

機関番号：13401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790382
 研究課題名（和文） HGF 刺激後の miRNA による機能遺伝子の翻訳調節
 研究課題名（英文）
 Translational regulation of functional genes by microRNAs after HGF stimulation
 研究代表者
 長沼 誠二 （NAGANUMA SEIJI）
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号：50452123

研究成果の概要（和文）：

肝細胞増殖因子（HGF）の刺激により誘導される腫瘍細胞の上皮間質転換（EMT）は、ZEB1、ZEB2 を介して特定のマイクロ RNA（miR-200 ファミリー）によって制御されており、実際の食道癌病変においても浸潤先端部では ZEB が亢進、miR-200 ファミリーが低下していることを明らかにした。また ZEB の発現を抑えることによりこの EMT、ひいては癌浸潤を抑制できる可能性を明らかにした点で、食道癌の発生と広がりについての新たな見地を示す研究であるといえる。

研究成果の概要（英文）：

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of tumor cells promoted by stimulation of Hepatocyte growth factor (HGF) is regulated by some microRNAs (miR-200 family) via ZEB1 and ZEB2, and actually in esophageal cancer tissue, we clarified upregulation of ZEB, and downregulation of miR-200 family at the invasion front. Also, our data indicate that knockdown of ZEB prevents induction of EMT and cancer invasion as well, providing a novel mechanistic insight into esophageal carcinogenesis and tumor progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：食道癌、扁平上皮癌、EMT、マイクロ RNA、ZEB、HGF

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子(HGF)は肝細胞をはじめとした多くの細胞の再生・修復能に多大な影響を及ぼし、様々な腫瘍細胞においてもその増

殖・遊走・浸潤能に大きな影響を与える。HGF は多機能ペプチドであり、その下流のシグナリングに関する多くの研究・報告がなされているが、HGF 刺激によって作動する機能遺

伝子の発現調整機構については未だ不明な点も多く、研究途上の領域である。一方、マイクロ RNA (miRNA) は様々な腫瘍細胞において異なるプロファイリングを示し、部位や組織型によっても異なる miRNA が発現亢進・低下することが明らかになっている。また、腫瘍の増殖能や浸潤性、遊走能などの制御にも miRNA が関わっていることが明らかになってきており、同様に腫瘍細胞の動態に強い影響を及ぼす HGF シグナリングの過程においても、HGF 刺激後の機能遺伝子の発現に miRNA による翻訳調節が関与していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、HGF 刺激による機能遺伝子の発現に miRNA による翻訳調節が関与しているとの仮説の下、消化器癌での HGF 存在下、非存在下における形態学的変化と miRNA プロファイリングの変化を関連付けることによって、HGF 刺激による機能遺伝子の発現を制御する miRNA、特に腫瘍の増殖・浸潤・転移を制御する miRNA を同定して、標的となる mRNA を明らかにし、HGF 刺激によって作動する機能遺伝子を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

ヒト大腸直腸癌細胞株 Caco-2, CoCM1, LoVo, RCM1, ヒト舌癌細胞株 HSC3, SAS は RPMI-1640 (10%FBS) で培養した。ヒト食道上皮細胞株 EPC2-hTERT およびその派生細胞は無血清培地 KSMF で培養し、3 次元組織培養も行った。食道癌組織標本は、通常の病理組織標本として作製されたパラフィンブロックを使用し、HE 染色や様々な免疫組織化学染色を施した。また、この組織切片からレーザーマイクロダイセクション (LCM) 法により選択的に組織を採取し、mRNA および miRNA の発現を定量的 PCR (qPCR) により測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株や舌癌細胞株の培養液中に HGF を添加すると、細胞により程度は様々であるが、細胞の接着性が減弱して細胞同志が離れてくる (scattering) と同時に、細胞自体の形態も類円形からやや紡錘形を帯びたかたちになる (図 1)。この HGF 刺激により形態変化を来した細胞における miRNA の発現をマイクロアレイにて確認すると、miR-141, 200a を中心とした miR-200 ファミリーの発現が低下していることがわかった。miR-200 ファミリーは上皮間質転換 (EMT) の重要な誘導因子である ZEB1 をターゲットとすることが知られており、この EMT 様の形態変化と miRNA の変化の相関から、HGF が EMT を誘導したのと考えた。

