

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293077

研究課題名(和文) microRNAによるSrcがん形質発現シグナルの制御

研究課題名(英文) microRNA controls Src-induced cancer progression

研究代表者

小根山 千歳 (Oneyama, Chitose)

愛知県がんセンター(研究所)・感染腫瘍学部・部長

研究者番号：90373208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん原遺伝子産物Srcは多くのがん組織において発現・活性が亢進しており、細胞の増殖・浸潤など様々ながん形質の発現にSrcを鍵分子とするシグナル伝達系が深く関与していることが示されてきた。本研究では、c-Srcによるがん形質と相関するmicroRNAについて標的分子を解析することにより、SrcシグナルのmicroRNAを介した遺伝子発現制御機構を明らかとした。複数のmicroRNAは複合的にmTORC2の活性抑制を担う、あるいはSrcがんシグナル発信の場である細胞接着斑に関与する複数の因子の発現制御を行うなど協調してシグナルネットワークを制御しがん形質を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：c-Src is frequently upregulated in various human cancers and believed to play a pivotal role on malignant behavior of cancer cells. However, the molecular mechanism underlying c-Src-mediated tumor progression remains unclear. To address the molecular mechanisms underlying c-Src-mediated tumor progression through the regulation of gene expression, we examined the involvement of miRNAs in the c-Src-mediated cell transformation. Microarray profiling revealed that c-Src activation causes aberrant expression of a limited set of miRNAs. We investigated the function of these miRNAs and uncovered the miRNA-mediated regulation of c-Src oncogenic signaling and interplay between Src signaling and other oncogenic signaling, such as mTOR and focal adhesion-related pathways. Signaling molecules in such pathways are linked to each other, not only via phosphorylation and protein-protein interactions but also via translational regulation by miRNAs.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Src がん microRNA

1. 研究開始当初の背景

c-Src は代表的ながん原遺伝子産物とされ、多くのがん細胞で発現・活性の亢進が見られるが、必ずしも自身の遺伝子変異を伴わない。申請者は、c-Src の抑制因子である Csk を欠損したマウス線維芽細胞において、正常細胞型 c-Src によるがん化が誘導できることを見出した(Oneyama et al., Genes Cells, 2008)。これは、Src シグナル制御のわずかな破綻が、がん形質と密接に関連していることを示すだけでなく、この系によって、Src 依存的ながん形質に重要な分子機構を選択的に解析できることを意味する。実際に申請者は本モデル系を用い、脂質ラフトによる Src の新たな制御機構を発見した(Oneyama et al., Mol Cell, 2008; Oneyama et al., Mol Cell Biol, 2009)。

私はこれまでの研究で、本モデル系を用いたアレイ解析によって、Src の活性化により発現が変動する microRNA 群を見出した(Oneyama et al., Oncogene, 2011)。microRNA は、細胞内在性のノンコーディング RNA であり、標的となる mRNA と結合してその発現を調節していると考えられている。近年、がんにおいて microRNA の発現異常が種々見いだされ、個々の標的遺伝子の同定が試みられている。一方、それらとがん形質発現に関わるシグナルネットワークとの関わりについて包括的に研究した例はほとんどないのが現状である。Src の活性が高いことで知られるヒト大腸がん細胞と正常細胞について私が見出した microRNA の発現を調べたところ、悪性度の高いがん細胞で顕著な発現低下が認められた。さらに、これらのがん細胞にそれぞれの microRNA を導入することで、Src によるがん化やヌードマウスにおける腫瘍形成が顕著に抑制されることを見出した。一方、正常細胞にこれら microRNA の相補的 RNA を導入して機能を抑制すると、がん形質を獲得することも明らかとなった。

2. 研究の目的

microRNA とがん形質発現に重要なシグナルネットワークとの関わりを、Src シグナル制御機構を軸に解明する。近年 microRNA 異常とがん形質との関わりが盛んに研究されているが、microRNA は複数の標的遺伝子を制御するという複雑性があり、現象論を超えてその機構を解明することは容易でない。私は、代表的ながん原遺伝子 c-Src によるがん形質発現モデルが、がんシグナル制御の分子機構に対する効率的なツールであることを見出した。本研究では、その系を活用することにより、細胞内 Src シグナル制御における microRNA の寄与を明らかにするとともに、microRNA 含有エクソソームを介した Src シグナルの細胞間伝達の可能性について解析する。

3. 研究の方法

本研究では Src によるがん形質と関連する microRNA について標的分子を解明しシグナル経路を明らかにする()。また Src 自身の発現における microRNA の寄与を明らかにする()。一方で、Src による microRNA 自体の発現制御メカニズムを明らかにする()。さらに、がん化に伴う脂質ラフトの状態変化等から microRNA 含有エクソソームの分泌及び機能変化を明らかにし、そのがん微小環境における役割について探求する()。

