

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390320

研究課題名(和文)次世代質量分析と網羅的遺伝子発現解析による消化器癌の新規バイオマーカーの研究

研究課題名(英文)Detection of gastrointestinal cancer biomarkers by next-generation mass spectrometry and comprehensive gene expression analysis

研究代表者

嶋田 裕 (Shimada, Yutaka)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30216072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：次世代質量分析器では期待した網羅的蛋白質解析は不向きであり、解析を血中miRNA解析に絞り込んだ。個体差による判定困難性を排除するために、担癌状態と非担癌状態において生体状態に最も差が無いと考えられる食道癌EMR症例を対象とした。現在まで3施設での43例の登録が終了し、31症例についてEMR前後の解析が終了しており、バイオマーカー候補として治療前後で有意差のある11miRNAを見いだした。今後、進行食道癌における治療前検体30検体での解析を行い、早期癌症例と進行癌症例との対比から、バイオマーカーとしての有用性を評価する予定である。

研究成果の概要(英文)：We here evaluated a next-generation mass spectrometer and found that it not suitable for a comprehensive protein analysis of blood. Therefore, we performed a microRNA analysis of blood. To exclude individual differences between patients, we focused on esophageal mucosal cancer patients who were scheduled to undergo endoscopic mucosal resection (EMR) in the present study. Forty-three patients were recruited from 3 institutes. We analyzed the expression of miRNAs in pre-treatment as well as post-treatment blood samples that were collected from 31 patients. Significant differences were observed in the expression of 11 miRNAs between pre-treatment and post-treatment samples. We will analyze these miRNAs in 30 patients with advanced esophageal cancer in a future study and evaluate their efficacy as biomarkers of esophageal cancer.

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：バイオマーカー 食道癌 miRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の死亡原因の第一位は癌であり、中でも消化管癌は全癌の約 1/2 を占めており年々増加している。近年の画像診断、新規薬剤、手術手技、術後管理の進歩により着実にその治療成績も向上しているが、未だ不十分である。この現状を打破するためには癌の早期発見が不可欠であるが、癌の早期発見に有効なバイオマーカーは殆どないと言える。

(2) これに対して、質量分析器は微量タンパク質の解析を可能とし、タンパク質 3000 研究などが行われ、多くの新規タンパク質が同定されたが、その解析能は、癌の新規バイオマーカーを同定するには至らなかった。しかしながら開発中の次世代質量分析器によりようやく癌の新規バイオマーカーの同定が可能となると期待されている。

(3) 一方、網羅的遺伝子発現解析では、我々はナノテクノロジーによる次世代高感度チップ(従来比百倍程度の高感度)の開発を企業との共同研究(経済産業省、バイオ・IT 融合機器開発プロジェクト NEDO)で行った。この 3D チップをさらに、miRNA 発現解析にも応用し、研究協力者の国立がんセンター落谷孝広らにより血中 miRNA の網羅的発現解析が可能となり、血液中 miRNA のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。(JBC 2010)。我々も、ホルマリン固定保存サンプル(FFPE)からの保存微量検体からの網羅的 miRNA 発現を可能として、報告してきた。(2009、2010 癌学会ランチョンセミナー、2010 病理学会ランチョンセミナー講演)。以上のことから、次世代質量分析と網羅的遺伝子発現解析による消化器癌の新規バイオマーカーの研究を計画した。

(4) これまでの種々の検討から、早期癌では変化が微量であることから、患者間の個体差に微量な変化が隠されてしまう事、手術などの大きな侵襲では侵襲に対する個体差が検出されてしまう事が考えられ、対象患者の選定に工夫が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、血液および内視鏡採取組織を用いて質量分析を中心としたタンパク質解析および miRNA 解析を中心とした網羅的遺伝子発現解析を行い、第一に消化管癌の新規バイオマーカーの同定を多施設共同研究で目指すものである。現行のいわゆる腫瘍マーカーは感度が低いため癌の早期発見や再発の早期発見には殆ど無力であるが、次世代質量分析器はこれまでより 1000 倍の高感度であることからより微量な癌特異的マーカーの同定が行えるものと期待される。まず食道早期癌に対する粘膜切除を行い、処置前後の血液を採取し担癌状態と非担癌状態での血液を質量分析および miRNA マイクロアレイにて比較検討することにより、食道癌特異的バイオマーカーの同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究は多施設共同研究とし、対象患者は内視鏡にて完全切除が期待される食道早期癌で同時性他臓器との重複癌は除外する。内視鏡切除が可能であれば食道内多発、前がん病変の有無および患者の全身状態は問わない。

(2) 内視鏡下に腫瘍切除を行い、病変部を採取し、病理検査を行う。

(3) 治療前血液、治療後 1 ヶ月の血液をそれぞれ試薬含有スピッツで 5 ml 採取し、血漿を分離し、連結可能匿名化したのちにマイナス 20 度以下で保存する。

