

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860040

研究課題名(和文) microRNAを起点とした食道扁平上皮癌転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) involvement of microRNA in migration of esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

土屋 創健(Tsuchiya, Soken)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・講師

研究者番号：80423002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：走化性と運動性を評価するトランズウェル遊走実験系において、ヒト食道扁平上皮癌組織で低発現のmicroRNAの一つがその細胞株の遊走を抑制した。このmicroRNAの標的候補遺伝子のうち、2種のノックダウンで遊走が減弱した。このmicroRNAおよびその2標的遺伝子が走化性と運動性のいずれに関与するのかを調べるため、運動性のみを評価するスクラッチ解析を行った。その結果、このmicroRNAの導入、および、一方の標的遺伝子のノックダウンのみにおいて運動能が有意に低下した。したがって、上記のmicroRNAは2遺伝子の発現抑制を介して、食道扁平上皮癌細胞の走化性と運動性を抑制することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Expression levels of some microRNAs were changed in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues. Among these microRNAs, two microRNA decreased ESCC cell number moved to lower membrane in migration assay (index of chemotaxis and/or motility) using transwell. Of two microRNAs, one microRNA had five target gene candidates in ESCC. knockdown of two genes but not other three genes reduced the moved cell number. These results showed that this microRNA inhibits migration of ESCC cells by inhibiting the expressions of the two target genes. Moreover, in scratch assay (index of motility) using the ESCC cell line, this microRNAs and knockdown of one target gene but not another target gene delayed recovery of scratched area. These data indicated that this microRNA downregulates both chemotaxis and motility of ESCC cells through decreased expressions of two target genes.

研究分野：生化学

キーワード：microRNA 食道扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

食道は咽頭と胃をつなぐ、ヒト成人において長さ約 25 cm、太さ約 2-3 mm、厚さ約 4 mm ほどの管状の臓器であり、胃へ食物を送る働きを担っている。食道癌は男性に多く、40 歳代後半から増加し始める傾向にあり、癌による死因では世界で 7 番目に多い。食道癌は腺上皮細胞に由来する腺癌と内面を覆っている内臓扁平上皮細胞に由来する扁平上皮癌に大別され、このうち国内においては扁平上皮癌が 9 割以上を占める。食道扁平上皮癌の初期症状は不定愁訴で、進行が早いいため、早期発見が困難であり、近年の医療技術の向上にも関わらず、高頻度に転移・再発を引き起こす。国内における 5 年生存率は約 4 割であり、極めて予後不良の悪性度の高い癌である。未だ有効な分子標的薬や診断マーカーは開発されておらず、食道扁平上皮癌患者の予後改善のためには新規医薬品の開発が必要であり、そのためには食道扁平上皮癌に対するより深い理解、情報が重要と考えられている。

内臓上皮から発生した食道扁平上皮癌細胞は増殖を重ねるとともに遺伝子変異を蓄積し、遊走能および浸潤能を獲得することで、粘膜下層、固有筋層、外膜、さらには食道の壁を貫いて食道周囲の臓器へと広がる(局所・他臓器浸潤)。さらに、食道周囲には血管やリンパ管が豊富に存在しており、血管やリンパ管内に浸潤して移動することにより、別の臓器・器官で新たな癌を形成する(転移)。転移は癌悪性化の最たるものであり、発生した場所でのみ増殖する、いわゆる良性腫瘍は 9 割以上が根治可能であることから、食道扁平上皮癌患者の治療戦略を考えていく上で、食道扁平上皮癌細胞が遊走能および浸潤能を獲得する機構を解明することは極めて重要である。しかしながら、食道扁平上皮癌における遊走能および浸潤能の獲得の分子メカニズムは未だ不明な点が多く、その全貌は明らかとなっていない。

