

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791584

研究課題名（和文） 頭頸部癌におけるマイクロ RNA の働き

研究課題名（英文） Role of the microRNA in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

鈴木 弟 (SUSUKI DAI)

福井大学・医学部・医員

研究者番号：10444225

研究成果の概要（和文）：肝細胞増殖因子（HGF）は様々な細胞に分化・増殖・浸潤等を促す多機能因子であるが、どのように異なった機能を発現調節されているか不明である。本研究で、頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC3 において HGF 刺激により、いくつかの microRNA 発現が変化することをみつけた。さらに HGF 刺激により発現低下した miR-200c と miR-27b が各々、ZEB1/E-cadherin の発現変化を介して上皮間質移行に重要な役割を担い、ST14/matriptase による HGF 自己活性を行っていることを同定した。これらにより HGF は microRNA の発現変化を通して癌の浸潤や増殖に関与していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Hepatocyte growth factor (HGF) is a multifunctional molecule that acts as mitogen, motogen, and/or morphogen in a variety of cells. But how HGF affects the expression of downstream functional genes have not yet been elucidated in detail. In this study, we found several miRNAs that the expression was altered after HGF stimulation in HNSCC cell line HSC3. We found that miR-200c and miR-27b down-regulated by HGF might play an important role for epithelial-mesenchymal transition mediated by ZEB1/E-cadherin and ECM degradation and HGF auto-activation mediated by ST14/matriptase, respectively. These results suggest altered expression of miRNAs directly regulated by HGF might contribute enhanced progressive and invasive characteristics of HNSCC, by regulating the translation of HGF-induced functional molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：microRNA、HGF、頭頸部扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者及び所属機関は、様々な癌

腫の増殖や浸潤・転移、血管新生など多機能に関与する肝細胞増殖因子 hepatocyte Growth Factor(HGF)及び HGF レセプター

であり癌遺伝子の1つである *Met* を始めとする HGF 関連因子の頭頸部扁平上皮癌における発現と機能について研究してきた。その結果、HGF 及び HGF 関連因子は、頭頸部扁平上皮癌においても増殖や浸潤・転移に重要な働きを担っていることがわかった。しかし、HGF 刺激シグナルの下流がどのように調節されているかは不明な点が多い。近年、microRNA が癌遺伝子をはじめ、様々な機能発現に関与していることが報告されてきたが、その調節は不明な点が多い。そこで我々は、HGF 刺激の下流遺伝子の調節に microRNA が重要な働きを担っているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

マイクロRNA(microRNA)は様々な疾患において重要な働きをしており、たった1分子の発現変化で標的遺伝子発現を制御すると推測されている。そのため効率良い標的分子治療のターゲット、癌診断の有用なマーカーの有力候補とされている。本研究で、頭頸部扁平上皮癌における microRNA の役割とその制御機構の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 頭頸部扁平上皮癌細胞株および患者標本中の microRNA の発現について検討し、特異的な microRNA 発現プロファイリングを microRNA マイクロアレイ、リアルタイム PCR を用いて明らかにする。
- (2) 癌細胞株で、HGF 刺激により変動がある microRNA を、刺激前後の発現変化を検討することにより同定する。
- (3) HGF 刺激前後のプロテオーム解析で蛋白レベルでの発現変化を調べ、microRNA の発現変化と比べることにより、microRNA の標的遺伝子および機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) RT-PCR により、*c-met* mRNA の発現はヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株および正常粘膜上皮細胞、間質細胞すべてにおいて発現していたが、HGF mRNA は間質細胞にのみ発現していた。免疫染色では、MET は頭頸部扁平上皮癌細胞全般と重層扁平上皮基底細胞に強く発現し、HGF は間質細胞にのみ発現が認められた(図1)。

