

## 食道扁平上皮癌における *Transmembrane Protease Serine 11B* の 発現制御に関する検討

天野 総, 岩谷 岳, 秋山有史

岩手医科大学医学部, 外科学講座

(Received on December 1, 2016 & Accepted on December 12, 2016)

### 要旨

食道扁平上皮癌発生の分子メカニズム解明のため、食道癌組織の RNA sequence 解析を行い、染色体 4q13.2 にクラスターを形成する一群の膜結合型セリンプロテアーゼ遺伝子が正常組織に比し食道癌組織で発現低下していることを示した。最も発現差の大きい *Transmembrane Protease Serine 11B* (*TMPRSS11B*) についての食道癌 64 例および食道癌細胞株 10 株の

Quantitative reverse transcription-PCR では 87.5% の症例で発現低下を認め、また発現状態と臨床病理学的因子の間に相関は見られなかった。食道癌細胞株ではいずれも発現は見られなかったが、*TMPRSS11B* 強制発現によりリン酸化 EGFR, Akt の発現抑制が見られた。*TMPRSS11B* は食道癌発症初期に発現低下し、癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆された。

**Key words :** *TMPRSS11B, esophageal squamous cell carcinoma, gene expression profile, tumor suppressor gene, RNA sequence*

### I. 緒 言

食道扁平上皮癌 (以下、食道癌) は早期より頸胸腹部におよぶりリンパ節転移を生じやすく、また進行癌では大血管・気管などの主要臓器への浸潤例も多くその予後は極めて不良である。食道癌は世界の臓器別癌死因として 6 番目であるが<sup>1)</sup>、本邦での 5 年生存率でも Stage I : 86.0%, II : 51.9%, III : 26.4%, IV : 12.2% と他の癌腫に比較して予後は不良である (全国がんセンター協議会生存率共同調査, 2016 年 2 月集計; <https://kapweb.chiba-cancer-registry.org>)。食道癌患者の予後改善には早期診断法や新規治療法の開発が望まれるが、その治療標

的やバイオマーカーの発見には食道癌発生の分子メカニズムの解明が重要と思われる。

食道癌の分子生物学的研究では、近年の次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析により、食道癌には 1 症例につき平均 150 個以上のアミノ酸変化を伴う変異が集積しているが、10% 以上の症例で変異が認められる遺伝子は数遺伝子に限られ、ほとんどの遺伝子変異は症例特異的であることが示されている<sup>2-4)</sup>。これらの変異は細胞機能に重要な Pathway 上の遺伝子に排他的に存在することが多く、発現状態からの重要遺伝子の検索は食道癌の発生・進展に関わる分子メカニズムをより直接的に同定できる可能性がある。網羅的遺伝子発現プロファイリング (遺伝子転写産物の定量解析) では、蛍光標識した RNA を既知の遺伝子

Corresponding author: Suburu Amano  
bull.bull.bull.747@gmail.com



Probe デザインはロシュ社 Universal Probe Library's assay design centre で行い、内因性コントロールには *GAPDH* を用いた。

#### 5. 免疫組織染色

4 症例の食道扁平上皮癌切除検体のパラフィン包埋切片を用い、抗 *TMPRSS11B* 抗体 (Anti-*TMPRSS11B* antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) による免疫染色を行った。免疫染色はプロトコールに従い Morpho Technology incorporated company (札幌) で施行した。

#### 6. 食道癌細胞への *TMPRSS11B* 発現 vector を用いた遺伝子導入

*TMPRSS11B* の coding region (1263bp) 全長が pcDNA3.1-N-enhanced green fluorescent protein (*eGFP*) vector に組み込まれた *TMPRSS11B* 発現 vector を作成した (GeneScript, Nanjing, Jiangsu, China)。食道癌細胞 KYSE410 に *TMPRSS11B* 発現 vector または control として pcDNA3.1-N-eGFP vector を Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 (Invitrogen, Carlsbad, California, US) を用いて導入した。

#### 7. western blot

上記の Vector を KYSE410 に導入し 24 時間後細胞を回収し 20  $\mu$ L の lysis buffer (9M urea, 4% Chaps, 2% Pharmalyte [pH 8.0-10.5], 65mM DTT) にて cell lysate とし -20°C で保存し、各サンプルで *TMPRSS11B*, EGFR, リン酸化 EGFR, Akt, リン酸化 Akt, p21, *GAPDH* タンパクについて western blot を施行した。サンプルは SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) によって分離、ニトロセルロース膜 (iBlot<sup>®</sup> Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular, Invitrogen) に転写後、5% non-fat milk/Tris Buffered Saline with Tween<sup>®</sup> 20 (TBST) (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, US) または 1% BSA/TBST で blocking を行った。

1 次抗体は 1:1000 の濃度で 4°C overnight, 2 次抗体は室温で 1 時間反応させ、Amersham ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) または Amersham ECLTM Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) で検出した。

