

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591918

研究課題名(和文) miR-203を介した食道癌の増殖・浸潤・転移の発現・機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of miR-203 related to proliferation, invasion, and metastasis in esophageal cancer

研究代表者

森 幹人(Mori, Mikito)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90399452

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)：本研究の目的は食道癌におけるmiR-203を介した食道癌の増殖・浸潤・転移の発現機能解析を行うことであった。食道癌におけるmiR-203は、浸潤・転移能に関係していることが判明した。また、食道癌においてmiR-203により制御される遺伝子の同定を行うため、DNAマイクロアレイを用い解析を進めたところ、22遺伝子を同定することが可能であった。同定された22遺伝子の1つであるLASP1についてさらに解析を進めると、miR-203はLASP1のmRNAの発現を直接制御することで食道癌の浸潤・転移に関連していることが判明し、miR-203の発現により食道癌の悪性度が異なることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate how miR-203 is related to proliferation, invasion, and metastasis of esophageal cancer, we performed the expression and functional analysis of miR-203. We found that the expression of miR-203 may be related to invasion, and metastasis of esophageal cancer cell. In further investigation, we also identified 22 genes controlled by miR-203 in esophageal cancer cell using DNA microarray analysis. We found that LASP1, which was one of 22 genes that we identified in our study, was directly controlled by miR-203, and might be related to the mechanism of invasion, and metastasis in esophageal cancer cell. From these results, we concluded the difference of miR-203 expression in esophageal cancer cell may influence the outcome of treatment of the patients with esophageal cancer.

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学

キーワード：食道外科学 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいてタンパク質をコードする遺伝子の数はわずか 21,000 であると推測されている。これはヒトゲノムのわずか 2%にすぎないとされ、生物学的な複雑さはタンパク質をコードする遺伝子だけでは説明不可能であるとされている。この複雑さを解明するため、タンパク質をコードしない RNA(non-coding RNA)が近年注目されるようになり、マイクロ RNA(miR)の発現・機能異常が癌を含めた様々な疾患のメカニズムに関与していることが次々に報告されてきている。我々も以前より食道癌患者組織における miR の発現プロファイリングを行ってきた。その結果として、食道癌患者組織にて発現低下を認める 15 種の miR の同定に成功した。食道癌患者組織にて発現低下していた 15 種の miRのうち、miR-145・miR-133a・miR-133b の 3 つにおいて解析が進められ、これらの miR が oncogenic actin-binding protein である Fascin homolog 1 gene (FSCN1)を制御していることが判明した。よって、食道癌患者組織において miR-145・miR-133a・miR-133b の発現が低下していることにより、この FSCN1 の発現が高くなり、その結果として食道癌の増殖・浸潤能の増強に関わっていることを報告した。さらに他の miR においても解析を進めていく中で、我々の行った食道癌患者組織における発現プロファイリングにより同定された miR の 1 つに miR-203 も含まれていた。この miR-203 に関する報告は、2007 年に miR-203 が標的遺伝子の一つである p63 の発現量を制御することによって、皮膚組織におけるケラチノサイトの増殖・

分化および組織構築に関与していることが報告されて以来、様々な疾患にて注目されるようになった。これらの報告から miR-203 が標的としている遺伝子として p53、p63、p73 などの癌抑制に関連した遺伝子や Sox、Bmi1、KLF4 などの EMT に関連した遺伝子、さらに SOCS-3、SOCS-6 などサイトカイン signal pathway 抑制に関連した遺伝子等の関与が予想されていた。しかし、研究開始当初においては、癌と miR-203 との関連性については、膵癌・大腸癌・乳癌においてその関連性を示唆する報告が散見されていたが、食道癌と miR-203 あるいはその標的遺伝子との関連性については全く報告がない状態であった。さらに、以前より我々が行ってきた食道癌患者組織における miR に関する網羅的解析のデータから食道癌の悪性度との関連性において結果の得られた miR-145・miR-133a・miR-133b における発現・機能解析のデータと今回の研究対象としている miR-203 を制御する遺伝子ならびに miR-203 により制御される遺伝子の同定をさらに推し進めていくことにより、食道癌悪性度診断・放射線・化学療法の治療反応予測のみならず、創薬研究開発への足掛かりになると考えられ、本研究計画によって基礎研究から臨床応用までの一貫とした研究基盤を確立できるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究目的をとして、(1)食道癌における miR-203 の発現を制御する遺伝子の検索を行う。(2)miR-203 が制御する遺伝子群の同定ならびにその遺伝子群の発現解析・機能解析を行う。(3)miR-203 およびその関連遺伝子の発現パターンによる悪性度・治療効

