

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24591911  
 研究課題名(和文)食道癌におけるmTORを標的としたmiRNA replacement therapy  
  
 研究課題名(英文)Regulation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling by MicroRNA in esophageal cancer  
  
 研究代表者  
 木下 浩一 (Kinoshita, Kouichi)  
  
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
  
 研究者番号：10507792  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：【食道癌におけるmiRNA発現の解析Total RNA抽出と網羅的解析】食道癌切除症例約100症例のtotal RNAを抽出。miRNAの候補検索にmiRNA microarrayを用い、臨床検体にて発現量に差があるmiRNAを網羅的に同定。pick upしたmiRNAについて定量的RT-PCR法を用いてvalidationを行い、いくつかのmiRNAに関して妥当性を検討した。【mTORを標的とするmiRNAとの相互的な発現制御機能の解明】上記にて同定されたmiRNAに対してmTORを標的とするか検証を行うため細胞株による実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：【RNA isolation and microarray profiling in esophageal cancer.】The miRNAs were extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) esophageal tissues(n=100). Using miRNA microarray, We identified miRNAs with the difference to expression in clinical specimens. Validation of some miRNAs was done by qRT-PCR in tumors and normal tissues. Furthermore, An analysis of overall survival(OS) demonstrated that the low miR-X expression group had a significantly poorer prognosis than the high expression group. Similarly, the positive mTOR group had a significantly poorer prognosis of OS than the low expression group.  
 【Regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling by miRNAs in esophageal cancer】Using human esophageal squamous cell carcinoma cell lines, we confirmed relations of some miRNAs and mTOR. After the cells were transfected with miRNA Precursor Molecule using the Lipofectamine transfection reagent, we confirmed an inverse correlation between some miRNAs and mTOR in vitro.

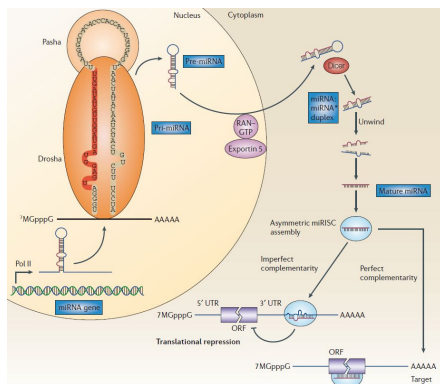
研究分野：消化器外科学

キーワード：microRNA mTOR 食道癌 replacement therapy

1. 研究開始当初の背景

< microRNA による mRNA の制御 >  
 近年、ゲノム情報発現の新たな調節・制御分子として microRNA (miRNA, miR) が注目されている。miRNA とは、20-24 塩基からなる極めて短い RNA であり、non-coding RNA の一種である。miRNA は標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、RNA 干渉 (2006, novel prize) のメカニズムにより生理的に転写後の制御を行っている。ヒトではこれまで 1000 種類以上の miRNA が発見されている。各 miRNA はそれぞれ 100 種に近い coding 遺伝子の mRNA を標的としており、coding 遺伝子との間で複雑な遺伝子発現ネットワークを形成していることが推察される (図 1.)。医学的に見た場合にも、癌をはじめ様々な疾患にて miRNA の発現異常が観察されている。

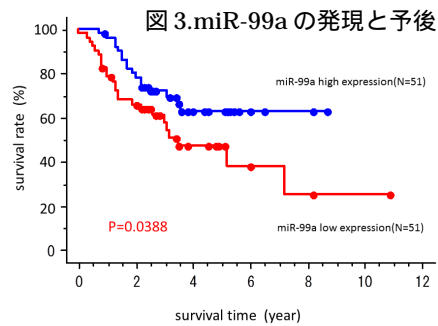
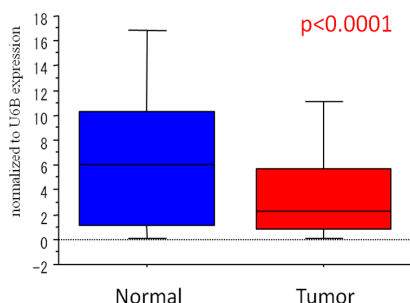
図 1. microRNA の発現と制御機構