#### 8. 5-Aza/dC を用いたメチル化阻害

*TMPRSS11B* の発現低下のメカニズムを解明する目的で、5-Aza/dC を用いてメチル化阻害実験を行った。食道癌細胞株 10 株を用いて 2  $\mu$ M の 5-Aza/dC または同量の phosphate-buffered saline (PBS) による処理を 72 時間行った。*TMPRSS11B* および対象としてメチル化による不活化が確認されている *ST6GALNAC1* の遺伝子発現量の変化を qRT-PCR によって測定した。

#### 9. 統計解析

統計解析は GraphPad PRISM 6 (GraphPad Software, La Jolla, California, US) および JMP 12 (SAS Campus Drive, Cary, North Carolina, US) を用い、遺伝子発現状態の比較は t 検定, Mann-Whitney の U 検定を、臨床病理因子との関連解析は  $\chi^2$  検定, Fisher 正確検定により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。生存解析は Kaplan-Meier 法にて行った。

#### 10. 研究倫理

本研究は岩手医科大学倫理委員会既定のヒトゲノム・遺伝子解析研究に係る倫理審査を受け、承認されたうえで行われた。(承認番号 HGH28-5)

### III. 結 果

#### 1. 食道癌臨床検体における RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析

食道癌発生に関与する遺伝子発現異常を同定するため、腫瘍占居部位、組織学的分化度、進行度の異なる 3 症例を対象として、次世代シーケンサーを用いた転写産物発現解析 (RNA-

表 1. RNA-seq を施行した食道癌 3 症例の患者背景

症例	実年齢	性別	占居部位 <sup>a</sup>	組織学的分化度	病理的進行度 <sup>b</sup>			
					T	N	M	Stage
1	70	Female	Ce	高分化	T1	N0	M0	IA
2	73	Male	Mt	低分化	T3	N0	M0	IIA
3	68	Male	Lt	中分化	T3	N1	M0	IIIA

<sup>a</sup>Ce, cervical esophagus; Mt, middle thoracic esophagus; Lt, lower thoracic esophagus

<sup>b</sup>Pathological stage は UICC の TNM 分類第 7 版に準じた。

表 2. 食道癌組織で発現低下を示した遺伝子

遺伝子	正常部	腫瘍部	発現差 (正常部 / 腫瘍部)
	(RPKM*)	(RPKM)	
1 <i>TMPRSS11B</i>	156.48	0.7	222.48
2 <i>SFTA2</i>	42.3	0.22	192.26
3 <i>MUC21</i>	494.75	3.24	152.54
4 <i>CRNN</i>	3015.85	20.17	149.5
5 <i>KRT4</i>	11106.92	75.48	147.15
6 <i>MAL</i>	2735.73	21.72	125.97
7 <i>CWH43</i>	15	0.21	70.3
8 <i>KRT78</i>	617.84	9.69	63.76
9 <i>KRT13</i>	37852.87	610.37	62.02
10 <i>CD207</i>	3.79	0.06	59.89
11 <i>ENDOU</i>	72.67	1.32	54.92
12 <i>PADII</i>	270.43	5.02	53.87
13 <i>CRISP3</i>	28.49	0.54	52.43
14 <i>EDN3</i>	17.19	0.33	52.09
15 <i>GABRP</i>	12.23	0.27	45.31
16 <i>TRPV6</i>	5.26	0.12	43.86
17 <i>CLCA4</i>	77.18	1.79	43.04
18 <i>CAPN14</i>	112.58	2.68	42.06
19 <i>RHCG</i>	4295.07	103.57	41.47
20 <i>MTIA</i>	31.58	0.77	41.19

\*RPKM, read per kilobase per million mapped reads

表 3. 食道癌組織で発現上昇を示した遺伝子

遺伝子	正常部	腫瘍部	発現差 (正常部 / 腫瘍部)
	(RPKM*)	(RPKM)	
1 <i>CST1</i>	0.21	160.41	763.84
2 <i>GRP</i>	0.01	6.88	516.25
3 <i>OBP2A</i>	0.02	7.77	466.4
4 <i>IL17C</i>	0.01	3.23	322.67
5 <i>MMP11</i>	0.64	160.47	250.74
6 <i>RNASE10</i>	0.03	5.27	175.56
7 <i>MMP13</i>	0.02	2.44	146.6
8 <i>HIST1H3G</i>	0.03	3.61	135.25
9 <i>HOXD11</i>	0.06	7.5	132.35
10 <i>MMP3</i>	0.02	2.17	130
11 <i>FCGR3A</i>	0.09	11.16	119.61
12 <i>INHBA</i>	0.34	34.46	101.34
13 <i>C6orf15</i>	0.12	11.05	94.69
14 <i>NPW</i>	0.68	59.56	88.01
15 <i>HOXD10</i>	0.11	8.95	83.94
16 <i>LRRC15</i>	0.04	2.59	70.73
17 <i>MMP1</i>	0.33	22.15	67.12
18 <i>COL1A1</i>	6.1	402.76	65.99
19 <i>RTP3</i>	0.05	2.98	63.79
20 <i>CA9</i>	1.49	78.96	52.88

