

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659407

研究課題名(和文) 肺癌増殖における炎症反応の関与と新たなマーカー・治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the involvement of the inflammatory response and development of a new marker and treatment in lung cancer growth

研究代表者

水野 圭子 (Mizuno, Keiko)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：50531414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺扁平上皮癌臨床検体におけるマイクロアレイ解析の結果から、正常肺組織と比較して有意に発現の低下を認めたいくつかのmicroRNA群を抽出した。そのうちのひとつであるmiR-1/133a clusterは膀胱癌、頭頸部癌等でも発現の低下が報告されており、本研究では肺扁平上皮癌においても腫瘍抑制効果があることを明らかにした。またその標的遺伝子の抑制が癌細胞の遊走及び浸潤抑制機能に深く関与していることを示唆する結果を得た。さらにmiR-206が肺癌における重要な遺伝子の阻害作用を有することを明らかにした。その腫瘍抑制機構の解明は将来的に新たな治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The results of the microarray analysis in lung squamous cell carcinoma clinical specimens was extracted several microRNA group showed a significant decrease in expression as compared to normal lung tissue. Among them which is one miR-1 / 133a cluster of has been reported decreased expression in bladder cancer, head and neck cancer and the like, in the present study revealed that there is a tumor suppressor effect in lung squamous cell carcinoma. Also inhibition of the target gene I got results suggest that are deeply involved in the migration and invasion suppressor function of cancer cells. Furthermore miR-206 is I revealed to have an inhibitory action of key genes in lung cancer. The elucidation of the tumor suppression mechanism it was considered that there is a possibility that lead to the development of future new therapies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺癌 マイクロアレイ マイクロRNA 遺伝子 miR-1/133a

1. 研究開始当初の背景

癌死亡原因の一位を占めている肺癌に対し、様々な治療薬が開発されているが、まだその効果は十分とは言えない。一方、間質性肺炎や肺気腫の患者では肺癌の合併率が高く、特発性間質性肺炎では4~15%で肺癌合併が報告されている。申請者らは、Th2細胞やNatural helper細胞から産生されるサイトカインが気管支喘息やCOPD(肺の気腫化)、間質性肺炎(肺の線維化)の病態に重要な役割を担っていることについて研究を重ねてきた。その中で、炎症性サイトカインの発現を調節するマイクロRNAが肺の炎症からの発癌、さらには癌増殖に関与するのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

間質性肺炎やCOPDなど炎症性肺疾患を合併することが多い肺扁平上皮癌患者の肺癌組織において、過去に行ったマイクロアレイ解析で正常組織と比較して有意に発現の低下を認めたいくつかのマイクロRNA群について、その機能を明らかにする。新たな炎症性発癌や癌増殖のメカニズムの証明と、肺癌発生の予防や新規治療の開発に繋がるものと期待する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体からのRNA抽出

肺扁平上皮癌32検体、正常肺22検体のFFPE検体を用い、10µm厚8枚の未染標本よりRecover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA)を使用し、RNAを抽出した。(図1)

(2) 細胞株の準備

細胞株はJCRB (Japanese Cancer Research Resources Bank) から入手したヒト扁平上皮肺癌細胞株であるEBC-1細胞を使用した。培地はRPMI1640(10%FBS)を用い、37度、5%CO2の条件で培養をおこなった。

(3) マイクロRNAおよび標的遺伝子の発現解析(RT-PCR法)

臨床検体及び細胞株におけるマイクロRNAsおよび遺伝子のmRNAレベルの発現解析にはRT-PCR法を施行した。TaqMan probeはCOR01C(assay ID: Hs00902568_m1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、miR-1(assay ID: 002222, Applied Biosystems)、miR-133a(assay ID: 002246, Applied Biosystems)を使用した。内在性コントロールは、mRNAはGUSB(assay ID: Hs99999908_m1; Applied Biosystems)、miRNAはRNU48(assay ID: 001006; Applied Biosystems)を用い、解析にはCT法を用い、発現比を計算した。