がん形質と関連する microRNA の役割
microRNA と薬剤感受性
Src 自身の microRNA による発現制御
microRNA と Src シグナルの時系列解析
Src シグナルによる microRNA の発現制御機構

がん形質と microRNA 含有エクソソーム

4. 研究成果

本研究では、がん形質と関連する microRNA について標的分子を解明しシグナル経路について詳細な解析を行った。その結果、Src 活性化に伴い発現低下が見られ、再導入によってがん形質を抑制する microRNA のうち、miR-424/503 クラスターの標的遺伝子を探索し、mTOR 複合体 2 (mTORC2)の構成因子である Rictor であることを明らかとした。この miRNA クラスターは、Src 活性の高い大腸がんや前立腺がんの細胞株及び組織において発現が低下し、標的分子 Rictor の発現と逆相関することを見出した。さらにこれらのがん細胞株を用いて、miR-424/503 クラスターの機能を詳細に解析したところ、miR-424/503 クラスターにより発現制御される Rictor の発現亢進により、mTORC2 が活性化され腫瘍形成や浸潤能の亢進に寄与することを明らかとした。

同様に miR-27b の標的分子は、細胞接着斑からのシグナルに重要な paxillin であることを明らかとした。この microRNA は、Src 活性の高い大腸がんや前立腺がんの細胞株及び組織において発現が低下していた。さらにこれらのがん細胞株を用いて、この microRNA の機能を詳細に解析したところ、microRNA により paxillin の発現が抑制されると細胞接着斑の形成が不全となり、腫瘍形成や浸潤能の低下に寄与することを明らかとした。miR-27b がどのように Src 活性化により発現低下するかについて、Src シグナル下流経路の阻害剤を用いて発現のレスキューを調べたところ、主に Src 下流から Ras を介した PI3K 経路によって発現が抑制されることが示唆された。

また Src 誘導発現系を用い、Src 活性化初期に発現低下が見られ、再導入によってがん形質を抑制する microRNA の標的遺伝子を探索したところ、Src 自身とそのファミリー、また Src の基質として Src がシグナルを伝達する Fer キナーゼであることを明らかとした。この microRNA は、Src 活性の高い大腸が

んの細胞株及び組織において発現が低下していた。さらにこれらのがん細胞株を用いて、この microRNA の機能を詳細に解析したところ、microRNA により Src 及び Fer の発現が抑制されると細胞接着斑の形成が不全となり、腫瘍形成や浸潤能の低下に寄与することを明らかとした

さらに、Src 自身の microRNA による発現制御の可能性を考え、Src の 3' UTR 配列を標的とし得る microRNA をスクリーニングし、新たな microRNA を同定した。この miRNA は Src の発現の高い大腸がん細胞株において発現が低下し、これらががん細胞に導入すると、腫瘍形成や浸潤能などががん形質が抑制されることを見出した。これらにより、microRNA による Src シグナルの亢進とそれに伴う下流 microRNA の発現変動及び標的因子の発現調節、その結果としてのがん形質発現といった新たなシグナルネットワークが示唆された。この Src 自身の発現を制御する microRNA についてより詳細な機能を解析した結果、この microRNA は Src だけでなく Src ががん化シグナルを発信する場である細胞接着斑に存在する分子の発現を同時に抑制し包括的に Src ががん化シグナルを抑制することが明らかとなった。

またこれまで Src 活性化により発現が低下し Src がシグナルを抑制する microRNA について、それらの Src 活性化による発現制御メカニズムについて Src 誘導発現系を用いて解析した。その結果、Src 活性化に伴い、これらの microRNA は段階的に発現低下し、それぞれが標的分子の発現抑制を介して包括的に Src ががん化シグナルを抑制することが明らかとなった。さらに Src シグナルの細胞間伝達の可能性について調べるにあたり、microRNA 含有エクソソームの量及び内包された microRNA 群について解析を行った。

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)

1. *Oneyama C, Yoshikawa Y, Ninomiya Y, Iino T, Tsukita S, Okada M. Fer tyrosine kinase oligomer mediates and amplifies Src-induced tumor progression. *Oncogene*, 35(4), 501-512 (2016) DOI: 10.1038/onc.2015.110. (査読有) *corresponding author
2. Matsuyama R, Okuzaki D, Okada M, *Oneyama C. miR-27b suppresses tumor progression by regulating ARFGEF1 and the focal adhesion signaling. *Cancer Science*, 107(1), 28-35 (2016) DOI: 10.1111/cas.12834. (査読有)
3. *Oneyama C, Okada M.: MicroRNAs as the fine-tuners of Src oncogenic signaling. *J Biochem*, 157(6), 431-438 (2015) DOI:

10.1093/jb/mvv036. (査読有)

