

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591937

研究課題名(和文) 17q25.1領域の全転写産物解析による食道癌原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Gene expression analysis on chromosome 17q25.1 in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

岩谷 岳 (Iwaya, Takeshi)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：70405801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌の原因遺伝子は、非常にまれな家族性食道癌(Tylosis)家系および非遺伝性の通常の散発性食道癌の研究から17番染色体長腕(17q25.1)に存在することが示唆されている。本研究では同領域内に存在する遺伝子の網羅的発現解析から原因遺伝子の同定を試みた。食道癌組織で有意な発現低下が見られたST6GALNAC1遺伝子の検討では、遺伝子変異、染色体欠失、高メチル化が高頻度に認められた。ST6GALNAC1遺伝子の不活化が食道癌発生に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tylosis is an autosomal dominant skin disorder that is associated with the early onset of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in several families. The tylosis esophageal cancer (TOC) gene locus has been mapped to chromosome 17q25.1 using linkage analyses of pedigrees of such families. This region is also frequently lost in sporadic ESCC. Therefore, genes involved in the development of esophageal cancer may exist in the TOC region on 17q25.1. Among many genes in the region, significant downregulation of ST6GALNAC1 expression in esophageal cancer tissues was confirmed. Frequent mutation, loss of heterozygosity, and hypermethylation in ST6GALNAC1 gene were observed. Our results suggest that downregulation of ST6GALNAC1 via hypermethylation and LOH are associated with the development of ESCC.

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

キーワード：食道癌 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の原因遺伝子を同定することは腫瘍の診断・治療・予防の観点から極めて重要なことである。癌原因遺伝子の多くは家族性腫瘍の連鎖解析により同定されてきた。食道癌では掌蹠角化症の亜系で高率に食道扁平上皮癌を発症する Tylosis という家系が報告されている。Tylosis はイギリス、ドイツ、アメリカなど世界で数家系の報告がされている。連鎖解析では本疾患の原因遺伝子が 17q25.1 上に存在することが示唆され Tylosis Oesophageal Cancer (TOC) locus と命名されている。われわれは散发性食道癌で TOC 領域に高頻度の loss of heterozygosity (LOH)を認めることから同領域に食道扁平上皮癌の原因遺伝子が存在する可能性を示した (Iwaya T et al, Gastroenterology 1998)。TOC 領域内の候補遺伝子について変異解析を試みてきた。デスモゾームに局在する Envoplakin (EVPL) は有力な候補遺伝子であったが、われわれの散发性食道扁平上皮癌における変異解析では 20 例中 1 例 (5%)に missense 変異を認めるのみであり (Iwaya T et al, Oncol Rep 2005)、Tylosis 家系の解析でも EVPL 変異は見られなかった。一方、Tylosis 家系の連鎖解析では TOC locus は 42.5kb まで狭められ、同領域内の Cytoglobin (CYGB)がメチル化により不活化され、腫瘍抑制遺伝子として機能している可能性が報告された(文献 1)。しかし、CYGB のメチル化は膀胱癌、大腸癌、乳癌、白血病など多くの癌腫で見られ食道癌に特異的なものではなく、腫瘍抑制機能も非小細胞肺癌細胞株で示されたのみで食道癌細胞では報告はない(文献 2)。また、われわれは日本人の食道癌における CYGB の検証をおこなったが、発現異常は認められなかった。以上より、TOC locus 上には他の食道癌原因遺伝子が関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、家族性食道癌および散发性食道癌で共通して異常が報告されている領域 17q25.1 上に存在する食道癌原因遺伝子の同定、食道癌発生メカニズムの解明をこころみた。

3. 研究の方法

1) RNA-seq 解析

食道扁平上皮癌 3 切除検体の癌部、正常粘膜より組織を採取し RNA を抽出した。次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により網羅的遺伝子発現解析をおこなった。特に TOC locus を含む 17q25.1 上の 1500kb の領域の遺伝子発現について検討をおこなった。

