現サンプルにおけるコード領域に*EMP3*発現レベルと関連性を持つ遺伝子変異は認めない、4) 食道癌細胞株において*EMP3*は高頻度にメチル化されており、発現制御機構としてプロモーター領域のメチル化の関与が証明され、さらにTSA (HDAC阻害剤)投与により濃度依存的に*EMP3*の発現が抑制されたことから、何らかのレプレッサーがプロモーター領域に作用することにより発現抑制を来していることが示唆された。一方、食道癌組織では殆どメチル化されていない、5) 食道癌組織における*EMP3*発現レベルにより2群に分けた予後の比較では、無病生存期間においては同等であった ($P = 0.72$) が、再発後生存率において高発現群は有意に予後良好であった ($P = 0.05$)。このことは、*EMP3*の不活化が、早期の growth advantageを賦与するのではなく、無限増殖を促進している可能性を示唆している。以上の結果より、*EMP3*は、食道癌の多段階発癌過程において癌化の制御ではなく、癌細胞が株化する過程、すなわち不死化に関わる癌抑制遺伝子である可能性があると考えている。

2. 研究の目的

特異性の高い *EMP3* 抗体の作製・設定後、原発巣及び転移巣のホルマリン固定パラフィン包埋標本の免疫組織化学染色を行い、臨床情報解析から、*EMP3* 遺伝子が食道癌において不死化を制御する癌抑制遺伝子であるか否かを明らかにする。また、既に樹立した *EMP3* 強制発現クローンをを用いた遺伝子プロファイリング解析により *EMP3* による食道癌細胞増殖抑制に関わる分子機構を明らかにするとともに、不死化食道癌細胞に存在すると考えられるメチル化以外の *EMP3* 発現抑制機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 特異性の高い *EMP3* 抗体の策定と臨床検体の集積: 既存する *EMP3* に対する一次抗体に関しては、免疫組織化学染色での十分な情報が得られていない。そこで、同抗体を用い培養細胞、臨床検体組織を用いた免疫組織化学染色を試み、*EMP3* 発現評価に対する有用性を検討する。既存抗体で十分な結果が得られないようであれば、より特異性の高い *EMP3* 抗体の作製・設定を行う。また、同時に食道癌臨床検体及び情報の集積を進める。

(2) *EMP3* による食道癌細胞増殖抑制に関わる分子機構の解明: 既に樹立している細胞増殖能の低下を来たした *EMP3* 強制発現クローンと細胞増殖能に変化のないコントロールベクター導入クローンをを用い、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる遺伝子プロファイリング解析を行う。さらに、増殖抑制に差がある *EMP3* 強制発現クローンも樹立済みであり、このクローン間の遺伝子プロファイルも比較する。この結果を Ingenuity Pathways Analysis (IPA) によるパスウェイ解析で解析し、関連遺伝子及び分子機構を明らかにする。

(3) *EMP3* 発現制御機構の解明: *EMP3* 発現制御機構としてプロモーター領域のメチル化が関連しているという報告 (Alaminos M., et al. *Cancer Res.*, 65:2565-2571, 2005) がある一方で、メチル化が少ないにも関わらずその発現が低下している食道癌細胞株が存在すること、さらに TSA 処理した食道癌細胞 (HEEC-1) のみならず、食道癌以外の細胞株 (SV-11、TF-1) においても処理した TSA の濃度依存的に *EMP3* の発現が抑制されたことを報告した (Fumoto S, Noguchi T, et al. *Cancer Letters*, in press, 2008.)。このことは、プロモーター領域のメチル化以外の発現制御機構の存在を示唆している。そこで、プロモーター領域における発現制御因子の作用部位の塩基配列からそのレプレッサーを策定することを目的にプロモーター領域 (転写開始点から約 2000 塩基上流まで) における複数の Deletion mutant を作製する。

4. 研究成果

(1) 特異性の高い *EMP3* 抗体の策定と臨床検体の集積: 既存する *EMP3* に対する一次抗体に関しては、免疫組織化学染色での十分な情報が得られていなかった。そこで、臨床検体組織を用いた同抗体の適切な免疫組織化学染色の条件設定を行った。また、同時に多数のホルマリン固定食道癌臨床検体及びその臨床情報の集積を行った。

(2) EMP3 による食道癌細胞増殖抑制に関わる分子機構の解明: EMP3 発現に関連する遺伝子の新たなネットワークの解明を目指し、既に樹立している細胞増殖能の低下を来した複数の EMP3 強制発現クローンと細胞増殖能に変化のないコントロールベクター導入クローンをを用い、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる遺伝子プロファイリング解析を行った。この結果を GeneSpring GX11 にて解析し、新規関連候補遺伝子としての CSH1 (Chorionic Somatomammotropin Hormone 1) の抽出に至った。

(3) EMP3 発現制御機構の解明: EMX2 のプロモーター領域における発現制御因子の作用部位の塩基配列からそのレプレッサーを策定するため、プロモーター領域における複数の Deletion mutant の構築に至った。

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 18 件)

① Cytokeratin 7 is a Predictive Marker for Survival in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Naohide Oue, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 8 名, 2 番目), *Ann Surg Oncol.*, 査読有, Epub ahead of print, DOI: 10.1245/s10434-011-2175-4, (2011)

② Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. Tetsutaro Hayashi, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 9 名, 8 番目), *Histopathology*, 査読有, 59(4):710-721, (2011)

③ Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. Akiko Kuroda, Tsuyoshi Noguchi, Masatsugu Moriyama. (他 14 名, 4 番目), *PLoS One.*, 査読有, 6(7): e22313, (2011)