microRNA はゲノム上にコードされた約 20-25 塩基長の短鎖の 1 本鎖 RNA であり、機能性 non-coding RNA の一種で、ヒトにおいては 2,603 種類が登録されている。microRNA は多段階のプロセスを経て生合成され、まず、核内において RNA polymerase により一つあるいは複数のステム-ヘアピンループ構造をもつ数百~数千塩基長の長鎖 RNA としてゲノムから転写される。次いで RNase III である Drosha を含む複合体により約 70 塩基長にプロセシングされ、キャリアタンパク質である Exportin-5 を介して核から細胞質へと輸送される。そこで、RNase III である Dicer によりループ部分の切断を受け、約 20-25 塩基の 2 本鎖 RNA になり、続いて 2 本鎖 RNA の一方の 1 本鎖 RNA が mature-microRNA としては Argonaute2 タンパク質などから構成される RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、機能分子複合体を形成するとともに、もう一方の 1 本鎖 RNA は分解される。

RISC に取り込まれた microRNA は配列相補性に基づいて messenger RNA (mRNA) の 3' 非翻訳領域に結合し、両者の相補性が 100% に近い際には標的 mRNA を分解し、部分的にある程度相補的な際には標的 mRNA の翻訳を阻害する。この際、microRNA の 5' 末端から 2-8 番目に存在する 7 塩基は標的 mRNA の認識において特に重要な役割を担う塩基であり、seed 配列と命名されている。

それぞれの microRNA が様々な遺伝子の発現を制御しており、細胞に発現している mRNA の種類や量比によって microRNA の標的となる mRNA が細胞によって変化することもあることから、microRNA を介した分子メカニズムを解明するためには解析対象の細胞における標的 mRNA を同定することが極めて重要である。microRNA は発生や生理機能など、様々な生命現象を制御しており、microRNA の発現異常は多くの遺伝子の発現変化をもたらす、癌などの様々な疾患に関わることが明らかとなっており、現在も精力的に microRNA に関する研究が進められている。

近年、食道扁平上皮癌の発癌や病態において microRNA が重要な役割を担うことが徐々に見いだされつつあるが、遊走能における走化性や運動性の獲得機構に関しては未だ十分には明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本申請課題では、研究代表者が同定したヒト食道扁平上皮食道癌における microRNA の有意な発現量変化が食道扁平上皮癌の転移、とりわけ遊走過程に及ぼす効果とその分子メカニズムを明らかにすることにより、食道扁平上皮食道癌における新たな治療標的・診断候補分子を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト食道扁平上皮癌細胞株、KYSE-170 は、5% fetal bovine serum (FBS)、100 U/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin (を含む RPMI1640 培地にて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

トランスウェル遊走実験

6 ウェルプレートに KYSE170 細胞をウェル当たり 6.0×10^5 細胞を播種した 12 時間後にトリプシン消化により細胞を回収し、無血清条件で播種してさらに 12 時間後に、再度、トリプシン消化により細胞を回収した。トランスウェルのメンブレン上層に無血清培地に懸濁した 1.1×10^5 細胞を播種し、下層には遊走因子として 5% FBS を含む培地を加えた。24 時間後にトランスウェルメンブレン上層側の細胞を綿棒で除去し、下層の細胞を Diff-Quik 染色した。染色したトランスウェルメンブレンを NEW M・X を用いて切片に封入し、観察・撮影して遊走細胞数を定量した。microRNA と siRNA の効果を検証する際は、6 ウェルプレートに KYSE170 細胞を播種すると

同時に、HiPerFect Transfection Reagent を用いて各 RNA を導入した。

スクラッチアッセイ

12ウェルプレートに KYSE170 細胞をウェル当たり 5.0×10^5 細胞を播種し、HiPerFect Transfection Reagent を用いて各 RNA (microRNA もしくは siRNA) を導入した。24 時間後にウェルがコンフルエント状態になったところで、単層シート状の KYSE170 細胞をイエローチップの先端で一直線に引っ掻いて傷を付けた。phosphate buffered saline で 2 回洗浄して剥がれた細胞を取り除き、新しい培地を加えた。直後に写真を撮影し、9 時間培養後に同一視野を再び撮影した。傷付け直後と 9 時間培養後の傷の面積を Image J を用いて定量し、傷が埋まった面積の割合を計算した。

