

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791550

研究課題名（和文）

胃癌腹膜播種を規定する新たな microRNA-gene pathway の解明

研究課題名（英文）

The elucidation of the novel microRNA-gene pathway regulating the peritoneal dissemination in gastric cancer

研究代表者

岩槻 政晃 (IWATSUKI MASAOKI)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：50452777

研究成果の概要（和文）：胃癌腹膜播種を伴う症例は予後不良であり、その有無は予後を規定する。しかしながら、その分子生物学的な転移メカニズムは明らかではない。microRNA は microRNA の発現異常は、癌の発生、進展、転移や抗癌剤耐性にも大きく関わるとされ、近年、消化器癌においてもその発現異常が報告されている。本研究は日常診療で定期的に採取可能で、非侵襲的である末梢血の血清サンプルを用いて、癌の悪性度を規定する microRNA-gene pathway を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The prognosis of the patients with peritoneal dissemination of gastric cancer still remains dismal. The molecular mechanism of peritoneal dissemination has been not elucidated. microRNA has been reported to be involved in carcinogenesis, progress, metastasis and chemo-resistance. In the current study, we aimed to reveal the novel microRNA-gene pathway in human serum samples regulating the malignant potential of gastrointestinal cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：microRNA、胃癌、腹膜播種、転移、化学療法耐性、exosome

1. 研究開始当初の背景

本邦では胃癌の罹患率、死亡率はいずれも高く、その悪性度を規定するのは腹膜播種転移である。したがって正確な腹膜播種診断と適切な化学療法が胃癌の予後を規定する。しかしながら、現在行われている洗浄細胞診はその正診率は十分ではなく、また化学療法感受性を規定する分子生物学的マーカーは存

在しない。新たな遺伝子発現調節機構として注目されている microRNA に着目し、臨床検体を用いて新たなマーカーとして microRNA-gene pathway を解明する。

2. 研究の目的

本研究では日常診療で定期的に採取可能で、非侵襲的である末梢血をサンプルとして用いて miR microarray により包括的に胃癌

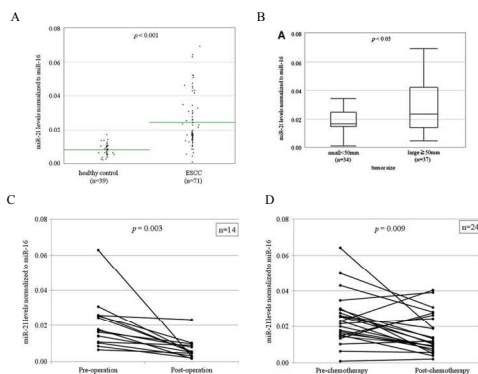
腹膜播種を規定する microRNA (miR) を同定し、その標的遺伝子の pathway を解析することで新規の腹膜播種診断マーカーや腹膜播種の治療標的としての臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 血清中の miR の測定方法の確立とその validation
- (2) 胃癌転移や化学療法耐性に関与する miR の同定
- (3) Exosome 中に存在する miR の検出方法の確立とその測定

4. 研究成果

まず、血清中の miR の測定が実際の臨床検体を用いて、測定可能かどうかを検証するために、既にストックのある食道癌血清サンプルを用いて、検討した。以前、われわれは食道癌腫瘍組織において miR-21 が高発現し、その発現は食道癌の予後を左右することを発表した (Clin Cancer Res. 2009)。この結果を利用して、食道癌症例と非担癌症例での血清中の miR-21 の発現を検証した。血清中 miR-21 は食道癌症例で有意に上昇していた。手術症例においては、術前、術後を同一症例で比較すると、血清中の miR-21 の発現術後に有意に低下していた。また、化学療法を施行し、奏効した症例では化学療法前後で血清中の miR-21 の発現は、同様に低下していた。これらの結果から、血清中の miR の測定は可能であり、その発現は悪性度や治療効果を判定するツールになり得ることを示した (*J Surg Oncol.* 2012)。