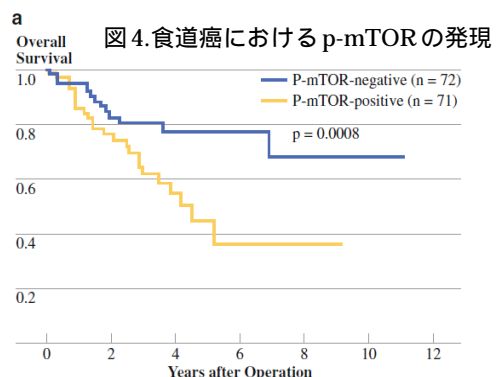
2006 Nature Rev Cancer

< 食道癌における miRNA の発現異常 >  
 われわれは臨床検体を用いて、食道扁平上皮癌患者において正常組織と比較して癌組織で miR-21 が高発現し、その標的遺伝子として、細胞質内で蛋白質合成の開始を阻害し、細胞核内で AP-1、SP-1 および p53 など複数の転写制御因子の活性を阻害する PDCD4 を同定した (Hiyoshi et al. Clin.Cancer Res. 2009)。さらに食道癌患者における別の miRNA の発現異常として、miR-99a を同定した (図 2)。miR-99a 高発現群は低発現群に比べ予後が良好であった (図 3)。

図 2. 食道癌における mir-99a の発現



< 食道癌における mTOR の発現意義 >  
 mTOR は約 290kDa の巨大な serine / threonine タンパク質リン酸化酵素である。PI3K/Akt 経路の下流に位置し、mTOR のエフェクター分子である p70S6 kinase と翻訳開始因子 eIF4E-binding protein (4E-BP1) を介し、タンパク質翻訳制御を行うことで主に細胞増殖に関与する。我々は食道癌細胞株と、臨床検体を免疫染色し、mTOR の activation が食道扁平上皮癌の患者に関連していることを明らかにし、術前治療の無い食道扁平上皮癌の検体を用いて p-mTOR の免疫染色を施行したところ、陽性率は 71 例 / 143 例 (49.7%) であった。また p-mTOR 陽性例は陰性例と比べ有意に予後不良であった (図 4) [Hirashima K et al. Ann Surg Oncol. 2010]



mTOR シグナル経路は様々な癌種において重要な変化であるにも関わらず、食道癌における mTOR と miRNA を用いた研究は皆無である。これまで報告されている基礎研究や他癌種での研究結果を考慮すると、p-mTOR の発現は、1. 不良な予後、2. 細胞増殖増強、3. 抗癌剤感受性の増強、4. 放射線感受性の増強などに関連があることが予想される。miRNA replacement therapy は現在開発段階であり報告が少ないが、miRNA の補充によって標的遺伝子が抑制されている。今回 mTOR を標的とした miRNA を補充することにより、mTOR が抑制され治療効果を認めることが予想される。

## 2. 研究の目的

食道癌における mTOR 発現の重要性と mTOR 阻害剤 (RAD001) について研究報告してきており、食道癌において、miRNA と mTOR の関係は明らかになっていない。本研究は、食道癌において miRNA と mTOR の制御機能を解明し、miRNA を用いたがんに対する治療について研究する。具体的な研究項目は、mTOR を標的とする miRNA 発現の解析、miRNA と mTOR の相互的な制御機能の解析、miRNA を標的とした治療に対する検討、の 3 つである。