(4) 連結可能匿名化された患者の臨床病理学的経過及び所見を研究代表者の施設に報告する。

(5) 検体を定期的に研究代表者の施設に送付して網羅的 miRNA 解析を行い、担癌状態と非担癌状態で発現差のある miRNA を同定する。質量分析予定の検体は前処理を行い研究代表者の施設で解析まで保存する。

(6) 次世代質量分析システム完成後に新規食道癌バイオマーカーを同定する。

(7) 同定された新規バイオマーカーの切除腫瘍での発現確認を病理検体で行う。

(8) 我々の開発した FFPE サンプルからの miRNA 抽出法と解析法にて、切除検体からの miRNA 解析を行い、血中より同定された miRNA との比較検討を行う。

(9) 同定された新規バイオマーカーと臨床病理学的所見との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) 前述の如く、個体差による判定困難性を排除するために、最小限の侵襲で治療前後の解析を行える EMR 症例を対象とした。同時性他臓器との重複癌は除外する患者を対照とした。なお内視鏡切除が可能であれば食道内多発、前がん病変の有無および患者の全身状態は問わないこととした。

(2) 次世代質量分析器では期待した網羅的蛋白質解析は不向きであることから、絞り込んだターゲットとして我々が以前から注目していた FGFR1 の蛋白解析を目指した。しかしながら感度が低く、年度内での解析は無理と判断され、今後の継続解析とすることとした。

(3) そこで、解析を血中 miRNA 解析に絞り込むこととし、現在まで 3 施設での 43 例の登録が終了し、40 例のサンプルの京大への搬送が終了している。血中 miRNA の解析は約 800 の miRNA が搭載されているチップにて網羅的に治療前後のサンプルがそろった 31 症例について EMR 前後の解析が終了しており、バイオマーカー候補として治療前後で有意差のある 11miRNA を見いだした。さらに今後、追加 7 例の解析予定であり、精度が高まるものと考えている。同時並行として、進行食道癌における治療前検体 30 検体での血中 miRNA

解析を予定しており。早期癌症例と進行癌症例との対比から、バイオマーカーとしての有用性を評価する予定であるが、この場合には患者事情により治療前検体しかえられなかった5症例も追加して解析予定である。

(4) 3施設の共同研究で開始し、症例数確保のために、1施設追加を試みたが、倫理委員会での承認が得られず、断念した。この為、最低限50症例の収集を目指し、2014年12月まで検体収集の継続予定である。

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12件)

(1) Tsuchiya S, Fujiwara T, Sato F, Shimada Y, Tanaka E, Sakai Y, Shimizu K, Tsujimoto G. MicroRNA-210 Regulates Cancer Cell Proliferation through Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1 (FGFRL1) *J Biol Chem* 2011, 286: 420-428

(2) Ito T, Sato F, Kan T, Cheng Y, David S, Agarwal R, Paun BC, Jin Z, Olaru AV, Hamilton JP, Selaru FM, Yang J, Matsumura N, Shimizu K, Abraham JM, Shimada Y, Mori Y, Meltzer SJ. Polo-like Kinase 1 regulates cell proliferation and is targeted by miR-593* in esophageal cancer *Int J Cancer* 2011, 129: 2134-2146

(3) Imanaka Y, Tsuchiya S, Sato F, Shimada Y, Shimizu K, Tsujimoto G. MicroRNA-141 Confers Resistance to Cisplatin-induced Apoptosis by Targeting YAP1 in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J. Hum. Genet* 2011, 56: 270-276

(4) Osawa S, Shimada Y, Sekine S, Okumura T, Nagata T, Fukuoka J, Tsukada K. MicroRNA profiling of gastric cancer patients from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Oncology letters* 2011, 2: 613-619

(5) Hasina R, Mollberg N, Kawada I, Mutreja K, Kanade G, Yala S, Surati M, Liu R, Li X, Zhou Y, Ferguson BD, Nallasura V, Cohen KS, Hyjek E, Mueller J, Kanteti R, El Hashani E, Kane D, Shimada Y, Lingen MW, Husain AN, Posner MC, Waxman I, Villafior VM, Ferguson MK, Varticovski L, Vokes EE, Gill P, Salgia R. Critical role for the receptor tyrosine kinase EPHB4 in esophageal cancers. *Cancer Res* 2012, 73, 184-194

(6) Shimada Y, Okumura T, Sekine S, Moriyama M, Sawada S, Matsui K, Yoshioka I, Hojo S, Yoshida T, Nagata T, Fukuoka J, Tsukada K. Expression Analysis of iPS Cell Inductive Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Tissue Microarray. *Anticancer Res* 2012, 32: 5507-5514

(7) Shimada Y, Okumura T, Hori R, Moriyama M, Sekine S, Nagata T, Nomoto K, Fukuoka J, Tazawa K, Tsukada K. Possible involvement of glucose transporter 3 and 4 in esophageal leiomyoma with unusual high uptake of fluorine-18-fluorodeoxyglucose. -Three case reports- *Esophagus* 2013, 10: 34-41

(8) Shimada Y, Okumura T, Sekine S, Moriyama M, Hojo S, Matsui K, Sawada S, Nagata T, Fukuoka J, Tsukada K. Clinicopathological significance of deoxycytidine kinase expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology* 2013, 1: 716-720

(9) Shimada Y, Okumura T, Hashimoto I, Matsui K, Shibuya K, Hojo S, Nagata T, Hayashi S, Tsukada K. Barrett's adenocarcinoma arising 30 years after a Nissen fundoplication. *Esophagus* 2013, 10, 179-183

(10) Shimada Y, Okumura T, Nagata T, Hashimoto I, Sawada S, Yoshida T, Fukuoka J, Shimizu K, Tsukada K. Expression analysis of fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1) in esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 2014, 11:48-53.

(11) Omura T, Shimada Y, Nagata T, Okumura T, Fukuoka J, Yamagishi F, Tajika S, Nakajima S, Kawabe A, Tsukada K. Relapse-associated microRNA in gastric cancer patients after S-1 adjuvant chemotherapy. *Oncol Rep.* 2014, 31:613-618.

(12) Okumura T, Shimada Y, Moriyama M, Takei Y, Omura T, Sekine S, Nagata T, Shimizu K, Tsukada K. MicroRNA-203 inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma with restored epithelial tissue architecture in vivo. *Int J Oncol.* 2014, 44:1923-32.

[学会発表](計8件)

(1) Okumura T, Shimada Y, Sekine S, Moriyama M, Omura T, Kamiyama K, Hori R, Watanabe T, Hojo S, Matsui K, Yoshioka I, Sawada S, Yoshida T, Nagata T, Tsukada K. Identification of microRNAs which are differentially expressed in p75NTR-positive esophageal squamous cell carcinoma. International surgical week 2011. 2011.8.30 Yokohama

(2) Shimada Y, Okumura T, Osawa S, Sawada S, Nagata T, Fukuoka J, Tsukada K. Micro-RNA profiling of esophageal squamous cell cancer and gastric cancer from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens. 13th world congress on gastrointestinal cancer. 2011.6.23 Barcelona

(3) Shimada Y, Okumura T, Sekine S, Moriyama M, Hojo S, Sawada S, Yoshioka I, Nagata T, Fukumoto J, Tsukada K. Clinicopathological significance of deoxycytidine kinase expression in esophageal squamous cell carcinoma. 47th ESSR Annual Congress. 2012.6.8. Lille (France)

(4) Shimada Y, Okumura T, Hori R, Moriyama M, Sekine S, Nagata T, Nomoto K, Fukuoka J, Tazawa K, Tsukada K. Possible involvement of glucose transporter 3 and 4 in esophageal leiomyoma with unusual high uptake of fluorine-18-fluorodeoxyglucose. The 2012 ISDE congress. 2012.10-16, Venice (Italy)

(5) Okumura T, Shimada Y, Sekine S, Moriyama M, Omura T, Kamiyama K, Hori R, Watanabe T, Hojo S, Matsui K, Yoshioka I, Sawada S, Yoshida T, Nagata T, Tsukada K. Identification of microRNAs which regulate stem cell property in esophageal squamous cell carcinoma. The 2012 ISDE congress. 2012.10-16, Venice (Italy)

(6) Shimada Y, Okumura T, Matsui K, Yoshioka I, Sawada S, Yoshida T, Nagata T, Tsukada K. Successful enucleation of esophageal leiomyoma in the prone position. International surgical week ISW 2013 Helsinki 2013.8.27

(7) Shimada Y, Moriyama M, Okumura T, Sekine S, Sawada S, Matsui K, Hojo S, Shibuya K, Yoshioka I, Yoshida T, Nagata T, Tsukada T. Newly established Barrett's adenocarcinoma cell line (TYAE-1). Annual meeting of American Association for

Cancer Research. Washington DC 2013.4.9

(8) Shimada Y, Okumura T, Nagata T, Hashimoto I, Sawada S, Yoshida T, Shimizu K, Tsukada K. Expression analysis of fibroblast growth factor receptor like 1 (FGFRL1) in esophageal cancer. 48th Congress of European Society for Surgical Research. 2013.5.30 Istanbul

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

嶋田 裕 (Shimada Yutaka)
京都大学・大学院薬学研究科・客員准教授
研究者番号：30216072

(2)研究分担者

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

奥村知之 (Okumura Tomoyuki)
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：10533523

有馬 美和子 (Arima Miwako)
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・副部長
研究者番号 00312950

安部 哲也 (Tetsuya Abe)
愛知県がんセンター・研究所・医長
研究者番号 90378092

門馬 久美子(Monma Kumiko)
東京都立駒込病院・内視鏡科部長
研究者番号 70509471

(3)連携研究者
辻本豪三(Tsujimoto Gozo)
京都大学薬学研究科(研究院)・教授
研究者番号 80172013