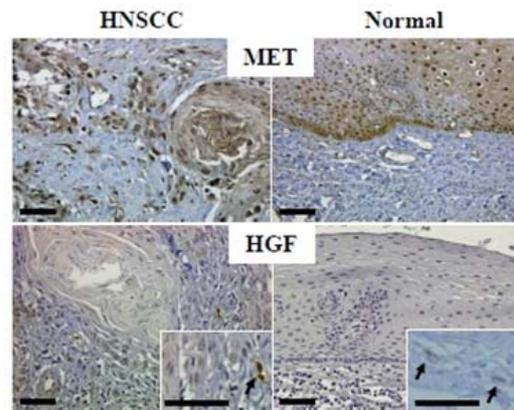
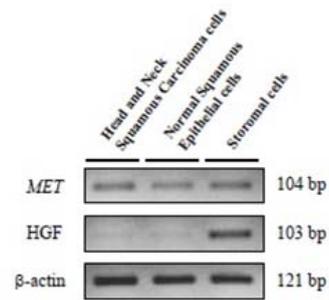


図1 頭頸部扁平上皮癌における HGF の発現

(2) ヒト扁平上皮癌細胞株 HSC3、SAS とともに *c-met* を発現しており、HGF 刺激により、MET がリン酸化しシグナル伝達されていることがイムノプロットで確認できた。両細胞株ともに HGF 刺激3日後には細胞が scatter していることが顕微鏡で確認できた。MTT assay で、HGF 刺激により SAS は有意な細胞増殖を認めたが、HSC3 では有意な細胞増殖は認められなかった(図2)。

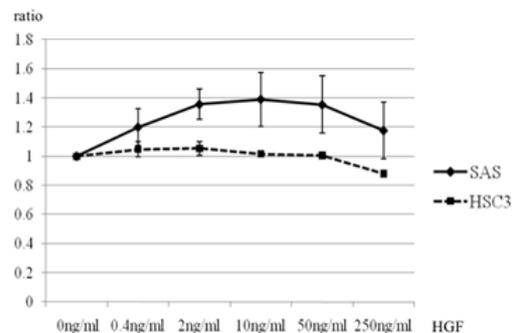


図2 MTT assay

(3)HSC3、SAS 両細胞株 HGF 刺激前後の miRNA の発現変化を microarray で検討したところ、いくつかの miRNA が変動していた (図 3)。

miRNA	Target gene	Expression ration
		HSC3 HGF (+) / HSC HGF (-)
LET-7A	RAS	0.16
MIR-205	MED1	0.25
MIR-200A	ZEB2, CTNNB1	3.89
MIR-200C	ZEB1	0.25
MIR-141	ZEB2	11.9
MIR-23A		0.2
MIR-27A	ABCB1	0.36
MIR-27B	ST14	0.44
MIR-16	BCL2	0.47
MIR-21	TPM1, PTEN etc	1.07

Red, increase in expression (> 2-fold); green, decrease (< 0.5) relative to control sample

図 3 microRNA microarray

そのなかで、miR-200c は両細胞株ともに、miR-27b は HSC3 で有意に発現低下しており、それぞれリアルタイム RT-PCR でも確認した。これらの miRNA は HGF 刺激 6 時間後にもっとも発現低下し、12 時間から 24 時間後には発現変化が消失していった(図 4-A)。

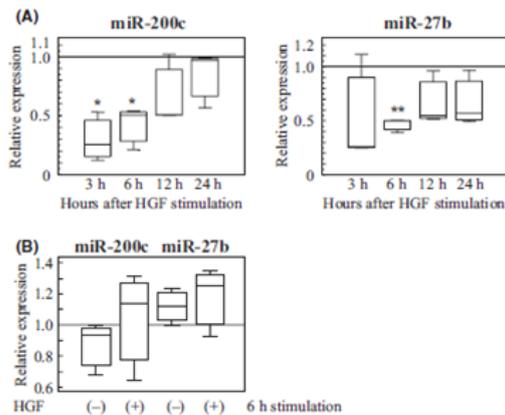


図 4 miR-200c と miR-27b の時間変化

さらに、MET 特異的阻害剤 SU11274 の添加により miR-200c と miR27b の発現変化は HGF 刺激前後で認められなくなった (図 4-B)。これらの miRNA の発現変化にやや遅れて、miR-200c のターゲットである ZEB1 の mRNA および蛋白レベルでの発現が増強し、ZEB1 による転写調節されている E-cadherin の発現は低下した (図 5)。