## 3. 研究の方法

食道癌における miRNA 発現の解析  
Total RNA 抽出と網羅的解析  
食道癌手術切除症例から total RNA を抽出。miRNA の候補検索には、miRNA を登録管理している Sanger Institute から発信されている最新 version を参考にした miRNA microarray (3D-Gene Human miRNA kit, TORAY) を用い、ヒ臨床検体にて miRNA の発現の差異を解析し、発現量に差がある miRNA を網羅的に同定。

in vitro において、miRNA と mTOR の相互的な発現制御機能の裏付けを行う。食道癌細胞株の p-mTOR 発現レベルを測定し、in vitro での癌細胞浸潤能、増殖能、細胞サイクル、アポトーシス抑制能などとの関係性を評価する。

p-mTOR 発現食道癌細胞株をヌードマウスに皮下注射し、食道癌モデルを作製し、miRNA 補充 (miRNA replacement therapy) による治療効果の検討を行う。mTOR 阻害剤による研究の経験を踏まえ、mTOR を標的とする miRNA を補充することによる、in vivo での治療効果や有害事象の検討を行う。

## 4. 研究成果

【食道癌における microRNA 発現の解析  
Total RNA 抽出と網羅的解析】  
術前治療を行っていない食道癌手術切除症例約 100 症例の total RNA を抽出した。miRNA の候補検索には、miRNA を登録管理している Sanger Institute から発信されている最新 version を参考にした miRNA microarray (3D-Gene Human miRNA kit, TORAY) を用い、ヒ臨床検体にて 10 例程度での miRNA の発現の差異を解析し、発現量に差がある miRNA を網羅的に同定した。pick up した microRNA について残りの 90 例で定量的 RT-PCR 法を用いて validation を行い、いくつかの miRNA に関しては妥当性を検討した。

【mTOR を標的とする microRNA との相互

的な発現制御機能の解明】上記にて同定された miRNA に対して mTOR を標的とするか検証を行う。miRanda, TargetScan などのコンピューターデータベースを用いて検索し、細胞株による実験を行っている。in vitro での癌細胞浸潤能、増殖能、細胞サイクル、アポトーシス抑制能などとの関係性を評価し、Pre-miR などを導入することでその変化を確認している現状である。

## 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 22 件)

1. Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Miyake K, Takamori H, Beppu T, Baba H: The expression levels of CD44v6 are correlated with the invasiveness of hepatocellular carcinoma in vitro, but do not appear to be clinically significant. *Oncol Lett* 3(5):1047-51, 2012. 査読有
2. Sato N, Hayashi N, Imamura Y, Tanaka Y, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Karashima R, Hirashima K, Nagai Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Watanabe M, Baba H: Usefulness of transcription-reverse transcription concerted reaction method for detecting circulating tumor cells in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 19(6):2060-5, 2012. 査読有
3. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H: MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19 (S3):S656-64, 2012. 査読有
4. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Hayashi N, Iyama K, Baba H: Aberrant activation of the mTOR pathway and anti-tumour effect of everolimus on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 106(5):876-82, 2012. 査読有
5. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H: Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 106(2):188-92, 2012.
6. Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M,

