

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689053

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御の解析を基軸とした食道癌の診断・治療法の開発

研究課題名(英文) New developments in the treatment and diagnosis of the esophageal cancer based on the analysis of epigenetic modifications

研究代表者

星野 敢 (Hoshino, Isamu)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：10400904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,400,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA(miR)、ヒストンメチル化制御に着目した。血清中のmiR-1246が食道癌患者において有意に発現が高くSCCを超える新規のバイオマーカーとしての有用性を示した。miR-1246の腫瘍からの分泌にエクソソームが媒介し、癌進展に関与する可能性を見出した。miR発現プロファイリングにて、食道癌組織中で発現が減弱するmiR-375が強い抗腫瘍効果を有することを確認し、新たな治療ツールと成り得るものと考えられた。miR-375の発現制御にヒストン修飾が関与することが示された。ヒストン脱メチル化酵素阻害剤である、NCL1は強い抗腫瘍効果を有し、新規分子標的治療薬として可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We focused on microRNA (miR) and histone methylation. Serum expression level of miR-1246 was significantly higher and it showed usefulness as a new biomarker in esophageal cancer patients. MiR-1246 was secreted from cancer cells by exosome and could participate in cancer progression. We confirmed that miR-375 which expression was attenuated in esophageal cancer tissues by miR expression profiling had a strong antitumor effect, and it could become a new treatment tool. It was shown that histone modification participated in expression of miR-375. NCL1 which was histone demethylase inhibitor had a strong antitumor effect, and it could be a new molecular target agent.

研究分野：消化器外科

キーワード：エピジェネティクス microRNA ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

食道癌は予後が不良とされ、その罹患率と死亡率が近接し、今日においても膵臓癌や胆管癌などとならび難治性の消化器癌の一つとして挙げられている。新たなモダリティーによる診断技術の向上や、手術手技や術後管理、放射線治療、化学療法の発達などにより予後は改善傾向にあるものの未だに治療後の再発率も高く、また再発後の治療の手段が得られないことも多い。食道癌が予後不良である代表的な要因として、リンパ節転移をきたしやすく、その転移箇所も頸部から縦隔、腹部と多岐にわたること。高い頻度で跳躍転移を伴うこと。血行性転移による、肺・肝への転移の頻度が高いことが挙げられる。われわれは、これまでに食道癌を対象として特異的な治療法・新規腫瘍マーカーの開発・同定に取り組んできた。なかでも、近年注目されるエピジェネティックな機構に着目し、その基礎的検討としてそれらの代表的因子である、A. クロマチンリモデリングによる遺伝子発現機構、B. microRNA (以下、miRNA)による癌制御機構の検討、C. ヒストンアセチル化による誘導 microRNA の同定・機能解析、D. 食道癌患者血清中の microRNA の網羅的発現解析を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでの研究成果を踏まえ、ヒストンアセチル化と同様にクロマチンリモデリングにおいて重要な制御機能を有するヒストンのメチル化機構を検討することとした。さらにヒストンアセチル化による誘導 miRNA の機能解析から臨床応用を目指した検討を行うとともに血清中の miRNA の発現の意義についての検討を行うこととした。具体的には、食道扁平上皮癌臨床検体中におけるヒストンのメチル化・脱メチル化レベルを検討したのち、食道扁平上皮癌細胞株を用いたヒストン脱メチル化酵素阻害剤による遺伝子発現制御機構の解析を、microarray および

ChIP-seq を次世代シーケンサーを用いて行うことで検討する。ヒストンアセチル化による誘導 miRNA を同定し、特に食道扁平上皮癌における増殖抑制効果およびそのメカニズムを検討するとともに、新たな DDS (drug delivery system) を用いた in vivo における抗腫瘍効果を検討する。食道扁平上皮癌患者血清中で有意に発現の高い miRNA-1246 について、癌患者血清中の発現亢進の臨床病理学的意義についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色を行い、ヒストン脱メチル化酵素である LSD1 の腫瘍内発現を検討した。LSD1 阻害剤の抗腫瘍効果について食道扁平上皮癌細胞株である TE2、T.Tn を用いて in vitro、in vivo にて確認を行った。また、LSD1 の特異的な基質である、Histone3Lysine4(H3K4) についてその抗体を用いて LSD1 阻害剤の影響を確認した。ヒストン蛋白のメチル化による制御遺伝子の同定を Human gene 1.0 ST Array にて網羅的に検索した。また、全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を次世代シーケンサー (HiSeq 2500, Illumina) を用いて行うことによって Histone3Lysine4(H3K4) のジメチル化により直接的に発現が制御される遺伝子の同定を行った。これらのデータの統合的な解析を行い、特異的なネットワークの同定をはかった。

