

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592590

研究課題名(和文) 癌抑制低分子核酸を基点とした癌転移能に関する新規分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Identification of tumor-suppressive microRNAs regulating metastatic pathways in HNSCC

研究代表者

関 直彦 (Seki, Naohiko)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50345013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：下咽頭癌マイクロRNA発現プロファイルの中で、これまで下咽頭癌での報告の無いmicroRNA-451aについて機能解析を施行した。その結果、microRNA-451aは、癌細胞の遊走や浸潤に関する「癌転移抑制型マイクロRNA」である事が示された。更に、ゲノム科学的手法により、microRNA-451aが直接制御する癌遺伝子として、ESDN/DCBLD2を探索した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed miRNA expression signatures of hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC) using clinical specimens. Using those data, we have investigated the specific roles of miRNAs in HSCC metastasis by examining the differentially expressed miRNAs. Our hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC) microRNA signature showed that miR-451a is significantly downregulated in cancer tissues, suggesting that miR-451a might act as a tumor suppressor. Restoration of miR-451a in cancer cell lines revealed that this miRNA significantly inhibited cancer cell migration and invasion. Our data demonstrated that the gene coding for endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like molecule (ESDN/DCBLD2) was a direct target of miR-451a regulation.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：マイクロRNA 下咽頭癌 癌抑制遺伝子 発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析研究の大きな成果として、ゲノム中には蛋白をコードしない低分 RNA が多数存在する事が明らかとなった。その中で、僅か 19 塩基 ~ 22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子 (マイクロ RNA) は、蛋白コード遺伝子の 3' UTR に結合し、mRNA の分解や、翻訳阻害から遺伝子の発現を制御している事が明らかとなった。現在、ヒトゲノム中には、2500 種類のマイクロ RNA が存在する事が明らかとなっている。1 つのマイクロ RNA は、数百 ~ 数千種の蛋白コード遺伝子を制御する事から、ヒトゲノムに存在する蛋白コード遺伝子の半数以上がマイクロ RNA の制御を受けている。そのため、マイクロ RNA の発現異常が、細胞内のマイクロ RNA-蛋白コード遺伝子の RNA ネットワークの破綻を来し、癌を含むヒト疾患の発症や進展に大きな影響を与えている。このような背景の中、癌細胞で発現異常を起こしているマイクロ RNA を同定し、マイクロ RNA が制御する分子ネットワークの解明が始まっている。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌の治療課題である局所制御と臓器温存の更なる向上を図るために、外科的手術、化学療法・放射線療法が開発され治療成績の向上が認められている。しかしながら、遠隔転移をきたした症例の予後は極めて不良であり、今後治療成績を向上させるためには遠隔転移の制御が不可欠である。しかしながら、扁平上皮癌の遠隔転移の分子メカニズムはいまだ十分に解明されていないのが現状である。先ずは、先端的な癌・ゲノム研究から、扁平上皮癌の遠隔転移に関わる分子ネットワークを再検討し、治療や診断の基礎となる標的を探索する事が重要と考える。本研究では、低分子核酸として注目されているマイクロ RNA を基点とした 21 世紀の癌・ゲノム研究から、扁平上皮癌の遠隔転移抑制のための分子標的を探索し、新規治療法開発に向けた基礎研究を行う提案である。

3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌臨床検体から、マイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、頭頸部扁平上皮癌で発現変動しているマイクロ RNA を探索する。これらマイクロ RNA の中で未だ機能解析に着手していないマイクロ RNA について、細胞増殖抑制、遊走抑制、浸潤抑制、アポトーシス誘導の解析を行う。これら機能解析から癌の遊走や浸潤を顕著に抑制する (癌の転移を抑制) マイクロ RNA を選択する。マイクロ RNA の生物学的な特徴は、1 分子のマイクロ RNA が複数のタンパクコード遺伝子の制御を行っている点である。しかしながら 21 塩基程度のマイクロ RNA が制御する遺伝子群は膨大であり (1 つのマイクロ RNA が数百の遺伝子を制御している場合もある) 単純にマイクロ RNA の配列予測からでは標的遺伝

