

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591920

研究課題名(和文) 消化器癌幹細胞と微小環境との相互作用に関する治療標的マイクロリボ核酸の探索

研究課題名(英文) Involvement of miRNAs in the interaction between cancer stem cells and tumor micro-environment

研究代表者

奥村 知之 (Okumura, Tomoyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10533523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株にmiR-203発現ベクターを導入したところp63発現増強を伴うp75NTR陽性細胞数は増加した。p75NTR陰性細胞ではp63が減弱しインボルクリンが増強した。コロニ形成能は低下しマウス皮下移植腫瘍は有意に縮小し重層扁平上皮構造を示し中心に基底膜分子ラミニンとp75NTRの発現を認めた。食道扁平上皮癌細胞株においてmir203導入によりp75NTR陽性細胞の自己複製が維持されつつ分化が誘導され腫瘍抑制効果を認めた。mir203導入により癌幹細胞の悪性度が低下した可能性が考えられ、癌幹細胞を標的とした新規治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our investigation establishing stable clones from ESCC cell lines with induced miR-203 expression resulted in significant growth inhibition in vitro and in vivo. In p75NTR-negative cells, the expression of p63 was down-regulated and involucrin was up-regulated. Small foci were observed in mouse xenograft tumors with stratified squamous differentiation. The expression of basement membrane protein laminin was localized at the center of the foci and p75NTR-positive cells resided at the basal layer. Our cDNA microarray analysis demonstrated up-regulation of genes involved in regulating tissue polarity, such as BMP-4 and ZO-1. These results demonstrated that miR-203 regulated both self-renewal of CSLCs and differentiation of non-CSLCs, leading to significant tumor growth inhibition with restored epithelial tissue architecture in vivo, which suggests the use of miR-203 as a novel therapeutic target for ESCC.

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：食道外科学

キーワード：食道癌 miRNA 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍幹細胞は自己複製能をもち、転移浸潤や治療抵抗性に関与する分画であり重要な治療標的であると考えられている。申請者らはこれまでに低親和性神経成長因子受容体 p75NTR 陽性細胞が高いコロニー形成能を持つ癌幹細胞を含む細胞集団であることを示してきた。miRNA は標的 mRNA に結合し遺伝子発現を制御することで発癌や癌の進展および治療抵抗性に関与しているが、申請者らは食道癌組織標本を用い p75NTR 陽性症例および陰性症例における miRNA の発現をマイクロアレイを用いて検討し陽性症例において低発現なものとして mir203 を抽出した。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌細胞における mir203 の役割を解明しその発現制御による新たな治療法の可能性を検討する。

3. 研究の方法

1991年6月より2007年8月に当科において切除された食道扁平上皮癌症例のうちホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックを用いて癌部および正常部の RNA 抽出が可能であった 32 症例を対象とし、p75NTR および microRNA の発現をそれぞれ免疫組織染色およびマイクロアレイを用いて検出した。候補 microRNA として同定された miR-203 についてその発現と臨床病理学的因子および予後との関係を検討した。さらに食道癌細胞株 (KYSE) に miR-203 強制発現ベクターを導入しセルソーターを用いて食道扁平上皮癌幹細胞マーカーである p75NTR 陽性細胞を分離し分子生物学的解析を行った。

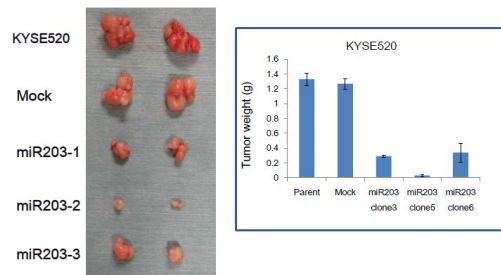
4. 研究成果

p75NTR 陰性例において陽性例に比べて 2 倍以上高い発現を認める microRNA として miR-203 が同定された。その発現と腫瘍進達度、リンパ節転移、遠隔転移および臨床病期との相関は認めず、高分化型癌において発現が高い傾向を認めた。臨床病期、で術後 6 カ月以内死亡を除いた 20 例 (miR-203 低発現 13 例、高発現 7 例) について検討したところ低発現例において有意に予後不良であった (p=0.01)。

miR-203 導入株において p75NTR 陽性・陰性両細胞で miR-203 の発現増強を認めた。p75NTR 陽性細胞の割合は Mock 株の 2% から導入株の 3-6% と増加した。RT-PCR にて p63 は p75NTR 陽性細胞で増強し陰性細胞で減弱し、インボルクリンは p75NTR 陰性細胞で著明に増強した。導入株のコロニー形成能は低下し、マウス皮下移植による腫瘍は有意に縮小した。縮小した腫瘍内には多数の小結節を認め中心から辺縁に向かう重層扁平上皮構造を示した。組織染色にて小結節の中心に基底膜分子ラミニンの発現を認め p75NTR 陽性細胞はラミニン発現に接して少数存在した。さらに Ki67 および p63 は腫瘍の中心部 4-5 層で、インボルクリンは辺縁

