

## 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：24591949

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌薬剤耐性を規定するmicroRNA gene pathwayの解明

研究課題名(英文)The novel markers to predict the sensitivity to chemotherapy in ESCC and GC

## 研究代表者

齋藤 誠哉(saito, seiya)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00594475

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)：私たちは、食道癌の薬剤耐性を規定する遺伝子としてRPN2に注目し、治療前の生検組織においてRPN2の発現がDCFの効果予測を示すことを示した。しかし、食道癌のDCF効果予測を示すmicroRNAの発見には至らなかった。そこで、胃癌における薬剤耐性の機序とmicroRNAの発現について調べることにし、胃癌におけるHerceptin耐性関連microRNAとして、miR-21, miR-223を同定した。miR-21はPTEN, miR-223はFBXW7をそれぞれtargetとしており、それらの発現を制御することによりHerceptin耐性に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We revealed that RPN2 expression in biopsy specimens could be a useful predictive marker for docetaxel-based neoadjuvant chemotherapy in ESCC. However, RPN2 expression is not associated microRNA expression. And therefore, we would reveal the relationship between Herceptin resistance and microRNA expression in gastric cancer. We revealed that the miR-21/PTEN pathway regulated the sensitivity of HER2-positive GC cell lines to trastuzumab through modulation apoptosis. Furthermore, we revealed the miR-223/FBXW7 pathway regulates the sensitivity of a HER2-positive GC cell line to trastuzumab through the modulation of apoptosis. We disclosed the miR-21/PTEN and miR-223/FBXW7 regulated the sensitivity of HER2-positive GC cell lines to trastuzumab through modulation apoptosis. We consider that miR-21 and miR-223 expression could be a useful predictive marker for Herceptin chemotherapy in gastric cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：microRNA 2 RPN2 chemo-resistance PTEN FBXW7

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は消化器癌の中でも悪性度が高い疾患であり、食道癌治療成績向上のためには、外科的根治術だけでなく、化学・放射線療法を組み合わせた集学的治療が不可欠と考えられている。しかしながら、食道癌において、化学療法感受性を規定する分子生物学的メカニズムについての報告は少ない。

### 2. 研究の目的

我々は既知の薬剤耐性機構に加え、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化学療法の効果規定因子としての microRNA-gene pathway を解明する。

### 3. 研究の方法

新たな遺伝子発現調整分子として、癌研究において注目されている miRNA であるが、癌の薬剤耐性獲得との関連性についても報告されている。当科において食道癌で高発現していることを証明した miR-21 であるが、gemcitabin に対する感受性との関連が報告され、胃癌においては Herceptin 耐性の胃癌細胞株を用いて、miR-21 の発現を低下させると Herceptin の薬剤に対する感受性を亢進させることが分かった。私たちは、食道癌の薬剤耐性を規定する遺伝子として RPN2 に注目し、2008 年 6 月から 2011 年 10 月までに、上部消化管内視鏡時の生検にて食道扁平上皮癌と診断され、リンパ節転移陽性と診断された 79 例を対象とし、診断時の生検組織を用いた免疫染色法にて RPN2 発現を評価した。また、化学療法の治療効果判定は、病理組織学的判定、DCF 投与前後に行った、FDG-PET の SUV max 値の減少率、10mm 以上の転移リンパ節を対象とした RECIST の 3 方法にて行った。また、食道癌細胞株において RPN2 を knockdown させたときの docetaxel の感受性の変化について確認した。しかし、食道癌の DCF 効

果予測を示す microRNA の発見には至らなかったため、胃癌における薬剤耐性の機序と microRNA の発現について調べることとし、胃癌における Herceptin 耐性関連の microRNA を同定した。我々は HER2 高発現株である NCI-N87 に対して、Herceptin を少量投与を 6 か月間行い、Herceptin 耐性株を作成した。この細胞株を用いて胃癌における Herceptin 耐性関連の microRNA の同定を行った。

### 4. 研究成果

79 症例に対する免疫染色の結果、RPN2 は 51 例に発現を認め、28 例では発現を認めなかった。RPN2 発現陽性群では、RPN2 発現陰性群と比べ、すべての評価方法において DCF 療法の治療効果が有意に低かった。また、食道癌細胞株を用いた実験では、RPN2 を knockdown させると docetaxel の感受性が有意に上昇した。治療前の生検組織において RPN2 の発現が DCF の効果を予測することを示した。内視鏡検査による生検は、日常診療でのルーチンワークであり、そのサンプルを用いて化学療法前にその感受性を予測することは重要であり、治療方針の決定に有用であると思われた。