\*RPKM, read per kilobase per million mapped reads

seq) を施行した (表 1). 正常組織あるいは癌組織で遺伝子発現が検出可能であった 17,673 個のうち正常組織に比べて食道癌組織で発現レベルが上昇または低下したそれぞれ上位 20 遺伝子を表 2, 3 に示した. 正常組織に比して癌組織で最も発現差を示した遺伝子は *CST1* であり, 癌組織に比して正常組織で最も発現差を示した遺伝子は *TMPRSS11B* であった. *TMPRSS11B* は染色体 4q13.2 にクラスターを形成する一群の膜結合型セリンプロテアーゼ

遺伝子 (*TMPRSS11* subfamily) に属するが, 同 subfamily member である *TMPRSS11A*, *TMPRSS11E*, *TMPRSS11BNL*, *TMPRSS11D*, *TMPRSS11F* のいずれも食道癌組織での発現低下が見られた (図 1). 以上より *TMPRSS11B* を含めた *TMPRSS11* subfamily の発現低下が食道癌発生に関与することが示唆された.

## 2. 食道癌における qRT-PCR を用いた *TMPRSS11B* 発現解析

64 症例の食道癌臨床検体における qRT-

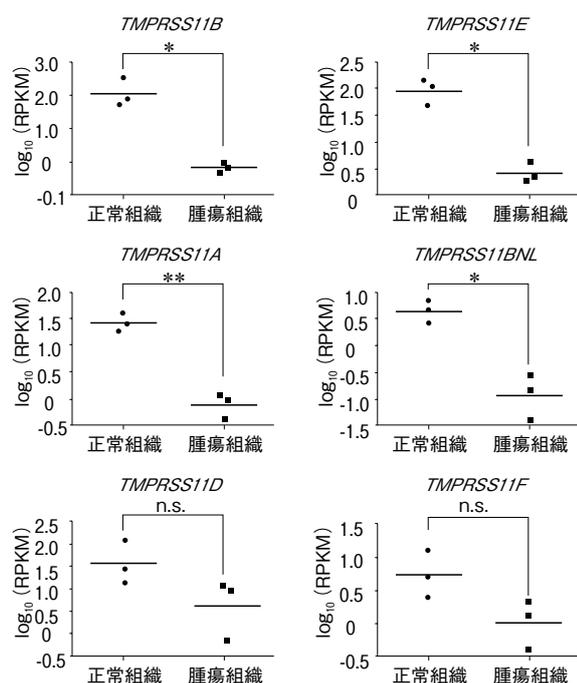


図 1. RNA-seq 解析による *TMPRSS11* subfamily 遺伝子の発現低下

RNA-seq による食道癌組織および正常食道組織における *TMPRSS11* subfamily 遺伝子 *TMPRSS11B*, *TMPRSS11E*, *TMPRSS11A*, *TMPRSS11D*, *TMPRSS11F* と *TMPRSS11BNL* の発現状態. *TMPRSS11CP* と *TMPRSS11GP* は検出できなかった. RPKM: Reads per kilobase of exon per million mapped reads.

\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$ .

PCR 解析では, *TMPRSS11B* の発現は食道癌組織で正常組織に比し有意に低下しており (図 2,  $p < 0.0001$ ), 腫瘍部における *TMPRSS11B* 発現低下は 64 例中 56 例 (87.5%) と高頻度であった. また, 食道正常組織 8 検体, 食道癌組織 18 検体, 食道癌細胞株 8 株では *TMPRSS11B* 発現はいずれも検出感度以下に低下していた (図 2).

### 3. *TMPRSS11B* の発現レベルと臨床病理学的因子との関連解析

腫瘍組織の *TMPRSS11B* の発現量に基づき 64 症例を高発現群 ( $n = 32$ ) と低発現群 ( $n = 32$ ) に分け, 発現状態と臨床病理学的因子との関連について検討した. *TMPRSS11B* 発現レ

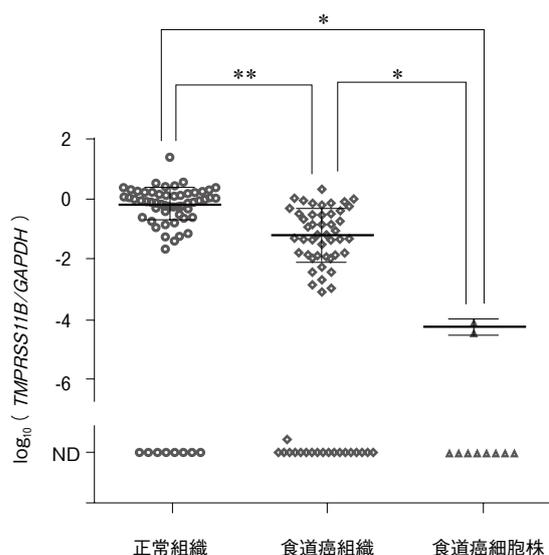


図 2. qRT-PCR 解析による食道癌 64 症例と食道癌細胞株 10 株における *TMPRSS11B* の発現 ND: Not detected.