(2) 食道扁平上皮癌細胞株である TE2、T.Tn をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 CHAP31 に暴露し、その total RNA を抽出し miRNA の発現解析を行った。miR-375 導入後細胞株にて、XTT assay、migration assay、invasion assay を用いて腫瘍増殖、遊走、浸潤能の検討を行った。次に miR-375 導入後細胞株の網羅的遺伝子解析を行った。これらのうち、臨床検体の癌部に 2 倍以上 mRNA 発現が亢進している遺伝子を同定した。食道扁平上皮癌における LDHB の役割を解析するため、siRNA

を用いて腫瘍増殖、遊走、浸潤能を検討し、また、その臨床病理学的意義を探求するため、臨床検体 94 例の癌部、非癌部における LDHB のタンパク発現レベルを免疫染色にて評価し、臨床病理学的特徴と比較検討した。

(3) 食道癌患者 4 名と、健常人 4 名の血清から total RNA を抽出し、miRNA array による発現プロファイリングを行った。その発現の差が最も顕著であった miR-1246 について引き続き解析を行った。食道癌患者 101 名と、健常人 46 名の血清 miR-1246 の発現を定量的 RT-PCR により測定・比較し、また、血清 miR-1246 の発現を cut off 値を設け各臨床病理学的因子との検討を行った。術前未治療の食道癌切除症例 18 例を対象とし、癌部と非癌部における miR-1246 の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた免疫組織学的検討において、食道癌における LSD1 の強発現を確認した。LSD1 阻害剤は食道扁平上皮癌において抗腫瘍効果を有し、移動能、浸潤能をともに低下させるとともにアポトーシスを誘導した。ヌードマウスを用いた in vivo モデルにおいても LSD1 阻害剤が抗腫瘍効果を有することが確認された。Microarray による遺伝子発現の解析の結果、複数の遺伝子の発現が有意に亢進ならびに低下していた。合わせて施行した ChIP-seq の結果、LSD1 阻害剤によって、peak に変動を認める多数の遺伝子を同定した。LSD1 阻害剤により発現が低下する遺伝子のうち、PHLDB2 は ChIP-seq の結果そのプロモーター部位での H3K4 のジメチル化が確認されメチル化による直接的な発現制御が示唆された。また、臨床検体を用いた発現解析の結果、PHLDB2 の高い発現は食道扁平上皮癌における独立した予後予測因子であることが確認された。