④ Cytoarchitecture of the lamina muscularis mucosae and distribution of the lymphatic vessels in the human stomach. Yuichi Akashi, Tsuyoshi Noguchi, Kaoruko Nagai, Katsunobu Kawahara, Tatsuo Shimada. *Med Mol Morphol.*, 査読有, 44(1):39-45, (2011)

⑤ Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype. Katsuhiko Anami, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 7 名, 3 番目), *Pathol.*, 査

読有, 221(3):275-84, (2010)

⑥ Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. Miho Matsuda, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 8 名, 3 番目), *Pathol Int.*, 査読有, 60(10): 673-80, (2010)

⑦ Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma. Naoya Sakamoto, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 5 名, 3 番目), *Cancer Sci.*, 査読有, 101(4): 1038-44, (2010)

⑧ Immunostaining of gastric cancer with neuroendocrine differentiation: Reg IV-positive neuroendocrine cells are associated with gastrin, serotonin, pancreatic polypeptide and somatostatin. Kazuhiro Sentani, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 5 名, 3 番目), *Pathol Int.*, 査読有, 60(4): 291-7, (2010)

⑨ MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. Yoshiyuki Tsukamoto, Tsuyoshi Noguchi, Masatsugu Moriyama. (他 8 名, 3 番目), *Cancer Res.*, 査読有, 70(6): 2339-49, (2010)

⑩ Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization. Masahiro Uchida, Tsuyoshi Noguchi, Masatsugu Moriyama. (他 17 名, 13 番目), *J Pathol.*, 査読有, 221(1): 96-105, (2010)

⑪ Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients. Naohide Oue, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他 9 名, 3 番目), *Int J Cancer.*, 査読有, 125(10):2383-92, (2009)

⑫ EMP3 as a candidate tumor suppressor gene for solid tumors. Shoichi Fumoto, Keiji Tanimoto, Eiso Hiyama, Tsuyoshi Noguchi, Masahiko Nishiyama, Keiko Hiyama. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 査読有, 13(7): 811-822, (2009)

⑬ EMP3 as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma. Shoichi Fumoto, Keiko Hiyama, Keiji Tanimoto, Takuya Noguchi, Jun Hihara, Eiso Hiyama, Tsuyoshi Noguchi, Masahiko Nishiyama, *Cancer Letters*, 査読有, 274: 25-32, (2009)

〔学会発表〕(計 29 件)

- ① 野口 剛, 胸部食道癌切除再建後高
胸腔内吻合-縫合不全 O を目指して. 第 69 回
日本癌学術集会第 66 回日本消化器外科学会総
会, 2011.7.13, 名古屋.
- ② 麓 祥一, Identification of *EMX2* as
a novel prognostic marker for esophageal
squamous cell carcinoma. 第 69 回日本癌学術
集会, 2010.9.23, 大阪.
- ③ Shoichi Fumoto, Identification of a
novel prognostic marker for esophageal
squamous cell carcinoma. Am. Assoc. Cancer
Res. 101th Annual Meeting 2010, 2010.4.19,
Washington, DC, USA.
- ④ Keiji Tanimoto, Activation of the
hypoxia-inducible factor-1 in chondrocytes.
Keystone Symposia, Hypoxia: Molecular
Mechanisms of Oxygen Sensing and Response
Pathway, 2010.1.22, Keystone, Colorado.
- ⑤ Keiko Hiyama, Lung carcinogenesis
model: Increase of malignant potential
occurs in transformed bronchial epithelial
cells concomitant with TERT upregulation.
The 14th Congress of the Asian Pacific Society
of Respiriology, 2009.11.16, Seoul, Korea.
- ⑥ 麓 祥一, Genes controversially
associated with chemosensitivity in vitro
and patient prognosis in vivo in esophageal
cancer. 第 68 回日本癌学術集会, 2009.10.3,
横浜.
- ⑦ 麓 祥一, *EMP3* の臨床的意義とその
発現制御機構: 食道癌と他がん種の比較. 第 63
回日本食道学会学術集会, 2009.6.25, 横浜.
- ⑧ 谷本圭司, DNA 修復能に影響を与える
生体内環境因子: 低酸素環境. 第 50 回原子爆弾
後障害研究会, 2009.6.7, 広島.
- ⑨ 麓 祥一, 食道癌における新規癌抑制
遺伝子 *EMP3* の同定と放射線感受性因子として
の検討. 第 50 回原子爆弾後障害研究会,
2009.6.7, 広島.
- ⑩ Shoichi Fumoto, Identification of
novel drug-response determinants for 5-FU
and CDDP in esophageal squamous cell
carcinoma (ESCC). Am. Assoc. Cancer Res.
100th Annual Meeting 2009, 2009.4.22, Denver,
CO, USA.
- ⑪ Keiji Tanimoto, Molecular
mechanisms of degradation of the pVHL, tumor
suppressor gene product, by a novel oncogenic
protein, UBE2S. Am. Assoc. Cancer Res. 100th
Annual Meeting 2009, 2009.4.21, Denver, CO,

USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 剛 (NOGUCHI TSUYOSHI)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号: 20264335

(2) 研究分担者

麓 祥一 (FUMOTO SHOICHI)
広島大学・広島大学病院・助教
研究者番号: 00532631

北野 正剛 (KITANO SEIGO)
大分大学・学長
研究者番号: 90169871

衛藤 剛 (ETOH TSUYOSHI)
大分大学・医学部・講師
研究者番号: 00404369

檜山 桂子 (HIYAMA KEIKO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准
教授
研究者番号: 60253069

谷本 圭司 (TANIMOTO KEIJI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助
教
研究者番号: 90335688

(3) 連携研究者

なし