子の同定は困難である。この問題に対して、ゲノムワイドな遺伝子発現解析と公共のマイクロ RNA データベースを組み合わせる事で、迅速かつ効率よくマイクロ RNA の標的遺伝子の同定を行う実験系を確立し、マイクロ RNA が制御する、頭頸部癌の新規分子ネットワークを解明する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイルの作成
今回作成した発現プロファイルの中で、癌細胞において発現抑制されているマイクロ RNA を調べた結果、microRNA-1、microRNA-206、microRNA-133、microRNA-133b、microRNA-29a、microRNA-29b、microRNA-29c、microRNA-218、microRNA-451a の抑制を認めた。これらマイクロ RNA について、頭頸部扁平上皮癌臨床検体 (下咽頭癌、口腔癌、舌癌) を用いて発現を確認した結果、全てのマイクロ RNA は頭頸部扁平上皮癌において発現抑制している事が確認できた。そのため、これらマイクロ RNA は、頭頸部扁平上皮癌における「癌抑制型マイクロ RNA」である可能性があり、機能解析を施行した。

(2) 「転移抑制型マイクロ RNA」の探索
頭頸部扁平上皮癌において発現が抑制されているマイクロ RNA について、癌細胞株 (FaDu, SAS) に核酸導入し、導入後の癌細胞の増殖・遊走・浸潤能の変化について解析を行った。解析の結果、microRNA-29a、microRNA-29b、microRNA-29c、microRNA-218、microRNA-451a が、顕著に癌細胞の遊走・浸潤を抑制した。この事から、これらマイクロ RNA は、「転移抑制型マイクロ RNA」である事が示唆された。マイクロ RNA の特徴は、その標的として蛋白コード遺伝子の発現を負に制御している事である。そこで、これらマイクロ RNA が制御している分子ネットワークの探索を行った。

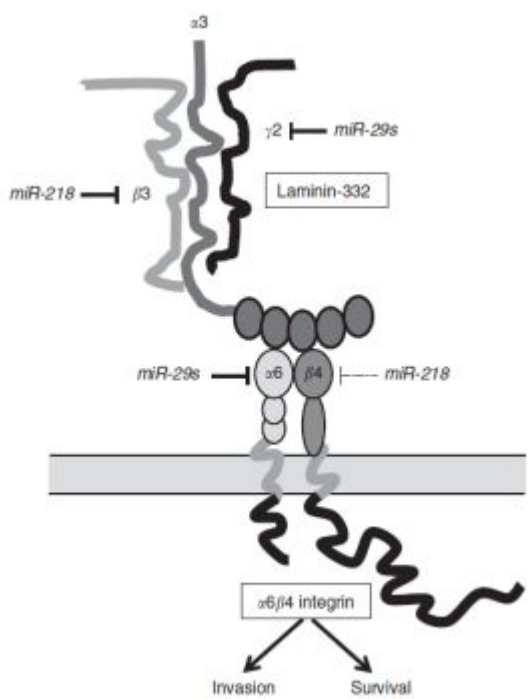
(3) microRNA-29a/b/c が制御する分子ネットワークの解析

microRNA-29a/b/c は、ヒトゲノム上で、miR-29b-1/microRNA-29a が 7q32.3 に、microRNA-29b-2/microRNA-29c が、1q32.2 にクラスターを形成している。これらマイクロ RNA の seed sequence (標的遺伝子の制御に重要な配列) は同じ事から、3 種類のマイクロ RNA は、同じ遺伝子を制御している事が予想される。今回、癌細胞に microRNA-29a を核酸導入し、細胞内で発現が抑制された遺伝子 (群) を、ゲノム網羅的なアレイ解析で探索した。更に、これら候補遺伝子の中で、頭頸部扁平上皮癌臨床検体で発現が上昇している遺伝子を、microRNA-29a/b/c が標的とする癌遺伝子候補とした。これら候補遺伝子の中で、細胞外マトリックスのリガンド受容体であるインテグリン (ITGA6) に着目し解析を行った。解析の結果、ITGA6 は、

microRNA-29a/b/c によって直接の制御を受けている事が判明した。更に、癌細胞で ITGA6 をノックダウンすると、癌細胞の遊走・浸潤が顕著に抑制された。この事から、ITGA6 は、頭頸部扁平上皮癌において、癌細胞の点に關与する癌遺伝子機能を有する事が判明した。