食道癌組織 ( $n = 64$ ), 正常食道組織 ( $n = 64$ ), 食道癌細胞株 (10 株) における *TMPRSS11B* 発現状態. 食道癌組織 18 検体, 正常組織 8 検体, 細胞株 8 株では発現は検出感度以下に低下していた.

\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.0001$ .

ベルと年齢, 性別, 占居部位, 腫瘍深達度, リンパ節転移・脈管侵襲の有無, TNM stage との間に関連は見られず (表 4), また発現状態による生存率の差も認められなかった ( $p = 0.622$ ) (図 3).

### 4. 食道癌組織の *TMPRSS11B* タンパクの免疫組織染色

食道癌切除組織の *TMPRSS11B* 免疫組織染色では, 正常食道上皮では表面付近および傍基底層の細胞膜が染色されたが, 食道癌部では染色が認められなかった (図 4).

### 5. *TMPRSS11B* 過剰発現細胞でのタンパク発現の変化

食道癌細胞株 KYSE410 細胞に *TMPRSS11B* 遺伝子を導入し過剰発現させると, *TMPRSS11B* 発現株では control に比べ EGFR 総量は変化しなかったが, リン酸化 EGFR (pEGFR) およ

表 4. *TMPRSS11B* 発現状態と臨床病理学的因子との関係

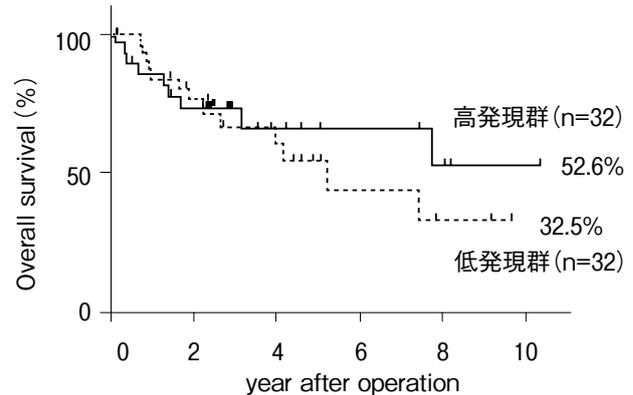
因子		高発現群	低発現群	p 値
		n = 32 (%)	n = 32 (%)	
年齢	< 65	14 (46.7)	16 (53.3)	0.8025
	65 ≤	18 (52.9)	16 (47.1)	
性別	男性	29 (55.8)	23 (44.2)	0.1069
	女性	3 (25.0)	9 (75.0)	
占居部位	Ph/Ut	0 (0.0)	4 (100.0)	0.0868
	Mt	21 (50.0)	21 (50.0)	
	Lt/Ae	11 (61.1)	7 (38.9)	
深達度	T0/T1	14 (63.6)	8 (36.4)	0.618
	T2	4 (57.1)	3 (42.9)	
	T3	13 (41.9)	18 (58.1)	
	T4	1 (25.0)	3 (75.0)	
リンパ節転移の有無	あり	17 (47.2)	19 (52.8)	0.8013
	なし	15 (53.6)	13 (46.4)	
TNM Stage	I	11 (57.9)	8 (42.1)	0.3911
	II	6 (50.0)	6 (50.0)	
	III	15 (45.5)	18 (54.5)	
組織学的分化度	高分化	10 (58.8)	7 (41.2)	0.6424
	中分化	9 (42.9)	12 (57.1)	
	低分化	13 (50.0)	13 (50.0)	
リンパ管浸襲の有無	あり	27 (48.2)	29 (51.8)	0.7078
	なし	5 (62.5)	3 (37.5)	
静脈浸襲の有無	あり	25 (49.0)	26 (51.0)	1.000
	なし	7 (53.8)	6 (46.2)	

Ph, hypopharynx; Ae, abdominal esophagus  
TNM stage は UICC の TNM 分類第 7 版に準じた。

び下流の Akt, リン酸化 Akt (pAkt) の発現が減少した。また, p21 は *TMPRSS11B* 導入で変化は認められなかった (図 5)。

#### 6. *TMPRSS11B* 遺伝子のメチル化解析

5-aza-dC 処理によるメチル化阻害では, いずれの細胞株でも *TMPRSS11B* の発現回復は見られなかった。食道癌でメチル化による発現制御が報告されている *ST6GALNAC1* では, メチル化阻害により有意な発現上昇がみられた (図 6)。



	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
高発現群 (例)	32	24	17	11	9	7	6	6	4	2	2
低発現群 (例)	32	27	21	13	11	7	6	5	3	3	1