2) 定量 RT-PCR

RNA-seq 解析で、正常食道粘膜に比較して癌部にて有意な発現低下を認めた遺伝子につき、90 例の食道扁平上皮癌症例で qRT-PCR (TaqMan PCR)をおこない検証した。

3) 候補遺伝子の変異解析

発現解析から得られた候補遺伝子について、46 症例の DNA サンプルより coding region の遺伝子変異解析を Direct sequence 法にておこなった。

4) microsatellite LOH 解析

候補遺伝子領域の染色体欠失の有無につき PCR microsatellite LOH 解析をおこなった。

5) 候補遺伝子のメチル化検索

候補遺伝子の不活化に過剰メチル化が関与しているかについて、食道扁平上皮癌培養細胞株を用い、5-aza-dC 処理を行い当該遺伝子の発現状態の変化を確認した。

6) 候補遺伝子の siRNA による knock down による機能解析

siRNA により候補遺伝子を knock down し、細胞増殖能を MTT assay にて control 群と比較した。

4 . 研究成果

1) RNA-seq 解析

頸部高分化食道扁平上皮癌 T1N0M0、胸部中部低分化食道扁平上皮癌 T3N0M0, Stage II、胸部下部腹部中分化食道扁平上皮癌 T3N1M0, Stage III の 3 症例における RNA-seq 解析では、17q25.1 上の TOC locus を含めた 1500 kb 領域内で、癌部で正常部に比較し 70%以上の有意な発現低下を認められた遺伝子は EVPL と ST6GALNAC1 の 2 遺伝子であった。

2) 定量 RT-PCR

食道癌 90 症例における qRT-PCR による発現解析では、ST6GALNAC1 および EVPL とも正常部に比較し腫瘍組織で有意な発現低下を示した (図 1)。

3) ST6GALNAC1 遺伝子変異解析

上記発現解析からえられた 2 遺伝子のうち EVPL は過去の解析で変異が低頻度であることが示されており、本検討では ST6GALNAC1 遺伝子の変異について検討した。46 症例中 5 例 (11%)で Exon 2 にアミノ酸変化をともなう変異 (Missense mutation: 2 例、3 bp の small deletion: 3 例) および silent mutation 2 例を認められた (図 2)。Intron 3/ Exon 4 境界部の intron 3 上の“C” 6 塩基 repeat 部で 1bp “C” deletion が見られた。しかし、これらの変異は食道正常粘膜でも確認されており、polymorphism の可能性も考えられた。

4) ST6GALNAC1 領域の microsatellite LOH 解析

ST6GALNAC1 遺伝子の intron に存在する microsatellite marker: D17S2238, D17S2243, D17S2245 を用い、34 症例で LOH 解析を施

行した。すべての marker が homo を示した case 以外の 26 例の informative case のうち 17 例 (65%)で少なくとも 1 つの marker で LOH が確認された。

5) 候補遺伝子のメチル化検索

食道扁平上皮癌細胞株 KYSE150, KYSE270, TE8, TE9, TE10 の 5 株を 3 μ M の 5-Aza-dC に 72hr 暴露後、RNA を採取し qRT-PCR を用い ST6GALNAC1 発現を Control と比較した。すべての細胞株で 5-Aza-dC 処理後に ST6GALNAC1 発現の上昇が認められた (図 3)。

5) siRNA による ST6GALNAC1 knock down

siRNA 実験では、食道癌細胞株でもっとも ST6GALNAC1 発現の高かった TE15 を用いた。TE15 で St6GALNAC1 発現を knock down すると細胞増殖能は低下した。

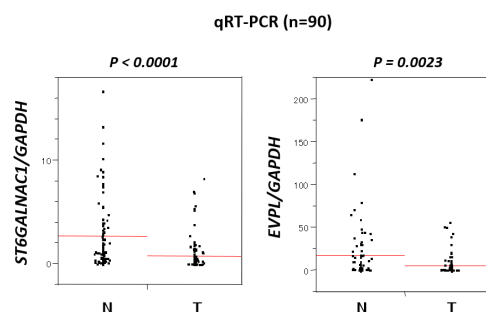


図 1 .