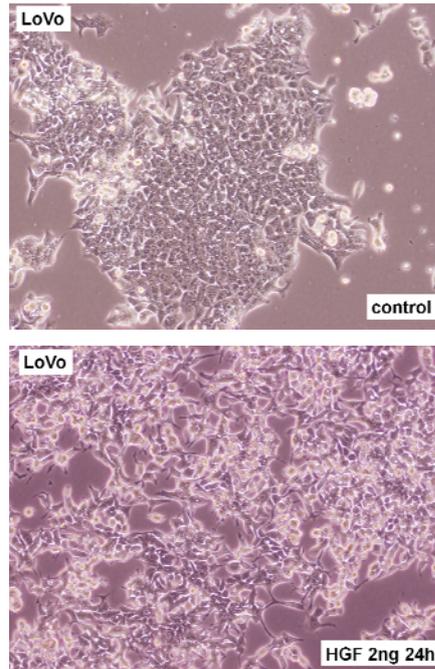


図 1: 大腸癌細胞株 LoVo の HGF 刺激による形態変化

(2) 次に我々は実際の癌組織内で、特に浸潤先端部の EMT 様形態変化を来した癌細胞において同様の変化がみられるかを検討した。

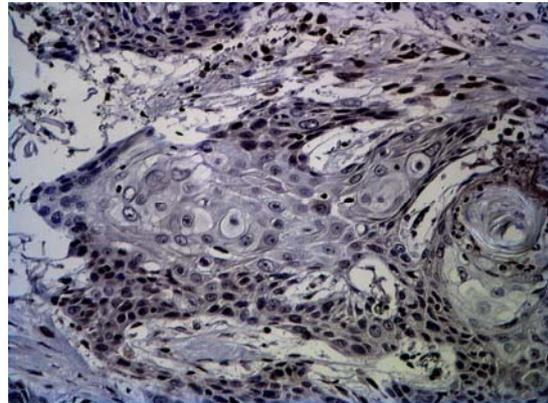


図 2: 食道癌組織の ZEB1 免疫染色

図 2 にみられるように、ZEB1 は癌巣中心部の比較的分化の高い部分では陰性で、癌巣辺縁部のやや分化の低い、ときに紡錘形を示す癌細胞において陽性であり、癌の辺縁部、特に浸潤先端部では EMT 傾向にあることが示唆された。このため、癌組織中の癌巣中心部と辺縁部 (浸潤先端部) に分けて LCM 法で組織を採取し、各々での miR200 ファミリーの発現を検討した (図 3)。EMT の指標として浸潤先端部の癌細胞にビメンチンの発現が見られたものと、見られないものについて比較したところ、ビメンチンの発現がある、すなわち EMT が起こっていると思われる症例群において、浸潤先端部での有

意な miR-200 ファミリーの発現低下がみられた。

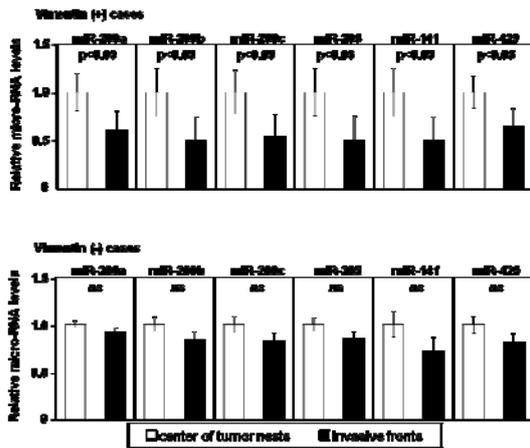


図 3: ビメンチン(+)の症例群では、全ての miR-200 ファミリーが浸潤部で発現低下、一方(-)群では有意な変化はなかった。

(3) 食道癌細胞株においても、ZEB1, ZEB2 および miR-200 ファミリーの発現を検討した。形態的にも間葉系の形質を持つ HCE4 と HCE7 は、他の細胞に比べてウェスタンブロットにおいて E-カドヘリンの低下、N-カドヘリンやビメンチンの上昇を示し、ZEB1, ZEB2 の高い発現と miR-200 ファミリーの低発現を示した。これはすなわち、癌組織内における EMT を起こした浸潤先端の細胞と同様の変化が起こっていると考えられ、前述の vivo の結果を支持するものである (図 4)。