(図 1, 2) 参考。

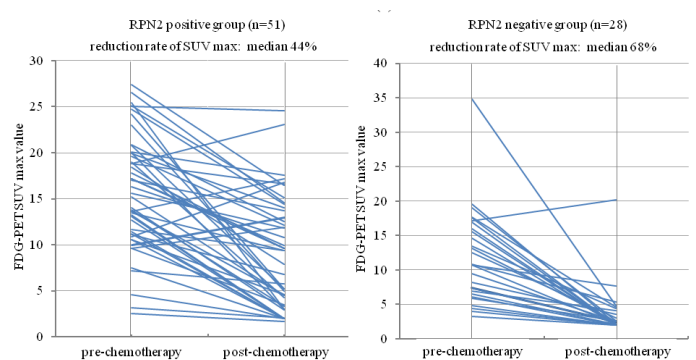


図 1 .RPN 2 の低発現群は高発現例に比べては、FDG-PET の集積が化学療法前後で多きく減少した。

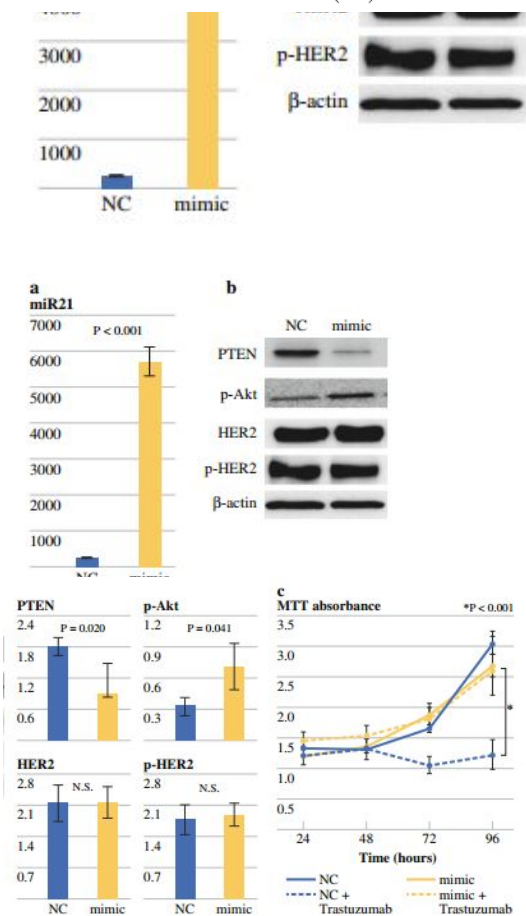
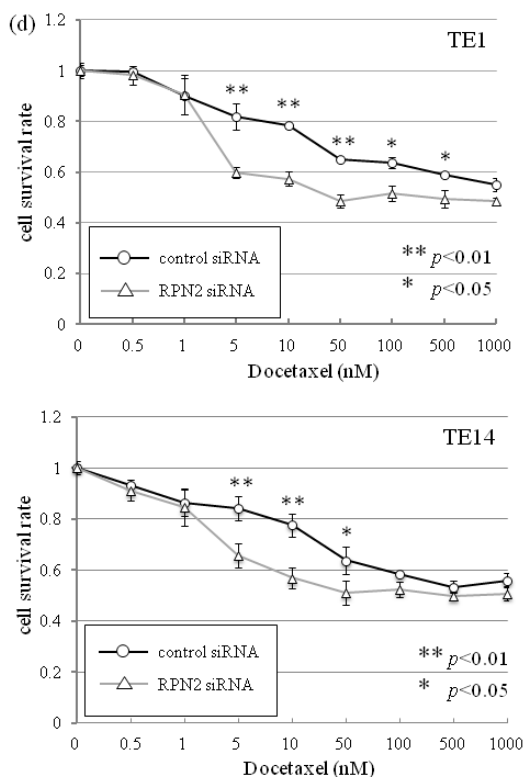


図3. トラストゥマブ感受性の NCI-N87 に miR21 を強制発現させると (a) PTEN の発現が減少し (b, c) 感受性が低下した (c)。

また、我々は HER2 高発現株である NCI-N87 に対して、Herceptin を少量投与を 6 か月

間行い、Herceptin 耐性株を作成した。この作成した細胞株と親株を microRNA array をかけて microRNA の発現量を調べたところ、miR-233 の高発現が見られた。胃癌においては、Herceptin に対して感受性のある NCI-N87 に miR-223 を強制発現させると、FBXW7 の発現が減少し、感受性が低下した。(図4, 5)