Hazard Ratio	0.8084
95% CI of ratio	0.3498-1.870

図 3. 食道癌組織における *TMPRSS11B* 発現状態と生存率  
*TMPRSS11B* 高発現群 (n=32) と低発現群 (n=32) で生存率に差は見られなかった。

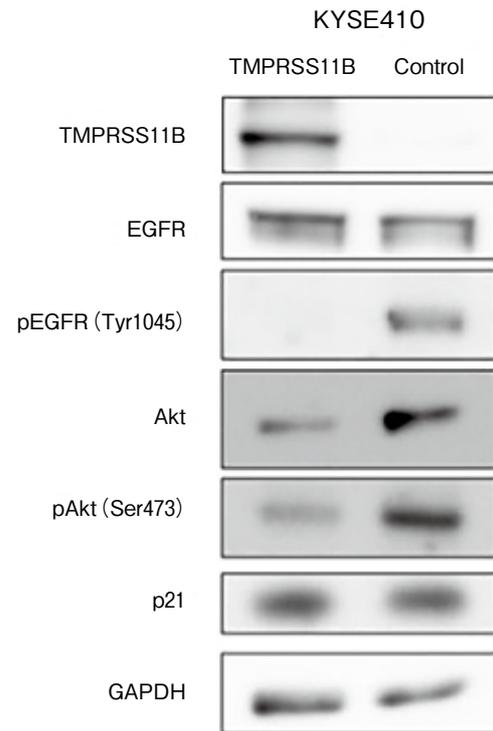


図 5. *TMPRSS11B* 過剰発現によるタンパク発現の変化

KYSE410 細胞に *TMPRSS11B* を導入し, western blot により左に示すタンパクの発現状態を検討した。 *TMPRSS11B* 過剰発現細胞では Control に比し pEGFR, Akt, pAkt の発現が抑制されていた。

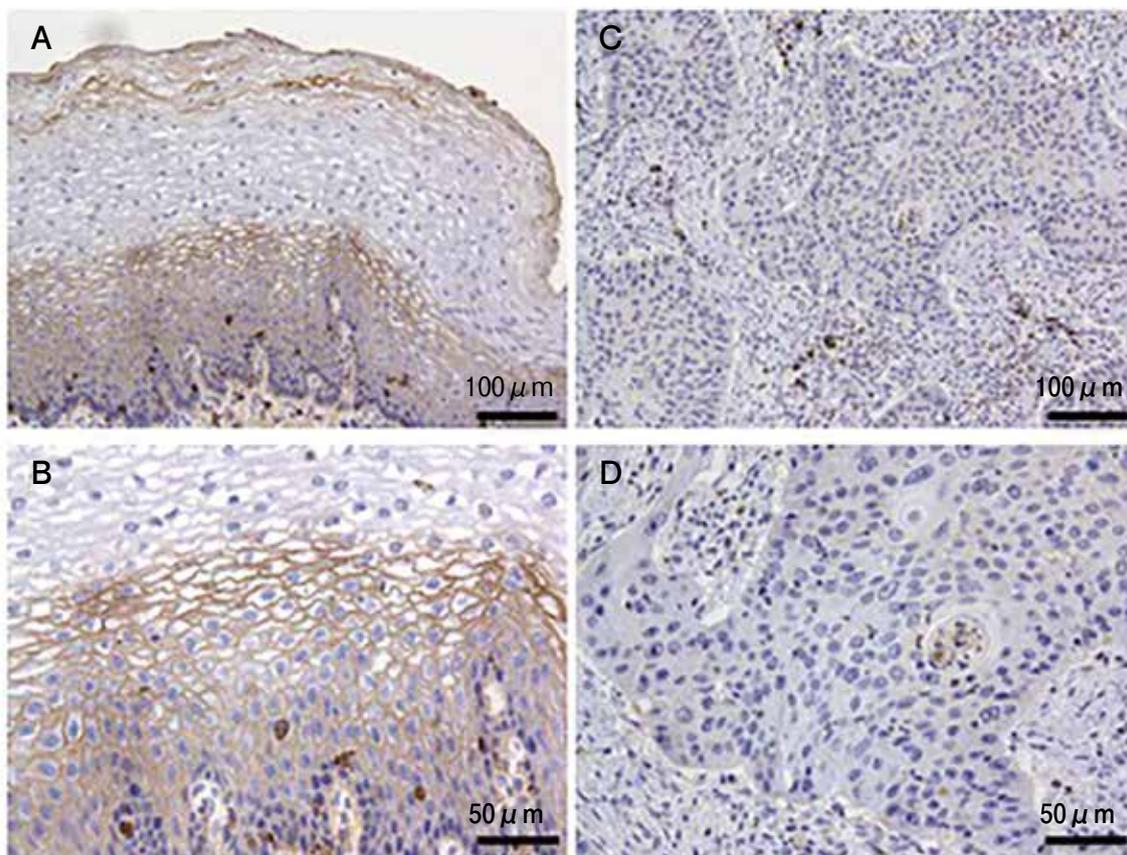


図4. 食道癌切除検体における *TMPRSS11B* の免疫組織染色  
(A, B) 食道正常組織. (C, D) 食道扁平上皮癌.