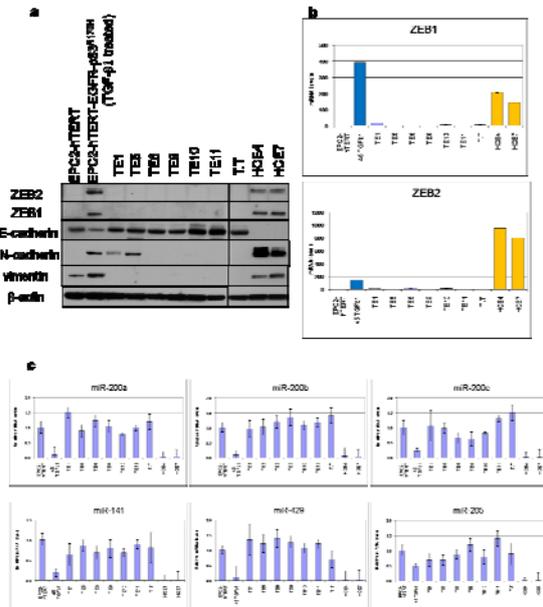


図 4: 食道癌細胞株のうち HCE4 と HCE7、それと形質転換した食道上皮細胞に TGF-β で EMT を誘導したもの (45TGFb1) では、明らかな ZEB1, 2 の高発現と miR-200 ファミリーの低発

現を認めた。

(4) 形質転換した食道上皮細胞 (EPC2-hTERT) に EGFR の過剰発現と p53 の変異を加えると、それだけでも紡錘形の細胞が出現するが、TGF-β の刺激によって EMT が誘導されやすい状態になる (図 5)。

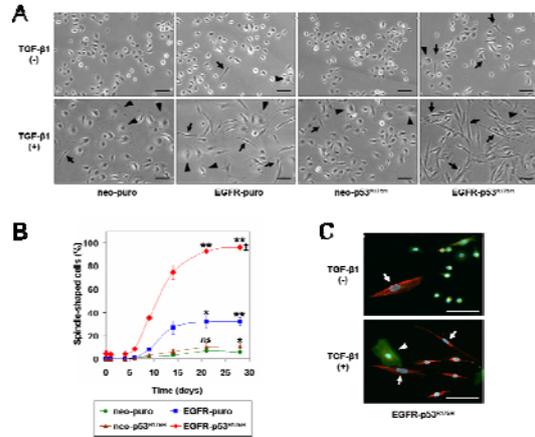


図 5: EPC2-hTERT 細胞に EGFR, 変異型 p53 およびその両方を誘導した場合の、細胞の形態変化および EMT の誘導されやすさの変化

この細胞を 3 次元培養してみると、コントロールの細胞と比べて明らかに下方への浸潤傾向を示すようになり、この浸潤部と表層部を LCM で取り分けて様々な EMT マーカーの発現を比較したところ、明らかに浸潤部のほうで高値を示した (図 6)。

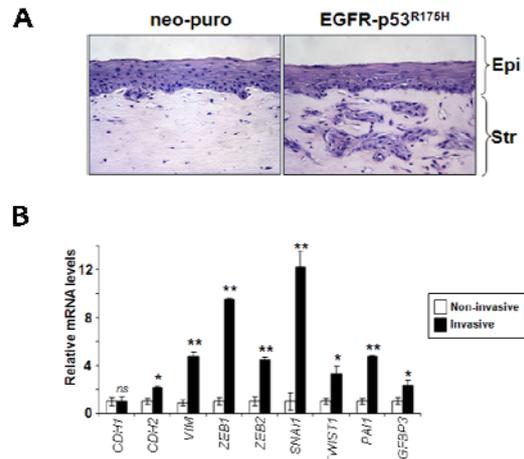


図 6: A 食道上皮細胞の 3 次元培養。右側の EGFR-p53 細胞では間質への浸潤傾向がみられる。この浸潤部と表層部の比較が B である。

さらにこの細胞に TGF-β で EMT を誘導すると E-カドヘリン (CDH1) から N-カドヘリン (CDH2) へのスイッチングが認められ、ZEB1, 2 の発現亢進も確認された (図 7)。そして miR-200 ファミリーもその多くで発現低下が