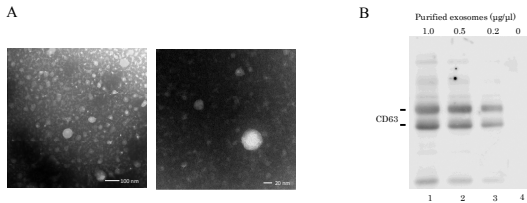


また、胃癌における化学療法耐性や腹膜播種を規定する miR-gene pathway の同定を行うに当たり、乳癌で抗癌剤耐性や癌幹細胞の特性を持つ一つの概念として上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が報告され、この概念に着目した。miR-200 family が ZEB 遺伝子を標的とし、EMT を来たしうることが報告されている。胃癌ではその発現や機能解析は明らかではなく、われわれは切除検体を用いて、miR-200 family の発現および ZEB の発現を確認し、その相関関係と胃癌細胞株を用いて EMT を来たしうることを示した (*Ann Surg Oncol.* 2012)。現在、血清中の miR-200 family の発現、および ZEB の発現を確認し、実際、化学療法の耐性や腹膜播種との関連を検討中である。

さらに近年、血清中の exosome が細胞間の情報伝達に重要な役割を担っており、exosome 中の蛋白、mRNA, miR の発現の解析が癌研究において進められている。そこでわれわれは、exosome 中の miR の発現に着目し、exosome からの miR の抽出とその発現解析を行い、血清中の miR の発現と同時に、実際、細胞間情報伝達に関わっている exosome 中の miR の発現を同時に解析することで、真のマーカーまたは治療標的がいずれであるのかを解析した。

まず、血清から exosome を抽出し、miR-21 の発現を確認した。血清中 exosome から ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution を使用し、さらに抽出した exosome から mirVana microRNA isolation kit[®] を用いて microRNA を抽出した。血清から抽出した exosome の電子顕微鏡像を撮影し、exosome が直径 30-50nm の楕円形の小嚢胞として確認できた。また exosome の表面抗体である抗 CD63 抗体を用いて western blotting を行ったところ、濃度依存性にバンドが確認でき、血清中の exosome を確実に抽出できることを確認した。次いで、食道

扁平上皮癌と診断された治療前の28例、および同時期の炎症を伴わない非担癌症例22例を対象とし、治療前の血清から抽出したexosomeが内包するmiR-21の発現が非担癌症例と比べ高いことを示した。以上より、食道癌症例において血清から抽出したexosomeが内包するmiR-21の発現がbiomarkerになり得ることが示唆された (*Cancer* 2013)。



さらに、食道癌の転移を規定する新規のexosome中miRの同定のため、食道癌転移陽性例と陰性例のmicroRNA microarrayを行い、転移を規定する新規のmicroRNA(miR-205)をpick upし、臨床検体におけるその発現のvalidationと機能解析を行っている。

また同時に化学療法耐性遺伝子としてRPN2遺伝子に着目し、docetaxel耐性に関与することを示した(*Br J Cancer* 2012)。これらの結果をもとに、現在、胃癌における化学療法耐性因子として新たなmiR-gene pathwayの同定を行っている。

これらの研究は難治性の高い上部消化管癌において、非侵襲的に測定可能な治療効果の反映や予後予測を反映する新たなbiomarkerとして、臨床応用が期待できる。

以上のように本研究では、食道癌、胃癌においてmiRやexosome中miRの測定に関する方法論の確立やあらたなcandidate miR, geneを同定した。本研究は日常臨床で非侵襲的にルーチンワークとして行う末梢血採血を用いての研究であり、既知のmiR-gene pathwayの確認と同時に、今後は新規のmiR-gene pathwayの同定により、既存の腫瘍マーカーや画像診断を凌駕する腹膜播種診断マ

ーカーとして、さらには、腹膜播種転移を規定するmiR-遺伝子のpathwayを解析することにより、これらを抑制することにより腹膜播種に対する新たな創薬も期待できる点で意義深いと思われる。

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 56 件)

- (1) 「PIK3CA mutation is associated with a favorable prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma.」
Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Noshio K, Baba H.
Clin Cancer Res 19:2451-9, 2013 査読有 Doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3559.
- (2) 「Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis.」
Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, Sato T, Barnard GF, Fukagawa T, Yamamoto S, Nakanishi H, Sasaki S, Miyano S, Watanabe T, Kuwano H, Mimori K, Pantel K, Mori M.
Cancer Res 73:2059-69, 2013 査読有 Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0326.
- (3) 「Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma.」
Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H.
Cancer 119:1159-67, 2013 査読有 Doi: 10.1002/cncr.27895.
- (4) 「Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer.」
Baba H, Watanabe M, Okabe H, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Baba Y, Iwatsuki M, Chikamoto A, Beppu T.
Br J Cancer 107:1950-5, 2012 査読有 Doi: 10.1038/bjc.2012.502.

- (5) 「RPN2 expression predicts response to docetaxel in oesophageal squamous cell carcinoma.」
Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Nagai Y, Ishimoto T, Baba Y, Mimori K, Baba H. Br J Cancer 107:1233-8, 2012 査読有 Doi: 10. 1038/bjc. 2012. 396.
- (6) 「MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma.」
Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H. Ann Surg Oncol 19 Suppl3: S656-64, 2012 査読有 Doi:10. 1245/s10434-012-2217-6.
- (7) 「Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma.」
Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H. J Surg Oncol 106:188-92, 2012 査読有 Doi: 10. 1002/jso. 23064.

[学会発表] (計 178 件)

- (1) Iwatsuki M, Mimori K, Watanabe M, Fukagawa T, Mori M, Baba H
「The Identification of novel micro RNAs and Genes in bone marrow regulating gastric cancer metastasis」
8th International Symposium on Minimal Residual Cancer 2012 年 9 月 23 日 大阪府 大阪国際会議場
- (2) 糸山明莉、渡邊雅之、岩槻政晃、石本崇胤、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、馬場秀夫
「トラスツズマブ併用療法により完全寛解が得られた腹膜播種を伴うHER2陽性進行胃癌の1例」
第99回日本消化器病学会九州支部例会、2012年6月29日 佐賀県 ホテルグランデはがくれ
- (3) Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H
「Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in esophageal squamous cell carcinoma.」
AACR Annual Meeting 2012 2012 年 4 月 2 日 Chicago McCormick Place West
- (4) 蔵重淳二、蒲原英伸、渡邊雅之、田中洋平、木下浩一、齋藤誠哉、岩槻政晃、馬場祥史、馬場秀夫。
「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 大阪国際会議場

- (5) Iwatsuki M, Mimori K, Watanabe M, Mori M, Baba H.
「The Identification of Novel MicroRNAs And Genes In Bone Marrow Regulating Gastric Cancer Metastasis」
6th Annual Academic Surgical Congress 2012 年 2 月 3 日 California, USA
- (6) Iwatsuki M, Mimori K, Watanabe M, Fukagawa T, Mori M, Baba H
「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 大阪府 大阪国際会議場
- (7) 蔵重淳二、渡邊雅之、木下浩一、齋藤誠哉、佐藤伸隆、辛島龍一、平島浩太郎、日吉幸晴、岩槻政晃、蒲原英伸、林尚子、馬場秀夫
「胃癌における microRNA- 200b による癌浸潤転移の制御機構」
第111回日本外科学会定期学術集会 2011年5月26日～28日(震災の為紙上開催)
- (8) 田中洋平、渡邊雅之、蔵重淳二、木下浩一、齋藤誠也、佐藤伸隆、平島浩太郎、辛島龍一、岡部弘尚、今村 裕、長井洋平、岩槻政晃、林尚子、馬場秀夫
「食道癌患者血清から抽出したエキソソーム内の microRNA の発現解析」
第111回日本外科学会定期学術集会 2011年5月26日～28日(震災のため紙上開催)
- (9) Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Hiyoshi Y, Kinoshita K, Saito S, Kamohara H, Baba Y, Hayshi N, Baba H
「MicroRNA-200B regulates epithelial to mesenchymal transition in gastric carcinoma.」
9th International Gastric Cancer Congress 2011 年 4 月 22 日 COEX Convention Center Seoul Korea
- (10) 岩槻政晃、三森功士、渡邊雅之、深川剛生、森 正樹、馬場秀夫
「胃癌転移における微量癌細胞と宿主側因子の共存の意義」
第83回日本胃癌学会総会 2011年3月5日 青森県 青森屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩槻 政晃 (IWATSUKI MASA AKI)
熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：50452777

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：20240905

渡邊 雅之 (WATANABE MASAYUKI)

熊本大学・生命科学研究部・准教授

研究者番号：80254639