

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590455

研究課題名(和文) 種々の癌細胞における細胞増殖因子刺激によるマイクロRNA発現調節

研究課題名(英文) Regulation of microRNA by stimulation of growth factors in various cancer cells

研究代表者

伊藤 浩史 (ITO, HIROSHI)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80253847

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)：頭頸部扁平上皮癌培養細胞株においてHGF刺激前後で発現が変化する種々の遺伝子を制御しているmicroRNAとして上皮間葉系移行(EMT)に関与するZEB1をターゲットとするmiR-200cと、癌細胞の浸潤や増殖因子の活性化に関わるST-14/matriptaseをターゲットとするmiR-27bを同定した。また前立腺癌でGleason score別に癌細胞を分取することによって、生検時のGleason分類ではHigh riskがIntermediate riskが判定困難な症例で、miRNA-182が予後診断マーカーとして有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs miR-200c and miR-27b, both of which were down-regulated by HGF stimulation in cultured human head and neck squamous carcinoma cells (HNSCC), might play an important role in EMT mediated by ZEB1 and ECM degradation and HGF auto-activation mediated by ST-14/matriptase, respectively. Altered expression of these microRNAs directly regulated by HGF might contribute enhanced progressive and invasive characteristics of HNSCC by regulating the translation of HGF-induced functional molecules. We also confirmed that the expression of miR-182 depends on the cancer grade even in same Gleason pattern 4 of prostate cancer. Expression of miR-182 associated with Gleason grading system in biopsy sample may contribute to more accurate preoperative cancer risk evaluation.

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：マイクロRNA 細胞増殖因子 転写翻訳調節 HGF 癌細胞 頭頸部癌 前立腺癌 アンドロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年分子生物学の目覚ましい進歩により、癌細胞の増殖や、傷害組織の再生時における上皮細胞の増殖・分化に、様々な生理活性物質が関与しており、遺伝子変異や転写調節などにより、その発現が部位特異的に、また時々刻々と変化していることが明らかになってきた。このような生理活性物質のひとつである肝細胞増殖因子 Hepatocyte Growth Factor (HGF) は、劇症肝炎の患者血清から精製された培養肝細胞の増殖因子であるが、現在では肝細胞のみならず、種々の臓器における上皮細胞の増殖・分化にきわめて重要な役割を持つことが示されている。HGF は間葉系細胞より非活性型前駆体として分泌され、HGF 活性化蛋白である HGF Activator (HGFA) による活性化を受けて初めて生理活性をもつ。従って HGF そのものの発現調節のみならず、その活性化に関わるプロテアーゼ (HGFA) とそのインヒビターである HGFA inhibitor type-1 (HAI-1) and type-2 (HAI-2) の局所での発現バランスが、実際の HGF の生理活性を決定しており、局所での効果的な HGF の活性化機構こそが HGF 活性調節においてきわめて重要であることが我々の研究から明らかになってきた。我々はこれまでに消化管の傷害粘膜の再生修復や消化器癌における HGFA 及びその活性調節因子 HAI-1、HAI-2 の役割について、HGFA や HAI-1 ノックアウトマウスの作製などを含め多数の論文を発表し、国内外における研究をリードしてきた (Itoh H, Naganuma S, et al. *Gastroenterology*, 2004; Tanaka H, Itoh H, et al. *Mol Cell Biol*, 2005)。さらに、これら一連の研究の過程で HAI-2 遺伝子の 11kb 下流にアミノ酸 106 個からなるペプチドをコードする新規遺伝子 HAI-2 Related Small Peptide (H2RSP) を発見、*in vitro* の解析から核移行ペプチドであることを示し (Itoh H, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001)、正常消化管粘膜において、増殖の盛んな Crypt の上皮細胞では主に細胞質に、増殖が止まり分化した表層上皮細胞では核に局在し、傷害粘膜や癌の浸潤先端など増殖が盛んな部位では核に移行せず、細胞質に留まったまま高発現していることなどを報告した (Naganuma S, Itoh H, et al. *Virchows Arch.*, 2006; Uchiyama S, Itoh H, et al. *Gut*, 2007)。このように HGF 及びその関連蛋白は正常組織の再生・保護などに働く一方、癌組織においては増殖・浸潤・転移等を促していることが明らかになってきた。

(2) 一方、マイクロ RNA (以下 miRNA) は非常に小さい non-coding RNA で、相補的な標的 mRNA の翻訳制御を行っており、種々の癌細胞において変異や発現変化し、癌の増殖・浸潤・転移といった形質の発現に寄与していると報告されている。我々も過年度の科学研究費補助金等の研究助成を受けて、通常