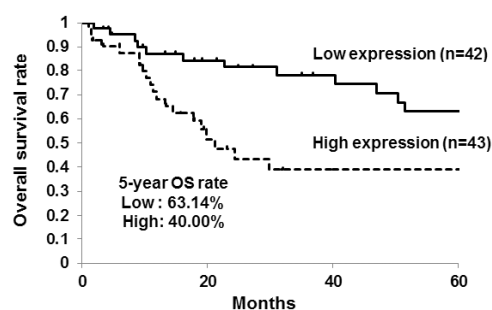


図 1 : PHLDB2 の発現と予後

(2) CHAP31 暴露後に発現が 2 倍以上増加する miRNA を 9 種確認し、うち発現が 400 倍以上亢進する miR-375 に注目した。腫瘍増殖、遊走、浸潤能の検討を行った。これらが有意に抑制され、miR-375 の抗腫瘍効果が明らかとなった。miR-375 導入後に 2 倍以上の発現低下を認め miR-375 の target site を有する標的候補遺伝子を 6 種同定した。miR-375 の target site を有する標的候補遺伝子を 6 種同定した。臨床検体の癌部にて 2 倍以上 mRNA 発現が亢進している遺伝子を 2 種(LDHB、AEG-1/MTDH)同定した。miR-375 の細胞内への導入により 2 種の遺伝子の mRNA、タンパク発現を検討したところ、両遺伝子とも有意に発現が低下することを確認した。LDHB をノックダウンすることで有意に細胞増殖、浸潤能が抑制されることが分かった。さらに、新規核酸デリバリーシステムであるアテロジーンを用いて、合成した miR-375 をヌードマウスの皮下腫瘍モデルに導入したところ有意な腫瘍縮小効果が確認された。また、臨床検体を用いた臨床病理学的検討の結果、LDHB 発現陽性例では陰性例に比し有意にリンパ節転移陽性例、進行症例が多いことが明らかとなった。

No.	microRNA	Accession Number	Fold change (CHAP31/control)		Average
			T. Tn	T2	
1	miR-375	MIMAT0000728	1724.872	473.217	1099.045
2	miR-449a	MIMAT0001541	184.607	9.238	96.922
3	miR-449b	MIMAT0003327	27.045	19.514	23.280
4	miR-192	MIMAT0002222	17.483	15.143	16.313
5	miR-497	MIMAT0002820	28.623	2.569	15.596
6	miR-132	MIMAT000426	13.077	10.885	11.981
7	miR-194	MIMAT000460	12.253	8.502	10.378
8	miR-146b-5p	MIMAT0002809	2.813	3.394	3.103
9	miR-183	MIMAT000261	3.222	2.697	2.959

図 2 : CHAP31 にて誘導された microRNA

(3)食道癌患者4名の血清において有意に発現が亢進するmiRNAを3種同定した。食道癌患者101名と、健常人46名の血清miR-1246の発現を定量的RT-PCRにより測定・比較し、その発現が有意に亢進していることが確認された(p<0.0001)。血清miR-1246の発現と各臨床病理学的因子と検討すると、TNM分類における各因子、T3-4/T1-2(p=0.0024)、N+/N-(p=0.0002)、Stage - /Stage - (p=0.0007)にてmiR-1246発現との間に相関を認めた。また、癌部と非癌部におけるmiR-1246の発現の検討においては、その発現に有意な差を認めなかった。ROC曲線解析ではAUC:0.7537、cut off値:1.323377で、感度:71.29%、特異度:73.91%という良好な結果であり、既知の食道扁平上皮癌の腫瘍マーカーであるSCCを凌駕する可能性が示唆された。

Table 1. Differentially expressed miRNAs in ESCC patients selected from the miRNA array data analysis

	Log ²							Pvalue
	1	2	3	4	5	6	7	
Upregulated miRNAs₂								
hsa-miR-134a	-2.43	-4.12	-2.98	-5.09	-0.70	1.03	-0.69	0.008432
hsa-miR-3202	-6.55	-7.23	-6.07	-6.50	-5.86	-4.71	-4.98	0.032029
hsa-miR-23a	-3.57	-3.71	-3.45	-4.76	-2.98	-1.43	-1.72	0.037856
hsa-miR-718	-5.84	-5.65	-5.29	-6.11	-4.91	-3.63	-3.74	0.041815
hsa-miR-3610	-5.44	-5.25	-4.83	-5.70	-4.43	-3.38	-2.96	0.04313
hsa-miR-4271	-4.96	-5.69	-4.83	-5.07	-4.63	-3.66	-3.75	0.043946
Downregulated miRNAs₂								
hsa-miR-144	-2.92	-1.49	-2.23	-1.83	-3.87	-3.83	-3.75	0.011178
hsa-miR-106b	-4.09	-3.25	-3.58	-2.66	-5.71	-5.92	-4.37	0.036093
hsa-miR-486-5p	-1.64	-0.84	-1.66	-0.05	-2.36	-1.97	-3.16	0.038981
hsa-miR-93	-4.78	-3.89	-4.83	-3.33	-5.59	-5.77	-4.84	0.049324
hsa-miR-451	4.02	4.15	4.13	3.95	3.81	3.41	3.38	0.049756

Abbreviations: ESCC = esophageal squamous cell carcinoma; miRNA = micro RNA; Healthy volunteers (1-4); ESCC patients (5-7).