果予測としての有用性の検討を行う。これら3つの研究目的を主に基礎的データを中心とした検討を行ったうえで、この研究で得られたデータを基盤とし、今後の食道癌診断あるいは治療効果増強を目的とした研究へのさらなる発展への足掛かりとすべく本研究を計画し実行することとした。

3. 研究の方法

まず(1)を検証する実験として、食道癌細胞株・患者組織を用いて、乳癌、大腸癌、膵癌に関して miR-203 の発現制御に関連していると報告されている ZEB1 遺伝子あるいはその関連性の示唆されている ZEB2・Snail 1 の遺伝子・タンパク質の発現量について免疫染色・RT-PCR 法を用いてその評価を行う。(2)を検証する実験として、miR のデータベース(miRBase)より miR-203 が標的とする様々な遺伝子群の検索を行う。そのデータベースを基に選別された遺伝子群の機能的なグループ分類を行う。具体例として、p53、p63、p73 などの癌抑制に関連した遺伝子群、Sox、Bmi1、KLF4 などの EMT に関与した遺伝子群、さらに SOCS-3、SOCS-6 などサイトカイン signal pathway 抑制に関与した遺伝子群など、癌細胞の stemness、EMT およびサイトカイン等に関与する遺伝子群を機能的に分類しグループ分けした遺伝子リストを作成する。また、食道癌細胞株を用いて miR-203 により変動する遺伝子群の抽出を DNA microarray を用いて行う。データベースの遺伝子群と DNA microarray により抽出された遺伝子群とを比較検証し、これらにおいて共通してリストアップされた遺伝子群における食道癌細胞株・患者切除標本を用いた mRNA・タン

パク質の発現量の定量を RT-PCR 法や Western blot 法を用いて評価する。さらに、食道癌細胞における miR-203 とその標的遺伝子の機能解析を行うために siRNA assay、RT-PCR 法、proliferation assay、invasion assay、migration assay 等の手法を行いそのメカニズムの評価を行う。(3)を検証する実験として、(2)の検証実験結果から得られた miR-203 の標的遺伝子の発現と miR-203 自体の発現との関係を明らかにし、さらに臨床検体を用いて miR-203 の発現量および標的遺伝子の発現量と各臨床病理学的因子の関係について統計学的手法を用いた評価を行い、予後予測あるいは治療効果予測マーカーとしての有用性を評価する。

4. 研究成果

(1)食道癌における miR-203 の発現を制御する遺伝子の発現・機能解析
食道癌細胞株5種と患者組織10検体における miR-203 の発現について非癌部組織をコントロールとしてその発現量の比較を行ったところ、全てにおいて miR-203 の発現低下が確認された。また miR-203 の食道癌における機能解析を食道癌細胞株2種(p53 mutant type /wild type 各々1種)を用いた proliferation assay、invasion assay、migration assay で評価したところ、proliferation assay においてはその関連性は認められなかったが、invasion assay、migration assay において miR-203 を導入した細胞株でその浸潤・転移能が抑制される結果が得られた。このことから、miR-203 は食道癌細胞株においてその細胞増殖能よりも浸潤・転移能により密接に関連している可能性が示唆されたため、そこで

miR-203 の発現制御に関連していると報告されている EMT に関連した ZEB1 遺伝子あるいはその関連性の示唆されている ZEB2・Snail 1 の遺伝子・タンパク質の発現量について食道癌細胞株あるいは患者組織検体に対し免疫染色・RT-PCR 法等を用いてその評価を行ったが先の乳癌、大腸癌、膵癌に関する報告のような結果は得られなかった。この結果から miR-203 の発現制御に関しては様々な要素が関連していると予想され、我々の3年間におよび様々な解析でも明確な結果は得られていない。この解析については今後も検討を継続して行く予定である。(2)miR-203 が制御する遺伝子群の同定ならびにその遺伝子群の発現解析・機能解析 SOCS-6 などサイトカイン signal pathway 抑制に関与した遺伝子群など、癌細胞の stemness、EMT およびサイトカイン等に関与する遺伝子群を機能的に分類した遺伝子リストを作成した。また、食道癌細胞株 2 種 (p53 mutant type /wild type 各々1種) を用いて miR-203 を導入し、導入細胞株と非導入細胞株とを用いた DNA microarray を用いて行い、miR-203 により変動する遺伝子群の網羅的抽出を行った。先の miRBase を元にした作成した機能分類された遺伝子リストと食道癌細胞株を用いた DNA microarray 解析により抽出した遺伝子群を比較したところ、実際に miR-203 により発現低下した 22 遺伝子が一致して抽出された。その 22 遺伝子の中の 1 つ LIM and SH3 protein 1 (LASP1) は乳癌・大腸癌の転移における関連性を示唆する報告があるものの、食道癌についてはその知見がなかったためさらに詳細な解析を進めた。まず、