の病理組織診断に用いられているホルマリン固定パラフィンブロックからマイクロダイセクション法とリアルタイム RT-PCR 法を用いて、簡便に miRNA を抽出、解析できることを明らかにし、頭頸部扁平上皮癌で特異的に発現が変化する複数の miRNA をマイクロアレイ解析などから同定し報告した (Kimura S, Naganuma S, Itoh H, et al. *Oncol Rep*, 2010)。しかしながらこのような癌における miRNA 発現の変化が、どのような刺激によりどのように行われているかほとんど分かっていない。HGF の刺激によっておこる様々な細胞形態・動態変化においても、下流の機能遺伝子の発現には、HGF 刺激による直接的な下流機能遺伝子 mRNA の転写調節とともに、miRNA による翻訳調節が関与していると考えられるが、そのような研究は上皮細胞増殖因子 Epidermal Growth Factor (EGF) で一つ報告が見られる他はまったく報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) このような背景の下、本研究ではこれまでの研究成果を踏まえ、HGF をはじめとする種々の増殖因子刺激によって発現が変化するターゲットとなりうる下流の機能遺伝子を制御する miRNA を明らかにし、臨床応用可能にすることを目的として行われた。

(2) 特にこれまで研究を進めてきた頭頸部扁平上皮癌において、培養癌細胞を用いて HGF 刺激前後に発現が変動する miRNA を中心に下流の機能タンパク質の発現解析を行った。

(3) さらに、最近増加傾向にある前立腺癌においても Gleason pattern 別に miRNA の発現解析を進め、診断、予後マーカーになる miRNA を検索した他、培養前立腺癌細胞株でアンドロゲン刺激前後で発現が変化する miRNA の解析を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 頭頸部扁平上皮癌細胞株を用い、肝細胞増殖因子 HGF の刺激前後での miRNA 発現変化をマイクロアレイ法を用いて検討した。発現が変化した miRNA については、標的遺伝子を検索し、その発現変化についても mRNA レベル、タンパクレベルで発現変化を検討した。

(2) 病理組織診断が終了した前立腺癌全摘出標本ホルマリン固定パラフィンブロックからフォイルスライドを作製、レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法を用いて、正常組織および癌組織を Gleason pattern 別に採取し、これまで前立腺癌で発現が変化していると報告されている miR-31, -34c, 96, -182, -183, -205, -221, -222 および internal control として RNU48 の発現量を real-time RT-PCR 法で定量し比較検討した。さらに前立腺癌生検標本において、上記 (2) で発現が変

化した miRNA の定量を行って検証を行った。

(3) 頭頸部扁平上皮癌細胞株を用い、肝細胞増殖因子 HGF の刺激前後での miRNA 発現変化をマイクロアレイ法を用いて検討した。発現が変化した miRNA については、標的遺伝子の発現変化についても mRNA レベル、タンパクレベルでその発現変化を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 扁平上皮癌の有力な増殖因子であり、予後因子である肝細胞増殖因子 (HGF) に着目し、培養頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、HGF 刺激前後でのマイクロ RNA の発現変化を検討し、HGF の機能発現に関わるマイクロ RNA の同定を試みた。その結果、頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC3 を HGF で刺激すると、短時間のうちにいくつかのマイクロ RNA の発現が変化することがマイクロ RNA マイクロアレイを用いた実験から明らかになった。これらのマイクロ RNA のうち Epithelial mesenchymal transition (EMT) 等がんの浸潤転移に関わる機能遺伝子の発現を調節しているマイクロ RNA (miR-200c および miR-27b) に注目し、まずこの 2 つのマイクロ RNA の HGF 刺激前後の発現を詳細に検討したところ、HGF 刺激後短時間のうちにその発現が著明に低下し、miR-200c の標的遺伝子である EMT に関わる ZEB1 遺伝子の発現増加とその下流の E-cadherin の発現低下、miR-27b の標的遺伝子である癌の浸潤や HGF の活性化に関わる ST14/matriptase の発現増加がみられた。さらにウエスタンブロット法によるタンパクレベルでもこれら遺伝子産物の発現変化を確認し、HGF 刺激と同時にこれらマイクロ RNA をトランスフェクションすると、標的遺伝子の発現変化が消失することも確認した。これらの結果をまとめると下記の図 1 のようなシグナル伝達経路が考えられた。