(4) microRNA-218 が制御する分子ネットワークの解析

microRNA-29a/b/c 同様に、microRNA-218 は、頭頸部扁平上皮癌臨床検体において発現抑制されており、癌細胞への核酸導入により顕著な、遊走・浸潤能の抑制を認めた。microRNA-218 が制御する分子ネットワークを解析した結果、細胞外マトリックスであるラミニン (LAMB3) を直接制御する事が判明した。LAMB3 は、頭頸部扁平上皮癌臨床検体で高発現しており、癌細胞でノックダウンすると、癌細胞の遊走・浸潤が顕著に抑制された。大変興味深い事に、microRNA-218 の標的である LAMB3 は、microRNA-29a/b/c の標的である ITGA6 のリガンドとして機能している事が報告されている。この事は、LAMB3 (リガンド) -ITGA6 (受容体) の高発現によりシグナル伝達が活性化され、頭頸部扁平上皮癌の転移をプロモートしている事が示唆された。



また、microRNA-218 は、インテグリン (ITGB4) も抑制している事が判明した。ITGA6/ITGB4 は、細胞外マトリックス受容体として2量体を形成しており、細胞の遊走・浸潤に重要なシグナル受容体である。これらシグナル経路の活性化の原因として、マイクロ RNA (microRNA-29a/b/c、microRNA-218) の発現抑制が示唆された。これらマイクロ RNA の発現抑制と、標的癌遺伝子の高発現が、頭頸部扁平上皮癌の転移機構に重要な役割を担っている事が示された。

(5) microRNA-451a が制御する分子ネットワークの解析

今回作成した頭頸部扁平上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイルより、これまであまり報告の無い microRNA-451a について機能解析を施行した。その結果、microRNA-451a は、癌細胞の遊走・浸潤を抑制する新規の「転移抑制型マイクロ RNA」である事が判明した。そこで、microRNA-451a が制御する新規癌遺伝子の探索を行った。その結果、endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin like molecule (ESDN) が、直接の標的である事が判明した。ESDN は、頭頸部扁平上皮癌臨床検体で高発現しており、癌細胞におけるノックダウン解析から、癌細胞の遊走・浸潤に關与する事が示された。これらの事から、ESDN を介するシグナルの活性化が頭頸部扁平上皮癌の転移に重要な役割を担っている事が示唆された。

(6) 頭頸部扁平上皮癌・癌抑制型マイクロ RNA (microRNA-29a/b/c、microRNA-218) の他の癌種における機能解析

今回の解析で明らかとなった頭頸部扁平上皮癌「転移抑制型マイクロ RNA」について、他の癌種における機能解析を施行した。その結果、microRNA-29a/b/c および microRNA-218 は、子宮頸癌 (扁平上皮癌) や、尿路上皮癌、前立腺癌の癌組織で有意に発現の抑制が認められた。また、これらマイクロ RNA は他の癌細胞においても癌細胞の遊走・浸潤を顕著に抑制する事から、ヒト癌細胞における「転移抑制型マイクロ RNA」として機能している事が明らかとなった。同様に、これらマイクロ RNA が制御する分子ネットワークを探索した結果、細胞外マトリックスの構成遺伝子を抑制している事が明らかとなった。ヒト癌細胞の転移には、これら「転移抑制型マイクロ RNA」の発現抑制によって、細胞外マトリックスとその受容体が高発現の状態になり、これら分子経路の活性化が誘導される事が明らかとなってきた。ヒト癌細胞の転移を制御するためには、これら分子経路を遮断する戦略が重要と考える。

マイクロ RNA 発現プロファイルから探索した「転移抑制型マイクロ RNA」を起点として、癌転移に関わる新たな分子経路の探索に成功した。これら分子経路を明らかにする事は、癌細胞の転移を制御する新たな治療戦略に繋がる知見を提供すると考える。

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10件)

Fukumoto I, Kinoshita T, Hanazawa T, Kikkawa N, Chiyomaru T, Enokida H, Yamamoto N, Goto Y, Nishikawa R, Nakagawa

M, Okamoto Y, Seki N.
Identification of tumour suppressive
microRNA-451a in hypopharyngeal squamous
cell carcinoma based on microRNA
expression signature.
Br J Cancer. 111:386-394, 2014. doi:
10.1038/bjc.2014.293. (査読有)

Kikkawa N, Kinoshita T, Nohata N,
Hanazawa T, Yamamoto N, Fukumoto I,
Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M,
Okamoto Y, Seki N.
microRNA-504 inhibits cancer cell
proliferation via targeting CDK6 in
hypopharyngeal squamous cell carcinoma.
Int J Oncol. 44:2085-92, 2014. doi:
10.3892/ijo.2014.2349. (査読有)