*corresponding author

4. Kakumoto K, Ikeda J, Okada M, Morii E, *Oneyama C. mLST8 promotes mTOR-mediated tumor progression. *PLoS One*, 10(4), e0119015 (2015) DOI:

10.1371/journal.pone.0119015. (査読有)

*corresponding author

5. Saitou T, Kajiura K, Oneyama C, Suzuki T, Okada M. Roles of raft-anchored adaptor Cbp/PAG1 in spatial regulation of c-Src kinase. *PLoS One*, 9(3):e93470. (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0093470. (査読有)

6. Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, Oneyama C, Okada M. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One*, 9(2):e88891. (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0088891. (査読有)

7. Kajiura K, Yamada T, Bamba T, Fukusaki E, Imamoto F, Okada M, Oneyama C.

c-Src-induced activation of ceramide metabolism impairs membrane microdomains and promotes malignant progression by facilitating the translocation of c-Src to focal adhesions. *Biochem J*. 458(1):81-93. (2014) DOI: 10.1042/BJ20130527. (査読有)

8. Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, Takahashi Y, Mori S, Oneyama C, Okada M. The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. *J Cell Sci*. 126(Pt 16):3575-84. (2013) DOI: 10.1242/jcs.121913. (査読有)

9. Tanaka H, Akagi K, Oneyama C, Tanaka M, Sasaki Y, Kanou T, Lee YH, Yokogawa D, Dobenecker MW, Nakagawa A, Okada M, Ikegami T. Identification of a new interaction mode between the Src homology 2 domain of C-terminal Src kinase (Csk) and Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains. *J Biol Chem*. 288(21):15240-54. (2013) DOI: 10.1074/jbc.M112.439075. (査読有)

10. *Oneyama C, Kito Y, Asai R, Ikeda J, Yoshida T, Okuzaki D, Kokuda R, Kakumoto K, Takayama K, Inoue S, Morii E, Okada M. MiR-424/503-mediated Rictor upregulation promotes tumor progression. *PLoS One*, 8(11):e80300 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0080300. (査読有)

*corresponding author

[学会発表](計35件)

(招待講演)

1. 小根山千歳、「MicroRNAs as the fine-tuners of Src oncogenic signaling」第7回日本 RNAi 研究会 / 第2回日本細胞外

- 小胞学会、広島、グランドプリンス広島、2015.8.26
2. 小根山千歳、「microRNA による Src がんシグナル制御とその破綻」第 67 回日本細胞生物学会大会、東京、タワーホール船堀、2015.6.30
3. 小根山千歳、「脂質ラフトによる Src の空間的制御とがん進展」日本がん分子標的治療学会第 19 回学術総会、松山、松山全日空ホテル、2015.6.10
4. 小根山千歳「Src がんシグナル制御の新機軸」岡山大学医学研究科特別セミナー、岡山、岡山大学、2015.3.10
5. 小根山千歳「Src によるがん形質発現メカニズムの再考」長浜バイオ大学特別セミナー、長浜、長浜バイオ大学、2015.2.24
6. 小根山千歳「がんシグナル研究の新機軸」愛知県がんセンター研究所招聘セミナー、名古屋、愛知県がんセンター研究所、2014.11.4
7. 小根山千歳「Src シグナルの制御破綻とがん形質発現」大阪大学医学系研究科消化器外科学セミナー、吹田、大阪大学、2014.7.8
8. 小根山千歳「Src がんモデルを用いた治療標的 microRNA の探求」がん分子標的治療学会第 9 回トランスレーショナルリサーチワークショップ、東京、都市センターホテル、2014.1.17
9. 小根山千歳「Src によるがん形質発現メカニズムの再考」奈良先端技術大学未来開拓コロキウム、奈良、奈良先端技術大学、2013.10.22
10. 小根山千歳「Src によるがん形質発現メカニズムの再考-マイクロ RNA を介したシグナル制御」広島大学大学院医歯薬総合研究科セミナー、広島、広島大学、2013.7.1

(通常発表)

11. 小根山千歳、「Src シグナルの制御破綻を標的としたがん治療シーズの探索」平成 27 年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、名古屋、吹上ホール、2016.2.3
12. 小根山千歳、吉川由利子、二宮悠一、「Fer キナーゼによる Src がんシグナルの増幅と伝搬」BMB2015、神戸、神戸ポートアイランド、2015.12.1
13. 桑原敦、小根山千歳、「c-Src がん化におけるエクソソームの制御」BMB2015、神戸、神戸ポートアイランド、2015.12.1
14. 二宮悠一、小根山千歳、「c-Src がん化初期に発現減少する microRNA のがん抑制作用」BMB2015、神戸、神戸ポートアイランド、2015.12.1
15. 小根山千歳、二宮悠一、穀田理恵、「microRNA を介した c-Src 発現亢進とがん形質」第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、名古屋国際会議場、2015.10.8
16. 桑原敦、小根山千歳、「c-Src によりがん化した細胞から分泌されるエクソソームの制御とその機能」第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、名古屋国際会議場、2015.10.8