図3: 食道癌患者血清中で有意に発現が高い、発現が低いmicroRNA

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10件)

1. Hoshino I, Akutsu Y, Murakami K, Akanuma N, Isozaki Y, Maruyama T, Toyozumi T, Matsumoto Y, Suito H, Takahashi M, Sekino N, Komatsu A, Suzuki T, Matsubara H. Histone Demethylase LSD1 Inhibitors Prevent Cell Growth by Regulating Gene Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Ann Surg Oncol*. [Epub ahead of print] (2015) 査読有

2. Hoshino I, Maruyama T, Fujito H, Tamura Y, Suganami A, Hayashi H, Toyota T, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Akanuma N, Takeshita N, Toyozumi T, Komatsu A, Matsubara H. Detection of peritoneal dissemination with near-infrared fluorescence laparoscopic imaging using a liposomal formulation of a synthesized indocyanine green liposomal derivative. *Anticancer Res*. 35(3):1353-9. (2015) 査読有

3. Isozaki Y, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Mori M, Nishimori T, Murakami K, Akanuma N, Takeshita N, Maruyama T, Toyozumi T, Takahashi M, Suito H, Matsubara H. Usefulness of microRNA-375 as a prognostic and therapeutic tool in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 46, 1059-66 (2015) 査読有

4. Isozaki Y, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Mori M, Nishimori T, Murakami K, Akanuma N, Toyozumi T, Takahashi M, Suito H, Takeshita N, Maruyama T, Suzuki A, Nakayama T, Matsubara H. Screening of alternative drugs to the tumor suppressor miR-375 in esophageal squamous cell carcinoma using the connectivity map. *Oncology*. 87, 351-63 (2014) 査読有

5. Akanuma N, Hoshino I, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Maruyama T, Yusup G, Qin W, Toyozumi T, Takahashi M, Suito H, Hu X, Sekino N, Matsubara H. MicroRNA-133a regulates the mRNAs of two invadopodia-related proteins, FSCN1 and MMP14, in esophageal cancer. *Br J Cancer*. 110, 189-98 (2014) 査読有

6. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Nishimori T, Matsubara H, Tomonaga T. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I and FAM83H in colorectal cancer. **J Cell Sci.** 15, 4721-31 (2013) 査読有

7. Takeshita N, Hoshino I, Mori M, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Komatsu A, Jitsukawa M, Matsubara H. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. **Br J Cancer.** 108, 644-52 (2013) 査読有

8. Hoshino I, Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. **Surg Today.** 43, 467-78 (2013) 査読有

9. Takeshita N, Mori M, Kano M, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Miyazawa Y, Matsubara H. miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1. **Int J Oncol.** 41, 1653-61 (2012) 査読有

10. Isozaki Y, Hoshino I, Nohata N, Kinoshita T, Akutsu Y, Hanari N, Mori M, Yoneyama Y, Akanuma N, Takeshita N, Maruyama T, Seki N, Nishino N, Yoshida M, Matsubara H. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-375 induced by histone acetylation in esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Oncol.** 41, 985-94 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 星野敢, 竹下修由, 松本泰典, 阿久津泰典, 村上健太郎, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 丸山哲郎, 豊住武司, 水藤広, 高橋理彦, 関野伸史, 松原久裕. 「circulating microRNA の新規バイオマーカーとしての有用性の検討.」第 51 回日本癌治療学会学術集会 (2013 年 10 月 26 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市))

2. Hoshino, I., Akutsu, Y., Murakami, K., Akanuma, N., Isozaki, Y., Maruyama, T., Toyozumi, T., Suito, H., Takahashi, M., Sekino, N., Suzuki, T., Matsubara, H. "Gene expression profiling induced by histone demethylase inhibitor in human esophageal squamous cancer cells." 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜))