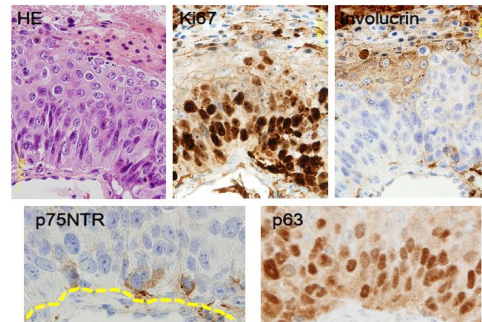
で発現した。cDNA マイクロアレイによる解

KYSE-miR203 における腫瘍形成



析では mir203 導入株において BMP-4 や ZO-1 といった細胞極性分子の発現増加を認めた。導入株において有意に発現が低下した分子のなかで、Targetscan により TRPS-1 が mir203 の新規標的分子候補として同定された。細胞を用いた RT-PCR および移植腫瘍の組織染色にて TRPS-1 は Mock 株では腫瘍全体で発現し mir203 導入株では p75NTR 陽性細胞を含む全ての細胞において発現が減弱した。

マウス皮下移植腫瘍における幹細胞マーカーの発現



これらの結果は食道扁平上皮癌細胞株において mir203 導入により p75NTR 陽性細胞の自己複製が維持されつつ p75NTR 陰性細胞の分化が誘導され、全体として重層扁平上皮構造の回復とともに著明な腫瘍抑制効果を認めることを示したものであり、mir203 導入により癌幹細胞を標的とした新規治療への応用の可能性が示唆された。

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 6 件)

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 Diseases of the Esophagus 査読あり (2014) DOI: 10.1111/dote.12245

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*. 査読あり
2014;44(6):1923-32.

Shimada Y, Okumura T, Nagata T, Hashimoto I, Sawada S, Yoshida Y, Fukuoka J, Shimizu K, Tsukada K. Expression analysis of fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1) in esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 査読あり(2014) 11:48-53
DOI 10.1007/s10388-013-0394-

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*. 査読あり
2014 Feb;31(2):613-8. doi:
10.3892/or.2013.2900.

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. *Mol Clin Oncol*. 査読あり
2013;1(4):716-720.

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*. 査読あり
2012;32(12):5507-14.

〔学会発表〕(計 7件)

奥村知之、嶋田 裕、渡辺 徹、平野勝久、山口哲司、森山亮仁、橋本伊佐也、渋谷 和人、神山公希、北條 莊三、松井 恒志、吉岡伊作、澤田 成朗、吉田 徹、長田 拓哉、武井義則、清水一治、塚田一博

マイクロ RNA203 導入による食道扁平上皮癌幹細胞形質の変化 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3 京都
奥村知之、嶋田 裕、森山 亮仁、大村 哲也、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、澤田 成朗、吉田 徹、長田拓哉、塚田 一博 食道扁平上皮癌における分化制御 microRNA の発現と役割 第 11 回日本消化器外科学会大会 2013 年 10 月 11 日 東京

奥村知之、嶋田 裕、山口哲司、森山 亮仁、大澤 宗士、神山公希、橋本 伊佐也、渋谷 和人、北條 莊三、松井 恒志、吉岡伊作、澤田成朗、吉田 徹、長田拓哉、塚田一博 食道原発小細胞癌と肺原発小細胞癌における遺伝子発現プロファイルの比較 第 24 回日本消化器癌発生学会 2013 年 9 月 6 日 金沢

T. Okumura, Y. Shimada, M. Moriyama, Y. Takei, T. Yamaguchi, T. Omura, S. Sekine, S. Sawada, T. Nagata, K. Shimizu, K. Tsukada 食道扁平上皮癌において miR-203 の発現により増殖が抑制され分化が誘導される 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 5 日 横浜

奥村知之、嶋田 裕、森山 亮仁、大村 哲也、関根 慎一、渡邊 智子、北條 莊三、渋谷 和人、松井 恒志、吉岡伊作、澤田成朗、吉田 徹、長田 拓哉、塚田一博 食道扁平上皮癌における幹細胞制御 microRNA の探索とその臨床的意義 第 113 回日本外科学会定期学術集会

2013年4月12日 福岡

T. Okumura, Y. Shimada, S. Sekine, M. Moriyama, T. Omura, K. Kamiyama, R. Hori, T. Watanabe, S. Hojo, K. Matsui, I. Yoshioka, S. Sawada, T. Yoshida, T. Nagata, K. Tsukada. Identification of microRNAs which regulate stem cell property in esophageal squamous cell carcinoma. The 13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, October17, 2012 in Venice, Italy.

Okumura T., Shimada Y., Osawa S., Sekine S., Moriyama M., Omura T., and Tsukada K.

Identification of microRNAs which are differentially expressed in p75NTR-positive esophageal squamous cell carcinoma.

International Surgical Week / ISW2011, 2011, 8, 28 - 9, 1, Yokohama.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥村 知之 (OKUMURA TOMOYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
助教

研究者番号：10533523

(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(医学)・
教授

研究者番号：90171967

嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

京都大学・薬学研究科(研究院)・

寄附講座教員

研究者番号：30216072