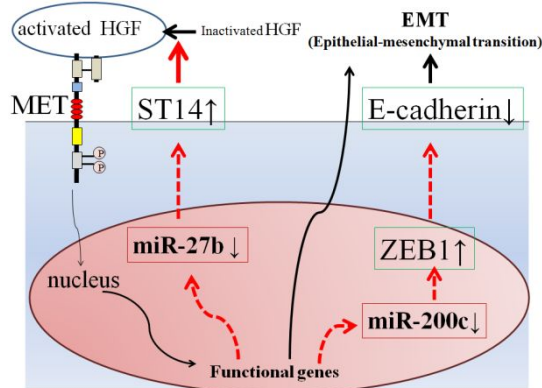


図 1 : 頭頸部扁平上皮癌における HGF 刺激によるマイクロ RNA 調節と機能発現のシエマ

(2) これらの実験結果から、頭頸部扁平上皮癌では、HGF 刺激によって直接、間接的にさまざまな遺伝子発現が変化するが、その一部はマイクロ RNA の発現を調節することによって機能遺伝子の翻訳調節を経て行われている

ことが明らかになった。したがってこれらのマイクロ RNA を投与することで、HGF 下流遺伝子の機能が阻害され、頭頸部扁平上皮癌の進展を阻害できる可能性が示唆された。現在、さらに miRNA マイクロアレイ解析から、同じように発現が変化したマイクロ RNA の機能解析を進めており、今後、予後・治療マーカーおよび治療薬としてのマイクロ RNA の可能性も追及していく予定である。

(3) 一方、前立腺癌における miRNA 発現解析では、まず、これまで前立腺癌で発現が変化していると報告されている miR-31, -34c, 96, -182, -183, -205, -221, -222 および internal control として RNU48 の発現量を real-time RT-PCR 法で定量し比較検討した。根治的前立腺摘除術の標本での検討では、miR-31, -34c, -205 は正常組織に比べ、癌組織で有意に低下していた (図 2)。

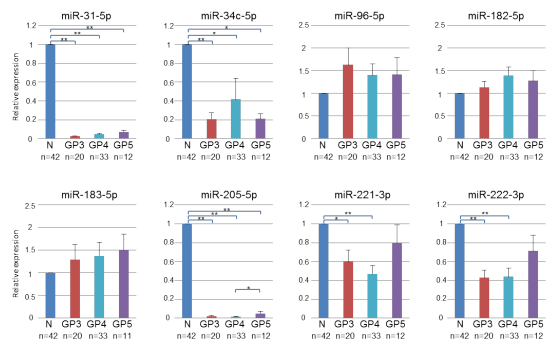


図 2 : 前立腺癌手術標本における各種マイクロ RNA 発現 (Gleason pattern 別での検討)

また同じ Gleason pattern (GP) を持つものの、リスクの異なる (異なる GS) 患者間における miRNA 発現量の変化同じ Gleason grade 4 であっても、miR-31, -182, -205 では high risk ほど発現量が有意に多かった (図 3)。

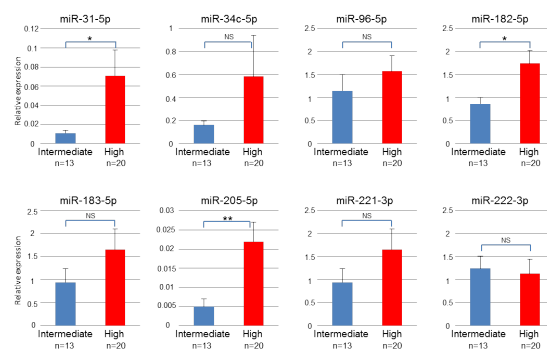


図 3 : 前立腺癌手術標本における各種マイクロ RNA 発現 (High risk 及び Low risk 別)

そこで同じ患者の手術前の前立腺生検の標本を用いて検証を行ったところ、確かにこれらの miRNA の発現量は high risk 群ほど高く、特に miR-182 は、high risk 群ほどその発現量が有意差を持って高いことが明らかになった (図 4)。

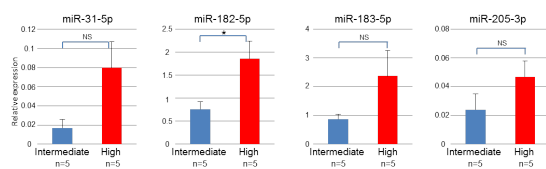


図4：前立腺癌生検標本におけるマイクロRNA発現の検証 (High risk 及び Low risk 別)