- Kinoshita K, Saito S, Nagai Y, Ishimoto T, Baba Y, Mimori K, Baba H: RPN2 expression predicts response to docetaxel in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 107(8):1233-8, 2012. 査読有
7. Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Ishimoto T, Miyake K, Yokoyama N, Ishiko T, Baba H: Cystine/glutamic acid transporter is a novel marker for predicting poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 29(2):685-9, 2013. 査読有
  8. Hirashima K, Iyama K, Baba Y, Honda Y, Sado Y, Ninomiya Y, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H: Differential expression of basement membrane type IV collagen 2 and 6 chains as a prognostic factor in patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Surg Oncol* 107(4):402-7, 2013. 査読有
  9. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamaki K, Ohashi Y, Baba H: LINE-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg* 257(3):449-55, 2013. 査読有
  10. Miyata T, Watanabe M, Nagai Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Furusho C, Ikuta Y, Yamamoto T, Baba H: Successful esophageal bypass surgery in a patient with a large tracheoesophageal fistula following endotracheal stenting and chemoradiotherapy for advanced esophageal cancer: case report. *Esophagus* 10(1):27-9, 2013. 査読有
  11. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H: Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119(6):1159-67, 2013. 査読有
  12. Nagai Y, Watanabe M, Baba Y, Iwatsuki M, Hirashima K, Karashima R, Kurashige J, Kinoshita K, Baba H: Preventive effect of sivelestat on postoperative respiratory disorders after thoracic esophagectomy. *Surg Today* 43(4):361-6, 2013. 査読有
  13. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Noshio K, Baba H: Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *Br J Cancer* 109(2):408-15, 2013. 査読有
  14. Ohuchi M, Watanabe M, Iwagami S, Baba Y, Nagai Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba H: Gastric volvulus after laparoscopic fundoplication: a rare complication after Heller-Dor operation for achalasia. *Esophagus* 10(3):153-6, 2013. 査読有
  15. Ishikawa S, Hayashi H, Kinoshita K, Abe M, Kuroki H, Tokunaga R, Tomiyasu S, Tanaka H, Sugita H, Arita T, Yagi Y, Watanabe M, Hirota M, Baba H: Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *Int J Cancer* 135(11):2528-36, 2014. 査読有
  16. Ishimoto T, Sawayama H, Sugihara H, Baba H: Interaction between gastric cancer stem cells and the tumor microenvironment. *J Gastroenterol* 49(7):1111-20, 2014. 査読有
  17. Ida S, Watanabe M, Yamao T, Ishimoto T, Nagai Y, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: False-positive <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) findings of bone metastasis from esophagogastric cancer: report of two cases. *Surg Today* 44(11):2191-4, 2014. 査読有
  18. Miyamoto Y, Watanabe M, Sakamoto Y, Shigaki H, Murata A, Sugihara H, Eto K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Yoshida N, Baba H: Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer. *Surg Today* 44(12):2287-92, 2014. 査読有
  19. Iwatsuki M, Takamori H, Eto K, Shimizu K, Ogawa K, Yamamura K, Ozaki N, Tanaka H, Sugiyama S, Ogata K, Doi K, Kamio T, Baba H: Repeated recurrence of a gastric gastrointestinal stromal tumor on the chest wall after initial curative resection: Report of a case. *Int J Surg Case Rep* 6:36-9, 2015. 査読有
  20. Iwatsuki M, Tanaka H, Shimizu K, Ogawa K, Yamamura K, Ozaki N, Sugiyama S, Ogata K, Doi K, Baba H,

Takamori H: Simultaneous total laparoscopic curative resection for synchronous gastric, cecal and rectal cancer: Report of a case. *Int J Surg Case Rep* 6:129-32, 2015. 査読有

21. Yoshida N, Baba Y, Watanabe M, Ida S, Ishimoto T, Karashima R, Iwagami S, Imamura Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: An original scoring system for predicting postoperative morbidity after esophagectomy for esophageal cancer. *Surg Today* 45(3):346-54, 2015. 査読有
22. Yoshida N, Baba Y, Watanabe M, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwagami S, Kurashige J, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Triangulating Stapling Technique Covered with the Pedicled Omental Flap for Esophagogastric Anastomosis: A Safe Anastomosis with Fewer Complications. *J Am Coll Surg* 220(2):e13-6, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. 木下 浩一、渡邊 雅之、蒲原 英伸、田中 洋平、藏重 淳二、齊藤 誠哉、岩上 志石本 崇胤、岩槻 政晃、馬場 祥史、宮本 裕士、馬場 秀夫、食道癌の発育進展における mTOR の関与と miR-99a による制御、第 112 回日本外科学会 2012 年 4 月 13 日、千葉、幕張メッセ国際会議場

〔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

木下 浩一 (KINOSHITA, kouichi)  
熊本大学医学部附属病院非常勤診療医師  
研究者番号：10507792

(2) 研究分担者

石本 崇胤 (ISHIMOTO, takatsugu)  
熊本大学医学部附属病院非常勤診療医師  
研究者番号：00594889

平島 浩太郎 (HIRASHIMA, koutarou)  
熊本大学医学部附属病院非常勤診療医師  
研究者番号：10594468

林 尚子 (HAYASHI, naoko)  
熊本大学医学部附属病院非常勤診療医師  
研究者番号：20452899

岩槻 政晃 (IWATSUKI, masaaki)  
熊本大学医学部附属病院非常勤診療医師  
研究者番号：50452777