認められた (図 8)。

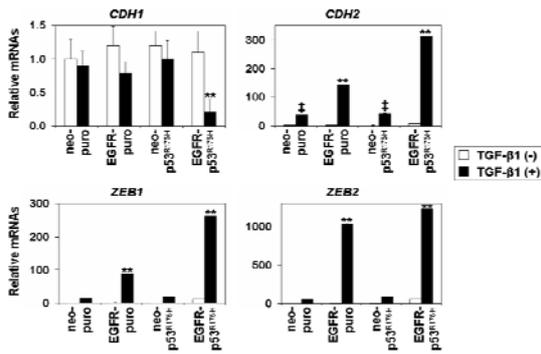


図 7: EMT を誘導した細胞におけるカドヘリン発現の変化 (CDH1: E-カドヘリン, CDH2: N-カドヘリン) と ZEB の発現変化

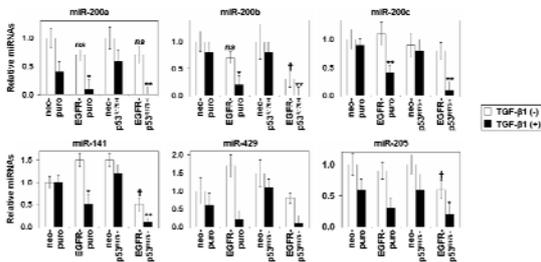


図 8: EMT を誘導した細胞における miR-200 ファミリーの発現変化

まとめ

本研究により、HGF による培養細胞の形態変化は、腫瘍細胞の浸潤・転移に重要な役割を果たす EMT と同様の変化であること。そして EMT は実際の癌組織においても ZEB1 の発現亢進というかたちで確認でき、このような場所では miR-200 ファミリーの発現低下が認められること。そしてこの ZEB と miRNA の変化は培養癌細胞株や、EMT を誘導した形質転換食道上皮細胞株でも同様に認められることが確認された。さらには ZEB1, 2 の発現を抑制した細胞においては EMT の誘導が抑制されるというデータもあり (今回提示せず)、これらの結果から、癌の EMT は miR-200 ファミリーを介した ZEB1, ZEB2 の発現によって制御されており、今後これらのファクターを制御することによりこの EMT、ひいては癌浸潤を抑制できる可能性が明らかになったと思われる。食道癌の発生と広がりについての新たな見地を示す研究であったと考えている。

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 1 件)

1. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol Rep.* 2010 Jun;23(6):1625-33. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 長沼誠二, 大橋真也, 木村相泰, 夏井坂光輝, 中川裕, 伊藤浩史 ZEB1 and ZEB2 promote tumor invasion and EMT in esophageal squamous cell carcinoma. 第33回日本分子生物学会年会 2010. 12. 10 神戸
2. Seiji Naganuma, Shinya Ohashi, Sotai Kimura, Mitsuteru Natsuzaka, Andre s J. Klein-Szanto, Hiroshi Itoh, Hiroshi Nakagawa. ZEB1 and ZEB2 promote EMT and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2010. 4. 19. Washington DC, USA
3. Sotai Kimura, Seiji Naganuma, Dai Susuki, Kazuo Sano, Hiroshi Itoh. High expression of microRNA-205 can be a possible biomarker of squamous epithelia: Application of miRNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by laser microdissection. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2010. 4. 19. Washington DC, USA
4. 長沼誠二, 木村相泰, 鈴木弟, 伊藤浩史 Expression of miR-200 family is associated with EMT (epithelial to mesenchymal transition) of esophageal squamous cell carcinoma. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009. 12. 11 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長沼 誠二 (NAGANUMA SEIJI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 50452123