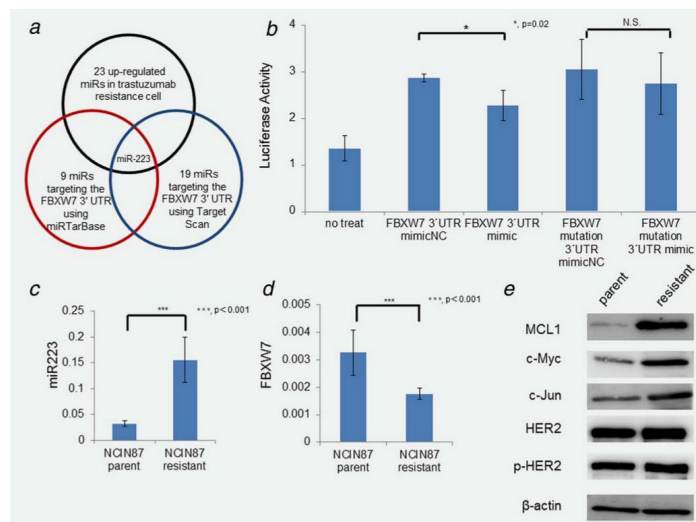


図4 .アレイの結果 microRNA-223 を同定した。

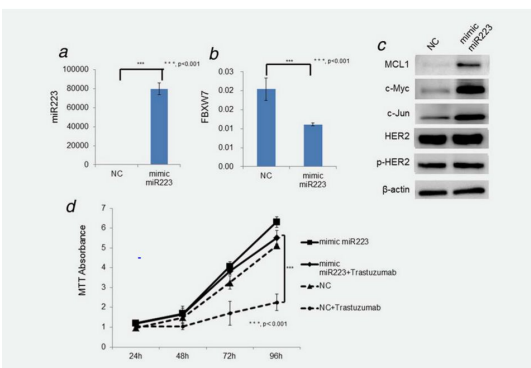


図5 トラストゥマブ感受性の NCI-N87 に miR223 を強制発現させると、FBXW7 の発現が減少した (b, c)。トラストゥマブの感受性は低下した (d)。

これらの研究の結果、食道癌においては治療前の生検組織において RPN2 の発現が DCF の効果を予測することを示した。

また、胃癌においては、miR-21 /PTEN は PTEN, miR-223 /FBXW7 の発現を調べることで Herceptin 耐性が予想できることを示した。

### 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 14 件)

1. 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. 査読有り
2. 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. 査読有り
3. Kono K, Iinuma H, Akutsu Y, Tanaka H, Hayashi N, Uchikado Y, Noguchi T, Fujii H, Okinaka K, Fukushima R, Matsubara H, Ohira M, Baba H, Natsugoe S, Kitano S, Takeda K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y: Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with three peptides derived from novel cancer-testis antigens. *J Transl Med* 10:141, 2012. 査読有り
4. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ida S, Nagai Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19(8):2726-32, 2012. 査読有り
5. 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 esophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Oct 9;107(8):1233-8. 査読有り
6. Okabe H, Beppu T, Ueda M, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Horlad H, Mima K, Miyake K, Iwatsuki M, Baba Y, Takamori H, Jono H, Shinriki S, Ando Y, Baba H: Identification of CXCL5/ENA-78 as a factor involved in the interaction between cholangiocarcinoma cells and cancer-associated fibroblasts. *Int J Cancer* 131(10):2234-41, 2012. 査読有り
7. Kiyozumi Y, Watanabe M, Iwatsuki M, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Tamaoki Y, Iyama K, Baba H: Pathological complete response in a case of HER2-positive gastric cancer with peritoneal dissemination treated with trastuzumab in combination with chemotherapy. *Int Canc Conf J* 2(1):51-5, 2013. 査読有り
8. 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. 査読有り
9. Saito S, Okabe H, Watanabe M, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Tanaka Y, Kurashige J, Miyamoto Y, Baba H: CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 29(4):1570-8, 2013. 査読有り
10. Sawayama H, Hayashi N, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H: Erratum to: The central vein access port and catheter in outpatient chemotherapy for colorectal cancer: a retrospective study of 101 patients. *Surg Today* 43(5):586, 2013. 査読有り
11. Saito S, Hayashi N, Sato N, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Yoshida M, Sakai K, Katsumori T, Katahuchi S, Shigaki N, Yamada K, Kimura M, Tanigawa T, Takano S, Kuramoto M, Baba H: Chemotherapy with bevacizumab for metastatic colorectal cancer: a retrospective review of 181 Japanese patients. *Int J Clin Oncol* 18(4):689-95, 2013. 査読有り
12. Kitano Y, Watanabe M, Iwatsuki M, Iwagami S, Kobayashi H, Ishimoto T, Ozaki N, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: Pleural dissemination of gastric gastrointestinal stromal tumor (GIST): a rare type of recurrence found 11 years after curative resection. *Int Canc Conf J* 2(4):243-6, 2013. 査読有り
13. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ishimoto T, Ida S, Imamura Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H.

The sensitivity of gastric cancer to trastuzumab is regulated by the miR-223/FBXW7 pathway. Int J Cancer. 2015 Apr 1;136(7):1537-45. 査読有り

14. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ida S, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab. Ann Surg Oncol. 2014 Jan;21(1):343-50. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 渡邊雅之、食道癌に対する術前 DCF 療法の効果予測の意義と個別化の可能性、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012/4/14、千葉
2. 藏重淳二、食道扁平上皮癌において microRNA-223 は癌抑制遺伝子ユビキチンリガーゼ複合体基質ユニット FBXW7 の発現を制御する、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012/4/14、千葉
3. 吉田直矢、食道癌に対する DCF 併用化学放射線療法の有効性、第 67 回日本食道学会学術集会、2013/6/14、大阪

〔図書〕(計 1 件)

1. 江藤弘二郎、岩槻政晃、石本崇胤、馬場秀夫：Question 胃癌における microRNA21 / PTEN 経路を介したトラスツズマブ耐性 Surgery Frontier Vol.21 No.2, 104-107, 2014

〔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 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

齊藤 誠哉 (SAITOH, seiya)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：00594475

(2) 研究分担者

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

馬場 祥史 (BABA, yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究所・講師  
研究者番号：20599708

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