Nishikawa R, Goto Y, Kojima S, Enokida
H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Sakamoto S,
Fuse M, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T,
Seki N.
Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit
cancer cell migration and invasion via
targeting LAMC1 in prostate cancer.
Int J Oncol. 45:401-410, 2014. doi:
10.3892/ijo.2014.2437. (査読有)

Nishikawa R, Goto Y, Sakamoto S,
Chiyomaru T, Enokida H, Kojima S,
Kinoshita T, Yamamoto N, Nakagawa M, Naya
Y, Ichikawa T, Seki N.
Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits
cancer cell migration and invasion via
targeting of LASP1 in prostate cancer.
Cancer Sci. 105:802-811, 2014. doi:
10.1111/cas.12441. (査読有)

Nohata N, Hanazawa T, Kinoshita T,
Inamine A, Kikkawa N, Itesako T, Yoshino
H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki
N.
Tumour-suppressive microRNA-874
contributes to cell proliferation through
targeting of histone deacetylase 1 in head
and neck squamous cell carcinoma.
Br J Cancer. 108:1648-1658, 2013. doi:
10.1038/bjc.2013.122. (査読有)

Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N,
Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa
M, Shozu M, Seki N.
Tumor suppressive microRNA-218 inhibits
cancer cell migration and invasion by
targeting focal adhesion pathways in
cervical squamous cell carcinoma.
Int J Oncol. 42:1523-1532, 2013. doi:
10.3892/ijo.2013.1851. (査読有)

Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T,

Kikkawa N, Yamamoto N, Yoshino H, Itesako
T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki
N.
Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit
cancer cell migration and invasion by
targeting laminin-integrin signaling in
head and neck squamous cell carcinoma.
Br J Cancer.109:2636-2645, 2013. doi:
10.1038/bjc.2013.607. (査読有)

Yamasaki T, Seki N, Yoshino H, Itesako
T, Hidaka H, Yamada Y, Tatarano S, Yonezawa
T, Kinoshita T, Nakagawa M, Enokida H.
MicroRNA-218 inhibits cell migration and
invasion in renal cell carcinoma through
targeting caveolin-2 involved in focal
adhesion pathway.
J Urol. 190:1059-1068, 2013. doi:
10.1016/j.juro.2013.02.089. (査読有)

Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N,
Yoshino H, Itesako T, Fujimura L,
Mitsuhashi A, Usui H, Enokida H, Nakagawa
M, Shozu M, Seki N.
Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits
cancer cell migration and invasion via
targeting HSP47 in cervical squamous cell
carcinoma.
Int J Oncol. 43:1855-1863, 2013. doi:
10.3892/ijo.2013.2145. (査読有)

Kinoshita T, Hanazawa T, Nohata N,
Kikkawa N, Enokida H, Yoshino H, Yamasaki
T, Hidaka H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki
N.
Tumor suppressive microRNA-218 inhibits
cancer cell migration and invasion through
targeting laminin-332 in head and neck
squamous cell carcinoma.
Oncotarget. 11:1386-1400, 2012. (査読有)

[学会発表](計3件)

Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T,
Kikkawa N, Yamamoto N, Yoshino H, Itesako
T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki
N.
Tumor suppressive microRNAs
(miR-29s/miR-218) regulate
laminin-integrin signaling in head and
neck squamous cell carcinoma.
American Association for Cancer Research,
Annual meeting, 2014, April 5-9, San Diego,
California (USA).

Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N,
Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa
M, Shozu M, Seki N.
Tumor suppressive microRNA-29a inhibits
cancer cell migration and invasion via

targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma.
American Association for Cancer Research,
Annual meeting, 2014, April 5-9, San Diego,
California (USA).

Nishikawa R, Goto Y, Kinoshita T,
Sakamoto S, Chiyomaru T, Enokida H, Kojima
S, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.
Tumor suppressive microRNA-218 inhibits
cancer cell migration and invasion via
targeting LASP1 in prostate cancer.
American Association for Cancer Research,
Annual meeting, 2014, April 5-9, San Diego,
California (USA).

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
機能ゲノム学ホームページ
<http://genomejet.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者
関 直彦 (SEKI Naohiko)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50345013

(2)研究分担者
花澤 豊行 (HANAZAWA Toyoyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90272327