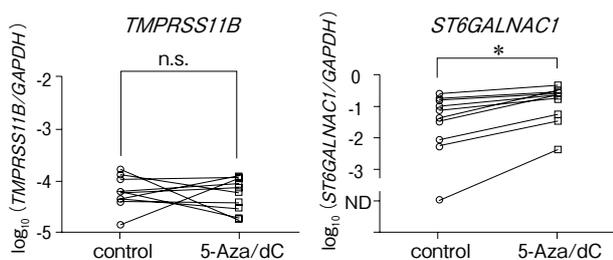


図6. メチル化阻害による *TMPRSS11B* 発現量の変化の検討

ND : Not detected.

食道癌細胞株 10 株で 5-Aza/dC によるメチル化阻害を行った。Control として遺伝子メチル化が示されている *ST6GALNAC1* を用いた。 *ST6GALNAC1* において TE8 の control 群では遺伝子発現は検出感度以下だった。 \*:  $p < 0.001$ .

#### IV. 考 察

食道癌組織と対応する正常食道組織を比較した網羅的遺伝子発現解析は cDNA microarray による解析に関するものが多い。今回のわれわれの RNA-seq 解析の結果と microarray 解析の既報告を比較すると、*CST1*, *MMP11*, *MMP13*, *MMP3*, *HOXD10*, *MMP1*, *COL1A1*, *CA9* などの食道癌組織での発現上昇遺伝子、*CRNN*, *KRT13*, *CLCA4*, *RHCG*, *KRT4*, *EDN3* など食道癌組織での発現低下遺伝子など対象や解析法によらず抽出される遺伝子も多く見られた<sup>5-12)</sup>。一方、食道癌における RNA-seq 解析 3 報告のうち、個々の遺伝子 (一部) の発現変動の記載のあるものは 2 報見られたが、われわれの発現解析結果と共通するものは *KRT4*, *KRT13* などごく少数に限られた<sup>14, 15)</sup>。これらの 2 報は症例数が 1 例およ

び3例と対象がわれわれと同様少数であったため、症例選択などで抽出される遺伝子に違いが出やすかった可能性が考えられる。2報告では進行癌の割合が高かったが、われわれは原発巣占居部位が頸部、胸部、腹部、組織学的分化度が低分化、中分化、高分化、進行度がTNM stage I, II, IIIと広い対象とすることで、食道癌発生初期から生じ、食道癌症例に広く共通する遺伝子発現異常の同定を試みた(表1)。本検討では、これまでのmicroarrayやRNA-seqを含む網羅的発現解析で同定することのできなかった*TMPRSS11B*を含むsubfamilyが食道癌で発現低下を示すことを明らかにした。*TMPRSS11B*の発現低下はほとんどの症例で見られ、その発現レベルと臨床病理学的因子との間に関連が見られないことから、食道癌発生早期から生じる異常であることが示唆された。

*TMPRSS11B*は4番染色体4q13.2にクラスターを形成する一群の膜結合型セリンプロテアーゼ遺伝子subfamily(*TMPRSS11* subfamily)に属している。*TMPRSS11* subfamilyには*TMPRSS11D*(HAT), *TMPRSS11E*(DESC1), *TMPRSS11F*(HAT-like 4:HATL4), *TMPRSS11B*(HAT-like 5:HATL5), *TMPRSS11A*(esophageal cancer-related gene 1:ECRG1)(括弧内はそれぞれの遺伝子がコードするタンパク質)、およびタンパクをコードしないpseudogeneである*TMPRSS11CP*, *TMPRSS11GP*, *TMPRSS11BNL*の8遺伝子からなる<sup>18-20)</sup>。これらの遺伝子は基本構造の類似性が高く、皮膚、口腔、子宮頸部、食道などの臓器ですべてあるいはその多くが共発現していることから、部分的な機能の重なりがあり臓器特異的に協調して機能していると考えられているが、Salesらは*TMPRSS11A*および*TMPRSS11D*遺伝子欠損マウスを用いた実験から、これらの遺伝子は表現型には影響せず発育や生存には必須なものではないと報告している<sup>20)</sup>。しかし近