定量 RT-PCR による ST6GALNAC1 および EVPL 遺伝子発現. N: 正常組織、T: 腫瘍組織

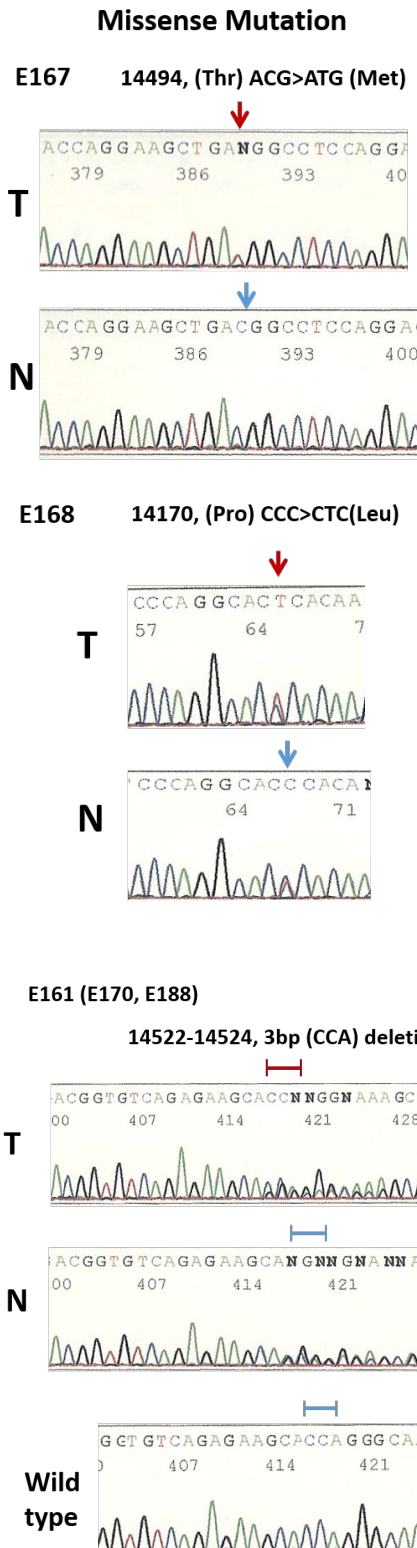


図2 . ST6GALNAC1 遺伝子変異解析.
上) 症例 E167, E168 における Missennse 変異 下) 症例 E161 および E170, E188 では CCA の 3 bp の欠失が見られた。

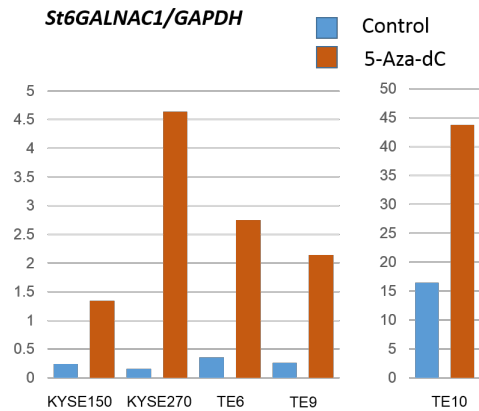


図3 . 食道扁平上皮癌細胞株における 5-Aza-dC 暴露後の ST6GALNAC1 発現変化.すべての食道癌細胞株で 5-Aza-dC 暴露後 ST6GALNAC1 の発現上昇が認められた。

考察

食道癌切除検体の遺伝子発現解析から食道癌発生に ST6GALNAC1 遺伝子の不活化が関与していることを明らかにした。ST6GALNAC1 の不活化には遺伝子変異、LOH、メチル化が関与しているものと考えられた。

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 14 件)