(4) 遺伝子導入

本実験では癌細胞で発現が低下している

miRNAについては遺伝子発現実験をおこない、発現が亢進している遺伝子についてはsiRNAによる発現抑制実験をおこない、それぞれの機能解析をおこなった。

細胞株へmiRNAおよびsiRNAの遺伝子導入にはリポフェクション法(リバーストランスフェクション)を用いた。miR-1、miR-133aの遺伝子発現実験はPre-miR™ miRNA precursors (P/N: AM 17100; Applied Biosystems)を使用し、negative controlのmiRNAとしてP/N: AM 17111; Appliedを使用した。siRNAはsi-COR01C(cat no. HSS119044, cat no. HS119045; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用し、negative controlのsiRNAとして(D-001810-10; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用した。miRNA、siRNAはLipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen)、OPTI-MEM (Invitrogen)と混和し、細胞液に加え、最終10nM濃度として使用した。

(5) 機能解析

増殖能評価

増殖能の評価には96wellプレートを用い、8000個/wellのEBC-1細胞に10nMのmiRNA、siRNAをリポフェクション法(リバーストランスフェクション)で遺伝子導入し、72時間後に評価した。細胞増殖の評価にはCell Proliferation Kit II (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)を使用し、遺伝子導入72時間後にXTT試薬を添加し、吸光度を比較し増殖率を評価した。

遊走能評価

遊走能の評価には6wellプレートを用い、80000個/wellのEBC-1細胞に10nMのmiRNA、siRNAをリポフェクション法(リバーストランスフェクション)で遺伝子導入した。遺伝子導入48時間後にP-20マイクロピペットチップでwell中央部に直線をひき、24時間後の線幅の縮小率を測定し、遊走能を評価した。

浸潤能評価

浸潤能の評価にはマトリゲルで底面加工(8µmフィルター)したBoyden chambers (BD Biosciences, Bedford)に10000個/wellのEBC-1細胞(10nMのmiRNA、siRNAを遺伝子導入48時間後)を無血清培地で懸濁したものを準備し、Boyden chambersをwell底面に血清培地を満たした24wellプレートに設置し、24時間後にマトリゲルを通過し血清培地側に移動した細胞数を計測比較した。

(6) miR-1/133aの標的遺伝子の選出

TargetScan database

(<http://www.targetscan.org>)、Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession number: GSE11117)などの公共のdata baseを用いて、標的遺伝子候補を検討した。さらにEBC-1細胞にmiR-1、miR-133aとコントロールのmiRNAを遺伝子導入し、マイクロアレイ解析: Oligo-microarray human

60Kv(Agilent Technologies)をおこない、もっとも発現が抑制された CORO1C を標的遺伝子候補とした。

(7) ウェスタンブロット解析

miR-1、miR-133a を EBC-1 細胞に遺伝子導入し、72 時間後に蛋白を抽出した。蛋白(100 μ g) を NuPAGE on 4-12% bis-tris gels (Invitrogen) により分離し(電気泳動 100V/40 分) polyvinylidene fluoride 膜に転写し、以下の実験を行った。一次抗体は monoclonal anti-coronin 3 antibody (ab77203; Abcam, USA)、内性コントロール GAPDH antibody(MAB374; Chemicon, Temecula, CA, USA)を使用し、二次抗体は HRP-linked anti-rabbit IgG antibody (#7074; Cell Signaling, Danvers, MA, USA)を使用した。echochemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用い検出し、蛋白レベルでの miR-1、miR-133a による CORO1C の発現抑制を評価した。

(8) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

本アッセイで使用した psiCHECK-2 vector (C8021; Promega, Madison, WI, USA)には mRNA の調節をモニタリングする第 1 レポーターであるホタルルシフェラーゼ (luc2) と標準化用のコントロールレポーターとして機能するウミシシタケルシフェラーゼ (hRluc-neo) が含まれる。luc2 の 3' 末端側に標的遺伝子の 3' -非翻訳領域 (UTR) をクローニングする。luc2 遺伝子の転写レベルはクローニングした標的配列と miRNA との相互作用によって調節されるため、ルシフェラーゼ活性を化学発光アッセイ dual-luciferase assay system (E1960; Promega)により測定することで、miRNA による目的遺伝子の阻害効果を定量的に評価した。