年、食道上皮細胞でECRG1(*TMPRSS11A*)がp21を誘導しG1 arrestを惹起することや<sup>21-23)</sup>、DESC1(*TMPRSS11E*)がEGFR/Akt pathwayを介してapoptosisに関与していることが示され<sup>24)</sup>、これらの遺伝子が癌抑制遺伝子として機能していることを報告している。また、*TMPRSS11D*(HAT)や*TMPRSS11B*(HATL5)のタンパク発現が食道、頭頸部、子宮頸部扁平上皮癌で低下しており、やはり*TMPRSS11* subfamilyが癌抑制的な機能を有する可能性が報告されている<sup>25, 26)</sup>。本研究では食道癌組織と正常粘膜の網羅的遺伝子発現解析から*TMPRSS11B*を含めたsubfamilyのmRNAレベルでの発現制御を明らかにした。また食道癌細胞株への*TMPRSS11B*の遺伝子導入では、p21発現に変化はなくリン酸化EGFR, Aktの発現減少が見られることから、*TMPRSS11B*はECRG1(*TMPRSS11A*)のp21誘導とは異なり、DESC1(*TMPRSS11E*)と同様EGFR/Akt pathwayを抑制することで食道癌発生に関与する可能性が示唆された(図5)。

*TMPRSS11B*の不活化機序に関しては、*TMPRSS11B*の変異はこれまでに報告されていない。*TMPRSS11B*発現はmRNAレベルでの強い抑制が見られており、遺伝子の高メチル化による転写制御の可能性も示唆されたが、食道癌細胞株10株を用いて5-Aza/dCを用いたメチル化阻害実験では*TMPRSS11B*の発現回復は認められず、メチル化による発現制御の可能性は低いものと思われた。*TMPRSS11* subfamilyは4q13.2にクラスター形成しているが、食道癌では同領域のCopy Number Lossが報告されている<sup>27-31)</sup>。図1に示すようにsubfamilyすべての遺伝子において食道癌組織での発現低下が見られており、4q13.2領域の染色体欠失や減少が発現低下に関与しているものと考えられる。また、近年のゲノムワイド関連解析では、4q13.2上の*TMPRSS11*

subfamily 遺伝子クラスターのごく近傍に位置する *UGT2B10* の遺伝子型により, ニコチンおよびコチニンを代謝プロファイルが大きく異なることが報告されており<sup>32, 33)</sup>, 4q13.2 の異常が食道癌の発生に重要な役割をもつ可能性が示唆される。

これまで膜型セリンプロテアーゼの研究から *TMPRSS11* subfamily が扁平上皮癌で発現低下していることが報告されているが, 今回われわれは食道癌の RNA-seq による網羅的発現解析から *TMPRSS11* subfamily の発現低下を見出し, *TMPRSS11B* が癌抑制遺伝子として機能している可能性を示した。

稿を終えるにあたり, 本研究の御指導御協力を頂きました先生方に深く感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会科研費 JP26461995 の助成を受けたものである。

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない。

## References

- 1) **Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al.**: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-2917, 2010.
- 2) **Gao YB, Chen ZL, Li JG, et al.**: Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet* **46**, 1097-1102, 2014.
- 3) **Lin DC, Hao JJ, Nagata Y, et al.**: Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet* **46**, 467-473, 2014.
- 4) **Song Y, Li L, Ou Y, et al.**: Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature* **509**, 91-95, 2014.
- 5) **Luo A, Kong J, Hu G, et al.**: Discovery of Ca<sup>2+</sup>-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* **23**, 1291-1299, 2004.
- 6) **Uchikado Y, Inoue H, Haraguchi N, et al.**: Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **29**, 1337-1347, 2006.
- 7) **Yamabuki T, Daigo Y, Kato T, et al.**: Genome-wide gene expression profile analysis of esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* **28**, 1375-1384, 2006.
- 8) **Wong FH, Huang CY, Su LJ, et al.**: Combination of microarray profiling and protein-protein interaction databases delineates the minimal discriminators as a metastasis network for esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **34**, 117-128, 2009.
- 9) **Kashyap MK, Marimuthu A, Peri S, et al.**: Overexpression of periostin and lumican in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)* **2**, 133-142, 2010.
- 10) **Tao Y, Chai D, Ma L, et al.**: Identification of distinct gene expression profiles between esophageal squamous cell carcinoma and adjacent normal epithelial tissues. *Tohoku J Exp Med* **226**, 301-311, 2012.
- 11) **Hsu PK, Kao HL, Chen HY, et al.**: Loss of CRNN expression is associated with advanced tumor stage and poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* **147**, 1612-1618.e1614, 2014.
- 12) **Chen YK, Tung CW, Lee JY, et al.**: Plasma matrix metalloproteinase 1 improves the detection and survival prediction of esophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep* **6**, 30057, 2016.
- 13) **Wang Z, Gerstein M and Snyder M.**: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57-63, 2009.
- 14) **Ma S, Bao JY, Kwan PS, et al.**: Identification of PTK6, via RNA sequencing analysis, as a suppressor of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* **143**, 675-686, 2012.
- 15) **Jiang YZ, Li QH, Zhao JQ, et al.**: Identification of a novel fusion gene (HLA-E and HLA-B) by RNA-seq analysis in esophageal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**, 2309-