先の DNA microarray 解析で用いた食道癌細胞株 2 種へ miR-203 を導入して細胞株における LASP1 の発現変化を検証したところ、両細胞株において LASP1 おける mRNA およびタンパク質の発現低下が確認された。また、miR-203 が直接 LASP1 遺伝子を制御しているか否かを検証するため target site inhibition assay を行ったところ、miR-203 と LASP1 との直接結合を阻害することにより LASP1 の発現が上昇することが証明された。以上から miR-203 は直接 LASP1 遺伝子を制御し mRNA やタンパク質の発現制御に関連していることが判明した。また、LASP1 遺伝子の機能解析を行うため、siRNA assay を用いて LASP1 の mRNA およびタンパク質の発現を低下させたところ、先の miR-203 を導入した細胞株の実験結果と同様、proliferation assay においてはその関連性は認められなかったが、invasion assay、migration assay においてその浸潤・転移能が抑制される結果が得られた。つまりこれまでの実験結果から、miR-203 は LASP1 遺伝子に直接結合することで LASP1 の mRNA・タンパク質発現を抑制しているため、食道癌において miR-203 の発現が低下してしまう事で LASP1 の mRNA・タンパク質発現が増強しその浸潤・転移能を高めているメカニズムが解明された。なお、LASP1 以外の遺伝子として膵癌における細胞増殖・浸潤・転移能に関与が指摘されている Semaphorin 5A (SEMA5A)、直腸癌において報告のある PDGFA associated protein 1 (PDAP1)、サイトカイン関連遺伝子の 1 つである IL15 等も今回の解析で抽出されており、LASP1 と同様に解析を進めており、

今後この解析を継続する予定である。

(3)miR-203 およびその関連遺伝子の発現パターンによる悪性度・治療効果予測としての有用性の検討

miR-203 の発現と LASP1mRNA の発現との関係については先の細胞株を用いた解析で逆相関の関係が得られていたが、実際の食道癌患者組織 18 検体を用いて検証を行ったところ、miR-203 の発現は非癌部と比較し、癌部においてその発現低下が認められた。さらに、LASP1 の mRNA 発現量と miR-203 の発現量は食道癌患者において逆相関の関係 ($r=0.347$, $p=0.0398$) にある事が証明された。この結果を基に、miR-203 および LASP1 の発現パターンによる悪性度・治療効果予測と行うため 18 検体において miR-203 の高発現群と低発現群の 2 群に分類し、その他食道癌 18 患者における臨床病理学的因子について統計学的手法を用いて解析したところ、relapse-free-survival (RFS) において miR-203 の高発現群と低発現群の 2 群間に統計学的有意差を得られた。この事から miR-203 および LASP1 の発現パターンは食道癌患者の悪性度評価の 1 指標として有用である可能性が証明された。なお、LASP1 以外の遺伝子として膵癌における細胞増殖・浸潤・転移能に関与が指摘されている Semaphorin 5A (SEMA5A)、直腸癌において報告のある PDGFA associated protein 1 (PDAP1)、サイトカイン関連遺伝子の 1 つである IL15 等についても上記の機能解析にて有用な結果が得られた後、今後も解析を進めていく予定である。

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) Nobuyuki T, Mikito M, Yasunori A, Hisahiro M et al.

miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1
International Journal of Oncology 41
1653-1661, 2012

[学会発表](計2件)

(1) 竹下修由 森 幹人 阿久津泰典 松原久裕ら

食道扁平上皮癌における miR-203 の発現機能解析

第 67 回日本消化器外科学会総会
2012 年 7 月 18-20 日 富山

(2) 竹下修由 森 幹人 阿久津泰典 松原久裕ら

食道扁平上皮癌における miR-203 の発現機能解析

第 112 回日本外科学会定期学術集会
2012 年 4 月 12-24 日 千葉

[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

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者 森 幹人 (Mori Mikito)

（千葉大学・医学部附属病院・助教）

研究者番号：90399452

(2) 研究分担者 阿久津 泰典 (Akutsu Yasunori)

（千葉大学・大学院医学研究院・講師）

研究者番号：00375677

研究分担者 川平 洋 (Kawahira Hiroshi)

（千葉大学・フロンティア医工学センター・准教授）

研究者番号：90447285

研究分担者 鈴木 一史 (Suzuki Kazufumi)

（千葉大学・医学部附属病院・助教）

研究者番号：00586737

(3) 連携研究者 松原 久裕 (Matsubara Hisahiro)

（千葉大学・大学院医学研究院・教授）

研究者番号：20282486