3. 星野敢, 阿久津泰典, 竹下修由, 豊住武司, 河野世章, 上里昌也, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 丸山哲郎, 松原久裕. 「遺伝子, microRNA 発現情報に基づく食道癌個別化治療への取り組み.」第 68 回日本消化器外科学会総会 (2013 年 7 月 18 日、シーガイア コンベンションセンター (宮崎県・宮崎市))

4. 星野敢, 阿久津泰典, 遠藤悟史, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 丸山哲郎, 竹下修由, 豊住武司, 鈴木孝禎, 松原久裕. 「道扁平上皮癌におけるヒストン脱メチル化酵素阻害による誘導遺伝子の検討.」第 67 回日本食道学会学術集会 (2013 年 6 月 14 日、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市))

5. 星野敢, 磯崎由佳, 竹下修由, 赤沼直毅, 丸山哲郎, 豊住武司, 阿久津泰典, 村上健太郎, 遠藤悟史, 松原久裕. 「エピゲノム機構

に基づく新たな診断・治療法の開発。」第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013 年 4 月 11 日、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市))

6. 星野敢, 丸山哲郎, 阿久津泰典, 羽成直行, 森幹人, 村上健太郎, 遠藤悟史, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 竹下修由, 松原久裕。「ICG リポソームを用いた、近赤外光審査腹腔鏡の有用性の基礎的検討。」第 25 回日本内視鏡外科学会総会 (2012 年 12 月 6 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市))

7. Hoshino, I., Akutsu, Y., Komatsu, A., Hanari, N., Mori, M., Yoneyama, Y., Akanuma, N., Isozaki, Y., Maruyama, T., Takeshita, N., Matsubara, H. "Antitumor effects of novel histone demethylase inhibitor on esophageal squamous cell carcinoma." ISDE2012 13rd World Congress of the International Society of Diseases of the Esophagus. (2012 年 10 月 17 日イタリヤ・ベネチア)

8. 星野敢, 竹下修由, 松原久裕。「新規バイオマーカーとしての血中 circulating microRNA の有用性」JDDW2012 第 20 回日本消化器関連学会週間 (2012 年 10 月 11 日、神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市))

9. 星野敢, 阿久津泰典, 羽成直行, 森幹人, 村上健太郎, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 丸山哲郎, 竹下修由, 豊住武司, 鈴木孝禎, 松原久裕。「食道扁平上皮癌におけるヒストン脱メチル化阻害剤の抗腫瘍効果の検討。」第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月 20 日、ロイトン札幌 (北海道・札幌市))

10. 星野敢, 阿久津泰典, 羽成直行, 森幹人, 村上健太郎, 遠藤悟史, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 竹下修由, 丸山哲郎, 豊住武司, 鈴木孝禎,

松原久裕。「食道癌におけるヒストン修飾、microRNA 解析からみた遺伝子発現変動と新規診断・治療法の開発。」第 19 回日本遺伝子診療学会大会 (2012 年 7 月 27 日、三井ガーデンホテル千葉 (千葉県・千葉市))

11. 星野敢, 磯崎由佳, 竹下修由, 阿久津泰典, 羽成直行, 森幹人, 米山泰生, 赤沼直毅, 丸山哲郎, 松原久裕。「外科領域におけるエピジェネティックな制御機構の解明と新たな診断・治療法の開発。」第 67 回日本消化器外科学会総会 (2012 年 7 月 20 日、富山国際会議場 (富山県・富山市))

12. 星野敢, 阿久津泰典, 小松亜樹, 羽成直行, 森幹人, 米山泰生, 池田憲政, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 丸山哲郎, 竹下修由, Qin Wei, Yusup Gulbostan, 鈴木孝禎, 松原久裕。「食道扁平上皮癌細胞株におけるヒストン脱メチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果の検討。」第 66 回日本食道学会学術集会 (2012 年 6 月 22 日、軽井沢プリンスホテルウエスト (長野県・北佐久郡軽井沢町))

〔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

星野 敢 (HOSHINO ISAMU)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号: 10400904

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: