

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591843

研究課題名(和文)食道癌放射線治療成績向上のための放射線感受性制御microRNAと遺伝子の解明

研究課題名(英文)Analysis of microRNA and Gene regulating radiosensitivity improving of radiotherapy for esophageal cancer

研究代表者

平川 雅和(Hirakawa, Masakazu)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：20380454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株のマイクロアレイで、放射線感受性を制御する候補miR hsa-miR-203a, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-205-5p を同定した。パブリックデータベースCancer cell line encyclopediaのgene expression array データで、Gene Set Enrichment analysisで、上記3miRのうちのmiR-203aの発現は放射線感受性株TE9において放射線抵抗性株TE1より有意に高く、miR-203aは食道扁平上皮癌の放射線感受性の新規バイオマーカー、治療標的因子としての可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：On microarray for squamous cell carcinoma cell line established from esophageal cancer, miR hsa-miR-203a, hsa-miR-27a-3p and hsa-miR-205-5p were detected for candidate regulating radiosensitivity. On Gene Set Enrichment analysis based on Cancer cell line encyclopediaのgene expression array data, miR-203a was significantly higher expressed in radiosensitive esophageal cancer cell culture (TE9), compared to other esophageal cancer cell cultures. MiR-203a might be new bio-marker regulating radiosensitivity of esophageal cancer.

研究分野：悪性腫瘍に対する低侵襲治療

キーワード：食道癌 放射線治療 MicroRNA 新規バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景
 局所進行食道癌症例における放射線の抗腫瘍効果を予測する因子を明らかにすることは臨床的に極めて有用である。近年、多くの遺伝子の転写後調節因子であり、癌組織中で安定した発現を示す **microRNA (miR)** が知られるが、**放射線科感受性を制御する microRNA(miR) および miR-遺伝子 pathway について、包括的かつ統合的に解析した研究はこれまでにない。** 現存する **micro RNA(miR)** は総数約 800 個程度であり約 2 万 5 千以上におよぶ遺伝子群を多面的に制御している [Science 2008]。様々な放射線感受性関連機構で重要な役割を担う遺伝子・タンパク群が存在するが、**放射線感受性における重要な miR および miR-制御遺伝子 pathway の同定は、感受性・抵抗性を効率よく制御しうる「真の標的因子」となることが期待され、臨床的意義を有することを確信している。**

2. 研究の目的
 本研究では放射線耐性食道癌株化細胞と当院外科食道癌症例を対象として **microRNA および遺伝子マイクロアレイを用いて、真の放射線治療抵抗性予測可能な miR-遺伝子 pathway とその分子機構** を明らかにし、最終的には、食道癌の放射線化学療法の新たな治療標的パスウェイの同定を目的とする。

3. 研究の方法
「食道癌放射線治療成績向上のための放射線感受性制御 micro RNA と遺伝子の解明(基盤 C 課題番号 23591843,平成 23-25 年)」 の助成をいただき、食道扁平上皮癌の放射線感受性に関連する miR のを検索し、新規バイオマーカー、治療標的因子の可能性につき、検討した。

4. 研究成果
 食道癌細胞株に放射線照射を施行し、MTT 実験で、放射線感受性群 (TE1,4,14)、抵抗性群 (TE5,6,10,11,15) に分類し、各群において miR および遺伝子マイクロアレイを施行したが、有用な miR を明らかとならなかった。事件条件を変更して、再度放射線

抵抗性、感受性に関する MTT 実験を再施行した。放射線感受性細胞株 TE9,抵抗性細胞株 TE1 を再決定した。

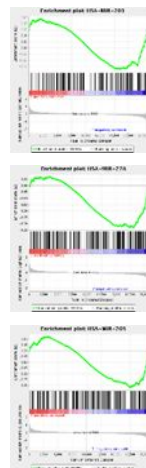
放射線感受性細胞株 TE9,抵抗性細胞株 TE1 について、マイクロアレイを実施し、**放射線感受性を制御する候補 miR**

hsa-miR-203a,
hsa-miR-27a-3p,
hsa-miR-205-5p を In vitro に

において同定した(未発表)。これらの miR の食道扁平上皮癌の放射線感受性の報告はなく、新規バイオマーカー、治療標的因子としての可能性が期待される。

図 食道癌細胞株 TE1(放射線耐性群)と TE9(放射線感受性群)での miR 発現検定。

	TE1	TE9	fold change	GSEA p-value
hsa-miR-203a	40.4	166.4	4.12	0.045
hsa-miR-27a-3p	292.8	832.1	2.84	0.014
hsa-miR-205-5p	672.8	1563.4	2.32	0.036



パブリックデータベース Cancer cell line encyclopedia の gene expression array データで、Gene Set Enrichment analysis (GSEA) 施行。上記 3miR の標的遺伝子群の発現は TE9 において他の細胞より有意に低い。パブリックデータベース Cancer cell

line encyclopedia の gene expression array データで、Gene Set Enrichment analysis で、上記 3miR のうちの miR-203a の発現は放射線感受性株 TE9 において放射線抵抗性株 TE1 より有意に高く、miR-203a は食道扁平上皮癌の放射線感受性の新規バイオマーカー、治療標的因子としての可能性が期待される。

食道癌細胞株 (TE1 vs. TE9) の microRNA アレイの結果

TE1 (放射線抵抗株):

miR-203a 低発現

TE9 (放射線感受性株):

miR-203a 高発現

TE1 に miR-203a を強制発現をさせると、放射線抵抗性 → 感受性になるか検討

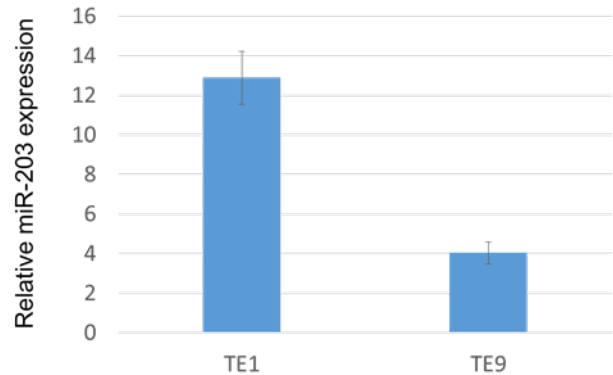
TE9 の miR-203a 発現を阻害すると、放射線感受性 → 抵抗性になるか検討

上記 2 種類の細胞株以外でも、miR-203a 発現を変化させることで放射線感受性が変化するか検討

~ の実験が上手くいった場合、食道扁平上皮癌放射線治療の臨床症例で感受性 vs. 抵抗性群で miR-203a 発現が異なるか検討

2014 年 12 月、当院で放射線科・外科凍結保存されていた TE1、TE9 を用いて、細胞株の miR-203a 発現を PCR (TaqMan MicroRNA miR-203a-specific primers:

Applied Biosystems 社、発現値は U6 発現で標準化) で調べたところ、TE1 > TE9 でした。

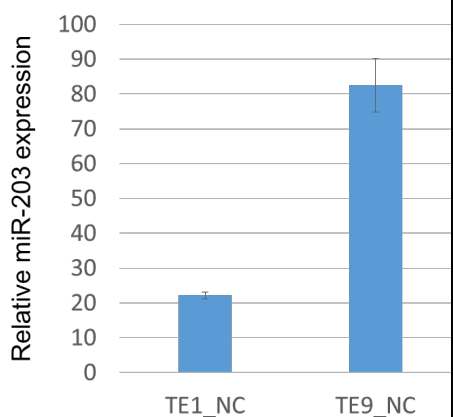


これはマイクロアレイの結果と逆であり、この凍結保存された細胞株を実験で用いると問題ありと判断しました。

細胞継代や凍結保存により、細胞の性質に変化を生じた可能性があります。

近年、論文投稿規定で「購入 6 ヶ月以内の細胞株を実験に用いること」や、「細胞株の購入証明を提出」等、細胞株に対する規制も厳しくなっているため、2015 年 1 月に理研より新たに細胞株を購入し、細胞を増殖させ 3 月より実験を再開しました。その間に次のスライドで示す miR-mimic 投与薬剤至適濃度を、細胞株で検討していました。

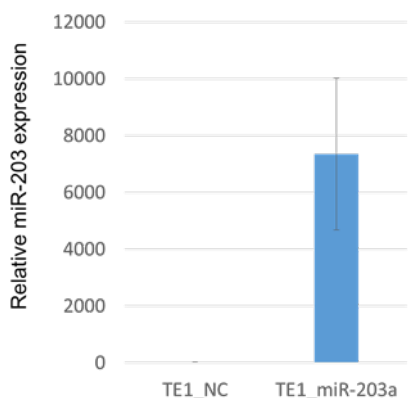
なお、新規購入の細胞株では、miR-203 の発現は、TE9 > TE1 であり (TE9 が 4 倍程度高い) アレイの結果と同じでした。



TE1 に miR-203a を強制発現をさせると、放射線抵抗性 → 感受性になるか検討

TE1 細胞株に、mirVana miR-203a mimic (Applied Biosystems 社、最終濃度 30nM) と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Life Technologies) を用いて Transfection を実施し、miR-203a 強制発現 TE1 細胞株を樹立。

発現値は、mirVana miRNA mimics Negative control を投与した TE1 と比較して、平均で約 332 倍 (7343÷22.12) となりました。



以前 (2012 年頃) 多くの食道癌細胞株に照射実験したと

きは、MTT assay で簡易的に放射線感受性を評価していましたが、放射線感受性評価でよく施行されるコロニー形成法で、放射線感受性を評価することにしました。

TE9 の miR-203a 発現を阻害すると、放射線感受性 → 抵抗性になるか検討

TE9 細胞株に、mirVana miR-203a inhibitor (Applied Biosystems 社) と Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen Life Technologies) を用いて Transfection を実施しましたが、miR-203a 発現低下 TE9 細胞株を樹立できていない。

総括

助成いただいた研究費を使用した実験にて、食道癌細胞株において、放射線感受性に関与する MicroRNA として、miR-203a が候補として考えられた。In Vivo での miR-203a 強制発現、抑制細胞株に対する放射線照射の実験まで施行し、miR-203a の放射線感受性の新規バイオマーカーおよび新規治療対象因子となりうるかの可能性の探索を施行中である。最終的には、放射線感受性実験の条件調整中での最終報告とさせていただくこととなる。今後は、平成 26 年度 基盤研究(C) (課題番号 26461893、研究課題名：食道癌放射線治療新規標的として microRNA の InVivo と臨床症例の統合解析) を助成いただき、さらに、本研究の更なる実験進行中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
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

平川雅和 (Hirakawa Masakazu)
九州大学病院別府病院放射線科准教授
研究者番号：20380454

(2) 研究分担者

中村和正 (Nakamura, Katsumasa)
九州大学 / 大学病院 / 准教授
研究者番号：20284507

三森功士 (Mimori koushi)
九州大学病院別府病院外科教授
研究者番号：50322748

(3) 連携研究者

宮野悟 (Miyano satoru)
東京大学 医科学研究所 教授
研究者番号：50128104