1. Contrasting expression patterns of histone mRNA and microRNA 760 in patients with gastric cancer. Iwaya T, Fukagawa T, Suzuki Y, Nishizuka SS, Wakabayashi G, et al. *Clin Cancer Res.* 2013, 19(23):6438-49. PMID: 24097871 査読有
2. Up-regulation of NEK2 by MicroRNA-128 Methylation is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. Takahashi Y, Iwaya T, et al. *Ann Surg Oncol.* 2013; 21(1):205-12 PMID: 24046120. 査読有
3. Tumor-derived tenascin-C promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, Ishibashi M, Takano Y, Akiyoshi S, Iwaya T, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Mimori K. *Anticancer Res.* 2013; 33(5):1927-34. 査読有
4. Clinical Significance of PICT1 in Patients of Hepatocellular Carcinoma with Wild-Type TP53. Ishibashi M, Iwaya T,

- Wakabayashi G, et al. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20 Suppl 3:S537-44 PMID: 23532381. 査読有
5. Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. Yokobori T, **Iwaya T**, et al. *Cancer Res*. 2013 73(7):2059-69. 査読有
 6. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma. Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, Sawada G, Takahashi Y, Kurashige J, Akiyoshi S, Sasaki S, **Iwaya T**, Sudo T, Sugimachi K, Mimori K, Wakabayashi G. *Oncol Rep*. 2013; 29(3):946-50. 査読有
 7. Usefulness of esophageal stenting for esophagorespiratory fistula with esophageal cancer]. Konosu M, **Iwaya T**, Wakabayashi G et al. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2012; 39(12):1849-51. 査読有
 8. Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway. **Iwaya T**, Wakabayashi G, et al. *Carcinogenesis*. 2012;33(12):2391-7. 査読有
 9. Molecular marker identification for relapse prediction in 5-FU-based adjuvant chemotherapy in gastric and colorectal cancers. Ishida K, Nishizuka SS, **Iwaya T**, Wakabayashi G et al. *PLoS One*. 2012;7(8):e43236. PMID: 22905237. 査読有
 10. Expression of Mesenchymal Markers Vimentin and Fibronectin: The Clinical Significance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Sudo T, **Iwaya T**, et al. *Ann Surg Oncol*. 2012; 20, Suppl 3:S324-35. PMID: 22644514. 査読有
 11. Current topics in mutations in the cancer genome. **Iwaya T**, Mimori K, Wakabayashi G. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 2012;113 (2):185-90. 査読無
 12. Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. Yokobori T, **Iwaya T**, et al. *Int J Oncol*. 2012;41(1):253-9.
 13. Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer. Sudo T, Mimori K, Nishida N, Kogo R, **Iwaya T**, et al. *Oncol Rep*. 2011;26(4):777-82 査読有
 14. Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models. Matsuo T, Nishizuka SS, **Iwaya T**, Wakabayashi G. *BMC Res Notes*. 2011 May 10;4:140. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

1. 胃癌患者 骨髄/末梢血中遊離癌細胞・宿主細胞における遺伝子発現解析. 岩谷 岳、深川 剛生ら,第113回日

本外科学会, 2013.

2. 大腸癌の予後に関わる long non-coding RNA の解析. 岩谷 岳、高橋 佑典ら、第68回日本消化器外科学会, 2013.
3. Gene expression analysis of bone marrow cells in gastric cancer patients. 岩谷 岳、深川 剛生ら,第72回日本癌学会, 2013.
4. 食道扁平上皮癌における NOTCH1 遺伝子異常の解析. 岩谷 岳、澤田 元太ら、第67回日本食道学会、2013.
5. Analysis of Notch1 gene in esophageal squamous cell carcinoma. 岩谷 岳、澤田 元太ら、第66回日本癌学会学術、2012.
6. Analysis of all transcripts in TOC locus on chromosome 17q25.1 in esophageal squamous cell carcinoma. 岩谷 岳、三森 功士ら、第65回日本癌学会学術、2011.

〔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：
 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
 岩谷 岳 (Iwaya, Takeshi)

研究者番号：70405801

(2)研究分担者
 田中 文明 (Tanaka, Fumiaki)

研究者番号：30332836