17. 二宮悠一、小根山千歳、「c-Src がん形質発現初期における microRNA の発現減少とがん抑制における重要性」第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、名古屋国際会議場、2015.10.8
18. 桑原敦、小根山千歳、「c-Src によるエクソソームの制御とがん形質」第 7 回日本 RNAi 研究会 / 第 2 回日本細胞外小胞学会、広島、グランドプリンス広島、2015.8.26
19. 二宮悠一、小根山千歳、「c-Src がん化初期における microRNA の発現減少とがん抑制作用」第 7 回日本 RNAi 研究会 / 第 2 回日本細胞外小胞学会、広島、グランドプリンス広島、2015.8.26
20. 二宮悠一、岡田雅人、小根山千歳「c-Src がん化初期における microRNA の発現減少とその重要性」第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、パシフィコ横浜、2014.11.27
21. 小根山千歳、吉川由利子、二宮悠一、飯野琢也、月田早智子、岡田雅人、「Fer is a critical mediator of Src-mediated tumor progression」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2014.9.26
22. 浅井麗伊、岡田雅人、小根山千歳「miR-27b controls Src-induced tumor progression by targeting paxillin and ARFGEF1」第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2014.9.25
23. 二宮悠一、岡田雅人、小根山千歳「c-Src がん化初期における microRNA の発現減少とその重要性」第 6 回日本 RNAi 研究会、広島、グランドプリンス広島、2014.8.29
24. 小根山千歳「脂質ラフトを介した Src シグナルの制御とがん形質発現」第 66 回日本細胞生物学会年会、奈良、奈良県新公会堂、2014.6.12
25. 小根山千歳、岡田雅人「Src がんシグナルにおける Fer チロシキナーゼの役割」第 6 回シグナルネットワーク研究会、東京、慶應大学、2014.5.9
26. 浅井麗伊、岡田雅人、小根山千歳「miR-27b を介した Src によるがん悪性化の制御機構」第 6 回シグナルネットワーク研究会、東京、慶應大学、2014.5.9
27. 角元恭子、池田純一郎、森井英一、小根山千歳「LST8 の発現上昇は mTOR を介したがん形質発現を促進する」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、神戸ポートアイランド、2013.12.5
28. 穀田理恵、岡田雅人、小根山千歳「MicroRNA を介した Src 発現制御機構とがん形質発現」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、神戸ポートアイランド、2013.12.4
29. 小根山千歳、鬼頭頼子、池田純一郎、吉田卓也、奥崎大介、森井英一、岡田雅人「MicroRNA-mediated mTORC2 upregulation promotes tumor progression」第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2013.10.4
30. 穀田理恵、岡田雅人、小根山千歳

「MicroRNA-mediated c-Src upregulation promotes tumor progression」第72回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2013.10.4

31. 中山明子、岡田雅人、小根山千歳「トリプルネガティブ乳癌における治療標的としての Rictor」第72回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2013.10.4

32. 角元恭子、池田純一郎、森井英一、岡田雅人、小根山千歳「LST8 promotes mTORC2-mediated tumor progression」第72回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2013.10.3

33. 穀田理恵、岡田雅人、小根山千歳「マイクロRNAを介するSrc発現制御とがん形質発現」第5回日本RNAi研究会、広島、グランドプリンス広島、2013.8.30

34. 浅井麗伊、奥崎大介、池田純一郎、岡田雅人、森井英一、小根山千歳「ARFGEF1およびPaxillinを標的とするmiRNAによるSrcがん形質の制御機構」第5回日本RNAi研究会、広島、グランドプリンス広島、2013.8.30

35. Chitose Oneyama, Yoriko Kito, Rei Asai, Kyoko Kakumoto, Junichiro Ikeda, Eiichi Morii, Masato Okada「MicroRNA-mediated upregulation of mTORC2 promotes tumor progression」Epithelial Tubulology The First International Meeting, Sapporo, Hokkaido University, 2013.6.22

〔図書〕(計3件)

1. 小根山千歳：「がんシグナルとmicroRNA」生体の科学，67(1)，81-85，医学書院(2016)

2. 小根山千歳、岡田雅人：「脂質ラフトによるSrcの空間的制御とがん進展」実験医学増刊：知る・見る・活かす！シグナリング研究2015」Vol.33 No.10，82-87，2015年、羊土社、

3. 小根山千歳：「Srcがん形質におけるmicroRNA異常とmTORシグナル」次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学 革新的シーズ育成に向けて、p.248-253，2013年、南山堂

〔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
http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/06shuyo_uirusu/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小根山 千歳 (ONEYAMA CHITOSE)
愛知県がんセンター(研究所)・感染腫瘍学部・部長
研究者番号：90373208

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：