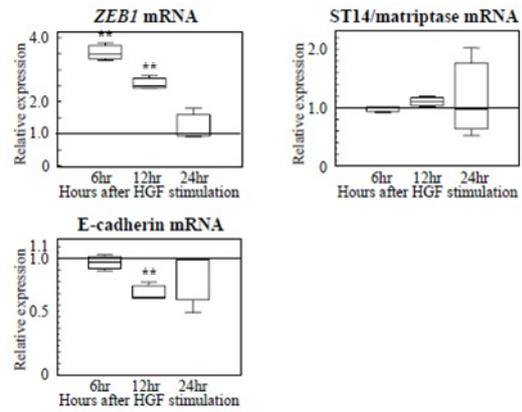


図 5 標的遺伝子 mRNA の経時的変化

一方、miR-27b の標的遺伝子 Matriptase/ST14 は mRNA レベルでは有意な変化がみられなかったが、蛋白レベルで発現が有意に増強していた (図 6)。

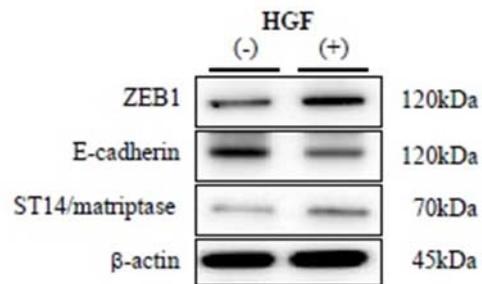


図 6 標的遺伝子の蛋白レベルでの変化

(4)HSC3 に miR-200c および miR-27b をトランスフェクションすると、各標的遺伝子の ZEB1、E-cadherin、Matriptase/ST14 の有意な発現変化は見られなくなった(図 7)。

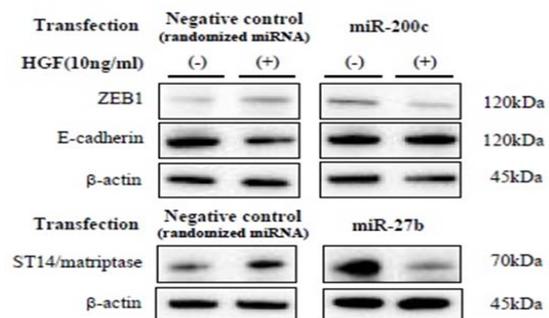


図 7 トランスフェクションによる変化

また、invasion assayにおいても、HGF 刺激より増加した癌細胞浸潤能も、それぞれの miRNA をトランスフェクションした細胞では抑制された(図 8)。

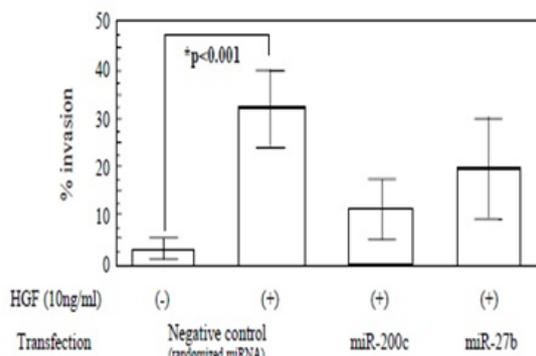


図 8 invasion assay

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 2 件)

① Dai Susuki, Sotai Kimura, Seiji Naganuma, Katsuki Tsuchiyama, Toshiaki Tanaka, Naomi Kitamura, Shigeharu Fujieda, Hiroshi Itoh, Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma. Cancer science、査読有、102(12):2164-2171. Dec. 2011
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02096.x.

② 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、査読有、23(6):1625-33. Jun. 2010
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428818>

[学会発表] (計 2 件)

① Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Dai Susuki, Sotai Kimura, Seiji Naganuma, Katsuki Tsuchiyama, Naomi Kitamura, Shigeharu Fujieda, Hiroshi Itoh. AACR American Association for Cancer Research 102nd ANNUAL MEETING、2011 年 4 月 2 日、Orlando, Florida

② Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma. Dai Susuki, Sotai Kimura, Seiji Naganuma, Katsuki Tsuchiyama, Naomi Kitamura, Shigeharu Fujieda, Hiroshi Itoh 第 32 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日、神戸

[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

鈴木 弟 (SUSUKI DAI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10444225