今回は、psiCHECK-2 vector に miR-1、miR-133a の標的遺伝子候補である CORO1C の 3' -非翻訳領域 (UTR) をクローニングした。コントロールベクターには CORO1C の 3' -UTR の miR-1 標的配列(CORO1C 111-118, 147-154)もしくは miR-133a 標的配列(CORO1C 147-154, 371-377)を変更した配列をクローニングした。

EBC-1 細胞ヘリポフェクション法(フォワードトランスフェクション法)により vector 50ng 及び miRNA 10nM を遺伝子導入した。遺伝子導入試薬には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 及び Lipofectamine RNAiMAX reagent を用いた。遺伝子導入 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより、クローニングした miRNA 標的配列に miRNA が結合したことを確認した。

(9) 統計解析

Mann-Whitney U test もしくは Bonferroni-adjusted Mann-Whitney U test

により検定した。解析には Expert StatView software, version 4 を使用した。

4. 研究成果

(1) miR-1、miR-133a の肺扁平上皮癌臨床検体及び細胞株における発現低下

miR-1、miR-133a の発現を RT-PCR 法により解析したところ、肺扁平上皮癌臨床検体 (n = 32) 及び肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1 細胞では正常肺組織 (n = 22) と比較し、有意な発現の低下を認め (P < 0.0001)。また、miR-1、miR-133a 両者の発現には相関をみとめた (r = 0.956 and P < 0.0001)。(図 2)

(2) miR-1、miR-133a の腫瘍抑制機能

miR-1、miR-133a を EBC-1 細胞に遺伝子導入し機能解析をおこなった。XTT assay では miR-1、miR-133a 導入細胞とコントロール細胞を比較し、miR-1、miR-133a の有意な増殖抑制効果を確認した (P < 0.0001)。同様に wound healing assay では遊走能 (P < 0.0001)、invasion assay では浸潤能 (P < 0.001) を抑制しており、miR-1/133a cluster はいくつかの oncogenic gene を標的とすることにより、重要な腫瘍抑制機能をもつと考えられる。(図 3)

(3) miR-1/133a cluster の標的遺伝子 CORO1C の細胞株における検討

EBC-1 細胞に miR-1 及び miR-133a を遺伝子導入し、mRNA レベル (RT-PCR 法, P < 0.001) 及び蛋白レベル (Western blotting) で CORO1C の発現抑制を確認した。(図 4)

さらにルシフェラーゼレポーターアッセイでは CORO1C における miR-1 もしくは miR-133a の予測結合配列を TargetScan database により検索し、vector へのクローニング配列を決定した。miR-1 については CORO1C の 3' -UTR (positions 111-118 and 147-154) に 2 箇所、miR-133a については CORO1C の 3' -UTR (positions 371-377) に 1 箇所の予測結合配列をもち、それぞれの配列を含む CORO1C の 3' -UTR を vector にクローニングし、コントロール vector では予測結合配列を変化させた。EBC-1 細胞に miR-1 もしくは miR-133a とその予測結合配列を含む CORO1C の 3' -UTR をクローニングした vector を遺伝子導入したところ、コントロール vector を遺伝子導入した EBC-1 細胞と比較してルシフェラーゼ活性が有意に低下していた (P < 0.0001)。このことから miR-1 及び miR-133a は CORO1C の 3' -UTR における特定の配列に直接作用し、その発現を抑制していることが示唆された。(図 5)

(4) 肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1 細胞における CORO1C の抑制による腫瘍抑制効果

EBC-1 細胞に CORO1C の siRNA を遺伝子導入することで CORO1C の発現を抑制し、その機能について評価した。siRNA による CORO1C の

発現抑制は mRNA レベル (RT-PCR 法) 及び蛋白レベル (Western blotting) で確認した ($P < 0.0001$) (図 6 a,b)

XTT assay では siCOR01C 導入細胞とコントロール細胞を比較し、siCOR01C 導入細胞で有意な増殖能の低下を確認した ($P < 0.005$)。また、wound healing assay では遊走能 ($P < 0.0001$)、invasion assay では浸潤能 ($P < 0.0001$) の著明な低下を確認した。(図 6 c,d,e)