- 2312, 2014.
- 16) **Chen C, Peng H, Huang X, et al.**: Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 4507-4521, 2016.
  - 17) **Iwaya T, Fukagawa T, Suzuki Y, et al.**: Contrasting expression patterns of histone mRNA and microRNA 760 in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* **19**, 6438-6449, 2013.
  - 18) **Bugge TH, Antalis TM and Wu Q**: Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem* **284**, 23177-23181, 2009.
  - 19) **Antalis TM, Bugge TH and Wu Q**: Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* **99**, 1-50, 2011.
  - 20) **Sales KU, Hobson JP, Wagenaar-Miller R, et al.**: Expression and genetic loss of function analysis of the HAT/DESC cluster proteases TMPRSS11A and HAT. *PLoS One* **6**, e23261, 2011.
  - 21) **Zhao N, Huang G, Guo L, et al.**: ECRG1, a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, triggers a senescent program in NIH3T3 cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 84-90, 2006.
  - 22) **Yueying W, Jianbo W, Hailin L, et al.**: ECRG1, a novel esophageal gene, cloned and identified from human esophagus and its inhibition effect on tumors. *Carcinogenesis* **29**, 157-160, 2008.
  - 23) **Li LW, Li YY, Li XY, et al.**: A novel tumor suppressor gene ECRG4 interacts directly with TMPRSS11A (ECRG1) to inhibit cancer cell growth in esophageal carcinoma. *BMC Cancer* **11**, 52, 2011.
  - 24) **Ng HY, Ko JM, Yu VZ, et al.**: DESC1, a novel tumor suppressor, sensitizes cells to apoptosis by downregulating the EGFR/AKT pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **138**, 2940-2951, 2016.
  - 25) **Miller GS, Zoratti GL, Murray AS, et al.**: HATL5: a cell surface serine protease differentially expressed in epithelial cancers. *PLoS One* **9**, e87675, 2014.
  - 26) **Duhaime MJ, Page KO, Varela FA, et al.**: Cell Surface Human Airway Trypsin-Like Protease Is Lost During Squamous Cell Carcinogenesis. *J Cell Physiol* **231**, 1476-1483, 2016.
  - 27) **Kwong D, Lam A, Guan X, et al.**: Chromosomal aberrations in esophageal squamous cell carcinoma among Chinese: gain of 12p predicts poor prognosis after surgery. *Hum Pathol* **35**, 309-316, 2004.
  - 28) **Su M, Chin SF, Li XY, et al.**: Comparative genomic hybridization of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cell lines. *Dis Esophagus* **19**, 10-14, 2006.
  - 29) **Hao JJ, Shi ZZ, Zhao ZX, et al.**: Characterization of genetic rearrangements in esophageal squamous carcinoma cell lines by a combination of M-FISH and array-CGH: further confirmation of some split genomic regions in primary tumors. *BMC Cancer* **12**, 367, 2012.
  - 30) **Sawada G, Niida A, Hirata H, et al.**: An Integrative Analysis to Identify Driver Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* **10**, e0139808, 2015.
  - 31) **Qin HD, Liao XY, Chen YB, et al.**: Genomic Characterization of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Reveals Critical Genes Underlying Tumorigenesis and Poor Prognosis. *Am J Hum Genet* **98**, 709-727, 2016.
  - 32) **Patel YM, Stram DO, Wilkens LR, et al.**: The contribution of common genetic variation to nicotine and cotinine glucuronidation in multiple ethnic/racial populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **24**, 119-127, 2015.
  - 33) **Ware JJ, Chen X, Vink J, et al.**: Genome-Wide Meta-Analysis of Cotinine Levels in Cigarette Smokers Identifies Locus at 4q13.2. *Sci Rep* **6**, 20092, 2016.

## Downregulation of *TMPRSS11B* in esophageal squamous cell carcinoma

Suburu AMANO, Takeshi IWAYA and Yuji AKIYAMA

Department of Surgery, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on December 1, 2016 & Accepted on December 12, 2016)

---

### Abstract

This study aims to identify the genes responsible for esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) development, using gene expression profiling. Our transcriptome sequence analysis of surgically resected tumors and the corresponding normal tissues from 3 patients with ESCC revealed that *transmembrane protease serine 11* (*TMPRSS11*) subfamily genes showed decreased expression in ESCC tissues. A quantitative reverse transcription PCR demonstrated a downregulation of *TMPRSS11B* in ESCC tissues, compared with its expression

in the corresponding normal tissues (n = 64, p < 0.0001). There was no significant difference in the clinico-pathological factors between *TMPRSS11B*-high and *TMPRSS11B*-low expression groups. Moreover, *TMPRSS11B* expression was not detected in any of the 10 ESCC cell lines investigated, and overexpression of *TMPRSS11B* induced downregulation of EGFR and Akt in the ESCC cell line KYSE410. Our results suggest that *TMPRSS11B* has tumor suppressive roles in ESCC.

---