(4) したがって、前立腺癌における miRNA の発現量は全体としての悪性度、つまり Gleason score (GS) によって変化しており、特に miRNA-182 の発現量は前立腺癌のリスクを的確に反映し、高リスクの癌に対して有用なマーカーとなり得ることが明らかとなった。Gleason 分類に基づく miRNA 発現量を生検組織において評価することで、より正確な術前診断が可能となり、同じ GP4 を含む標本であっても miRNA-182 の発現量が高い時は GS7(GP4+3 or 3+4)と診断されても High risk group である可能性を考えて、術前放射線療法や術前化学療法が検討されるべきと考えられた。現在、さらに前立腺癌細胞株を用いて、アンドロゲン刺激前後で発現が変化したマイクロRNAの機能解析を進めており、今後、予後・治療マーカーおよび治療薬としての可能性も追及していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Naganuma S, Oshinoya Y, Nagano K, Yokoyama O, Itoh H, Expression of microRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer, *Prostate*, 査読有、2013、73: 827-834、

DOI:10.1002/pros.22626

Naganuma S, Whelan KA, Natsuizaka M, Kagawa S, Kinugasa H, Chang S, Subramanian H, Rhoades B, Ohashi S, Itoh H, Herlyan M, Diehl JA, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Nakagawa H, Notch receptor inhibition reveals the importance of cyclin D1 and Wnt signaling in invasive esophageal squamous cell carcinoma, *Am J Cancer Res*, 査読有、2012、2:459-475、

DOI: なし

Susuki D, Kimura S, Naganuma S, Tsuchiyama K, Tanaka T, Kitamura N, Fujieda S, Itoh H, Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Sci*, 査読有、2011、102: 2164-2171、

DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02096.x

Ohashi S, Natsuizaka M, Naganuma S, Kagawa S, Kimura S, Itoh H, Kaiman RA, Nakagawa M, Darling DS, Basu D, Gimotty

PA, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Herlyn M, Nakagawa H, A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors, *Cancer Res*, 査読有、2011、71: 6836-6847、

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0846

### 〔学会発表〕(計9件)

Ito H, Oga A, Ikemoto K, Kondo T, Chochi Y, Kawauchi S, Sasaki K, Itoh H, Comparison of proliferative capability of neoplastic and non-neoplastic cells by image cytometry, 第72回日本癌学会総会、2013年10月3日、横浜(パシフィコ横浜)

Taga M, Ito H, Taga M, Inamura S, Tsuchiyama K, Naganuma S, Yakoyama O, Itoh H, The inhibitory effect of autophagy induced by mTOR inhibitor on cell proliferation in renal cell carcinoma, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡(福岡国際会議場)

Naganuma S, Natsuizaka M, Ohashi S, Nakagawa H, Itoh H, A genetic crosstalk with Notch signaling in an organotypic 3D culture model of squamous cell carcinoma, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡(福岡国際会議場)

Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Naganuma S, Yakoyama O, Itoh H, Expression of microRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer, 第71回日本癌学会総会、2012年9月19日、札幌(ロイトン札幌)

Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Oshinoya K, Nagano K, Yokoyama O, Itoh H, Relationship between microRNA expression and Gleason grading system in prostate cancer, 103<sup>rd</sup> Annual meeting, American Association for Cancer Research (AACR)、2012年4月4日、Chicago, IL, USA

土山克樹, 伊藤秀明, 多賀峰克, 押野谷幸之助, 長野賢一, 伊藤浩史, 前立腺癌における Gleason grading system と関連する microRNA の発現解析, 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜(パシフィコ横浜)

鈴木弟, 土山克樹, 木村相泰, 長沼誠二, 藤枝重治, 喜多村直実, 伊藤浩史, ヒト頭頸部扁平上皮癌における肝細胞増殖因子によるマイクロRNA発現調節, 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜(パシフィコ横浜)

土山克樹, 伊藤秀明, 多賀峰克, 伊藤浩

史、前立腺癌の Gleason grading system  
と関連する microRNA の発現解析、第 70  
回日本癌学会総会、2011 年 10 月 4 日、  
名古屋（名古屋国際会議場）

Susuki D, Kimura S, Naganuma S,  
Tsuchiyama K, Tanaka T, Kitamura N,  
Fujieda S, Itoh H、Regulation of  
microRNA expression by hepatocyte  
growth factor in human head and neck  
squamous cell carcinoma、102<sup>nd</sup> Annual  
meeting, American Association for  
Cancer Research (AACR)、2011 年 4 月 3  
日、Orlando, FL, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~2byouri/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 浩史 (ITO, HIROSHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80253847

### (2) 連携研究者

長沼 誠二 (NAGANUMA, SEIJI)

高知大学・医学部・助教

研究者番号：50452123

片岡 寛章 (KATAOKA, HIROAKI)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10214321

喜多村 直実 (KITAMURA, NAOMI)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：80107424