さらに siCOR01C の導入細胞より抽出した RNA によりマイクロアレイ解析をおこなったところ、浸潤、増殖に関わるいくつかの Pathway が関与する遺伝子群に発現変化を認めた。これらには、“Pathway in cancer”、“Focal adhesion”、“Tight junction”、“Regulation of actin cytoskeleton”などの Pathway の関与が KEGG pathway 解析により示唆された。“Pathway in cancer”には BIRC5、HIF1A、MYC、RUNX1、VEGFC、VEGFA のような遺伝子が含まれており、肺扁平上皮癌における miR-1/133a-COR01C の関与する経路で重要な役割を持つ可能性があり、今後の検討課題である。

COR01C は胃癌やグリオブラストーマ等の悪性疾患において腫瘍の遊走、浸潤に関与する遺伝子であることが報告されている。COR01C は癌細胞の遊走・浸潤の際に形成される仮足に局在する。本研究では、COR01C は肺扁平上皮癌においても細胞株における機能解析により、遊走、浸潤へ関与する重要な遺伝子であることが示唆された。

miR-1 及び miR-133a は肺扁平上皮癌で発現が低下しており、その補充による腫瘍抑制機能は魅力的であり、今後の核酸創薬にもつながる可能性を秘めている。miR-1 及び miR-133a の腫瘍抑制機能には複数の oncogene の関与する可能性があり、遊走及び浸潤抑制機能には標的遺伝子 COR01C の抑制が深く関与することが示唆された。

本研究による知見は、今後発癌や癌増殖の新たなメカニズムの証明と、肺癌発生の予防や新規治療の開発に繋がるものと期待する。

図 1 臨床検体病理所見

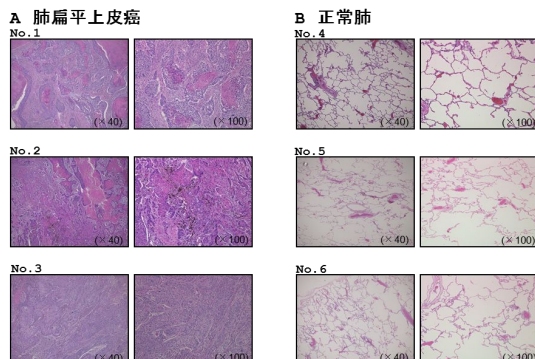


図 2 肺扁平上皮癌臨床検体及び細胞株における miR-1/133a の発現解析

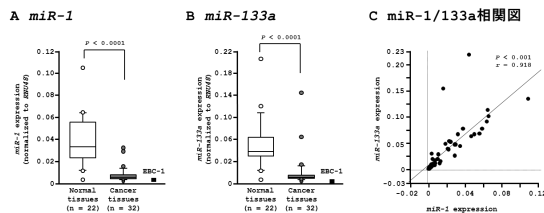


図 3 肺扁平上皮癌細胞株における miR-1/133a 機能解析

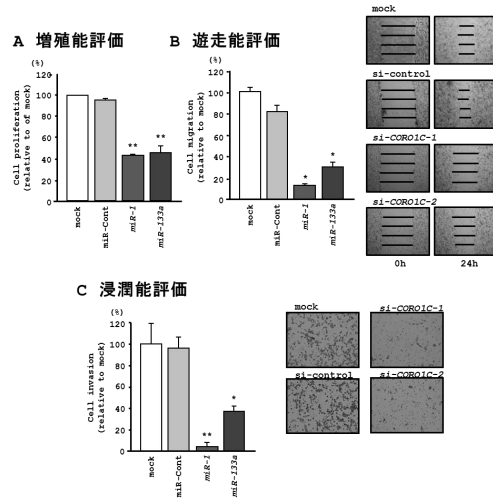


図 4 肺扁平上皮癌細胞株における miR-1/133a の COR01C 発現抑制

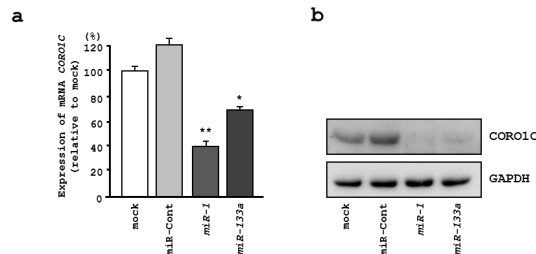


図 5 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

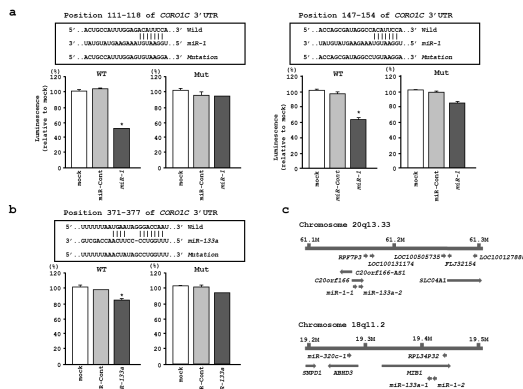
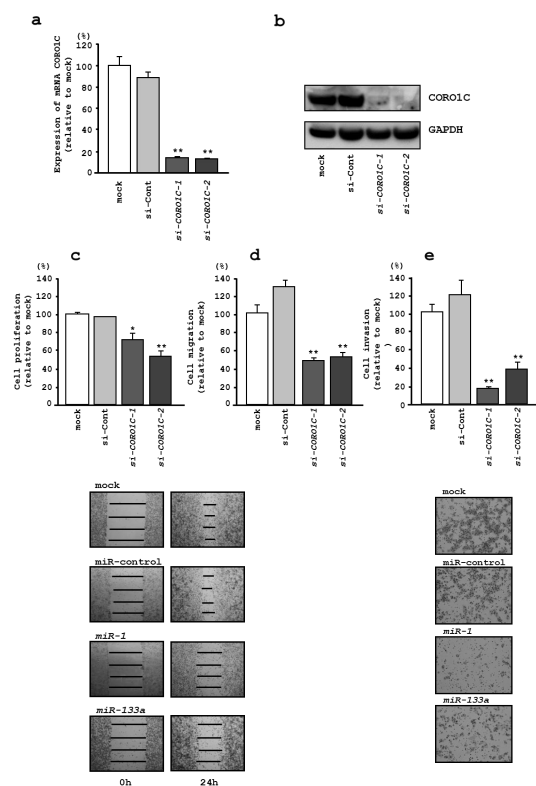


図6 肺扁平上皮癌細胞株におけるCORO1C機能解析



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) Mataka H, Mizuno K, Inoue H et al. Tumor-suppressive microRNA-206 as a dual inhibitor of MET and EGFR oncogenic signaling in lung squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 査読有 2015 Mar;46(3):1039-50. doi: 10.3892/ijo.2014.2802. Epub 2014 Dec 18.

2) Mataka H, Mizuno K, Inoue H et al. Downregulation of the microRNA-1/133a cluster enhances cancer cell migration and invasion in lung squamous cell carcinoma via regulation of Coronin1C. *J Hum Genet*. 査読有 2015 Feb;60(2):53-61. doi: 10.1038/jhg.2014.111. Epub 2014 Dec 18.

[学会発表](計 3件)

1) 俣木浩子、水野圭子、井上博雅、他 肺扁平上皮癌における腫瘍抑制性 microRNA-1/133a クラスタに関する検討、第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、2015 年 4 月、東京

2) 俣木浩子、水野圭子、井上博雅、他 ALK 融合遺伝子陽性高齢肺腺癌患者におけるクリゾチニブ血中濃度の検討、第 55 回日本肺癌学会学術集会、2014 年 11 月、京都

3) 俣木浩子、水野圭子、井上博雅、他 MicroRNA-206 function as a tumor suppressor via targeting MET in lung squamous cell carcinoma. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜

[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] ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 圭子 (MIZUNO KEIKO)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院

呼吸器内科・助教

研究者番号: 50531414

(2) 研究分担者

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

呼吸器内科学・教授

研究者番号: 30264039

(3) 連携研究者

なし