統計処理

実験データの値は Mean \pm SEM で示し、少なくとも 3 回以上の実験を行い、再現性を検証した。2 群間有意差検定は F 検定の上で Student's *t*-test あるいは Welch's *t* test を用いて検定した。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞の遊走能 (運動性および走化性) の評価する実験系を構築するため、はじめに、食道扁平上皮癌細胞株、KYSE170 細胞のサイズより小さく、そのままでは KYSE170 細胞が通過できない孔サイズ 8 μ m のトランズウェルを用いた評価系の構築を行った。その結果、無血清と比較して、下層に 5%血清を添加した際に KYSE170 細胞は自身より小さな穴を通過して下層側に移動した。したがって、食道扁平上皮癌細胞の遊走能を評価できる系が構築できたと判断した。

本トランズウェル遊走実験系を用いて、発現量が低下した microRNA 4 種と、逆に亢進した 3 種をそれぞれ導入したヒト食道扁平上皮癌細胞株の解析を行った結果、control RNA を導入した際と比較して、2 種の microRNA を導入した際に KYSE170 細胞の下層側への移動が有意に抑制された。その他の microRNA においてはいずれも KYSE170 細胞の下層側への移動に影響を及ぼさなかった。

導入によって有意に下層への遊走細胞数を低下させた 2 種の microRNA のうち、より低下の度合いが大きかった、ヒト食道癌組織で発現量が低下していた microRNA に着目し、その遊走抑制メカニズムの解明を試みた。本 microRNA のヒト食道扁平上皮癌における標的候補遺伝子 5 つを見いだしたが、これらはいずれもその機能がほとんど不明であり、少なくとも遊走に関する知見は皆無であった。そこで、これらの遺伝子が食道扁平上皮癌細胞の遊走能に効果を及ぼすかどうか、siRNA を用いたノックダウン実験により検証を行った。その結果、5 種のうち 2 種においてノックダウンにより下層に移動した細胞数が有意に減弱したことから、これらの 2 種の標

的遺伝子が遊走に關与する可能性が示唆された。

遊走能は走化性と運動性の両者をあわせて評価したものであることから、本 microRNA による遊走能の抑制は走化性と運動性のいずれの抑制に基づくのかを明らかにするため、運動性のみを評価するスクラッチアッセイを用いて解析を行った。KYSE170 細胞に control RNA もしくは本 microRNA を導入し、24 時間後にコンフルエント状態の培養ディッシュを引っ掻いて単層シート状の KYSE170 細胞に模擬的な傷を作り、9 時間でどれだけその傷の面積が埋まるのかを定量・比較した。その結果、本 microRNA の導入により 9 時間後の傷の埋まりが有意に低下し、本 microRNA が KYSE170 細胞の運動性を低下させることが示唆された。しかしながら、トランズウェルを用いた遊走実験における本 microRNA の抑制の度合いと比較すると、スクラッチアッセイにおける抑制の程度は軽微であった。

次に、食道扁平上皮癌細胞の遊走能に寄与した 2 種の標的遺伝子が運動性に關与するかどうかを同様にスクラッチアッセイにより調べた。その結果、一方をノックダウンしても 9 時間後の傷の埋まりに差はなく、一方のノックダウンは運動性に影響を及ぼさなかったが、もう一方のノックダウンにより 9 時間後の傷の埋まりが有意に低下し、もう一方の標的遺伝子が KYSE170 細胞の運動性を促進することが示唆された。もう一方の標的遺伝子のノックダウンによるスクラッチアッセイの低下の度合いは、本 microRNA 導入のスクラッチアッセイによる低下の度合いとほぼ同等であったが、トランズウェルを用いた遊走実験におけるもう一方の標的遺伝子のノックダウンによる低下の度合いと比較すると軽微であった。

以上の結果より、スクラッチ解析における減弱の程度はトランズウェル遊走実験系と比べて極めて軽微であったことを考慮すると、上記の microRNA は食道扁平上皮癌細胞の走化性と運動性をともに抑制して遊走能を抑制していること、さらにその標的遺伝子 2 種の一方は走化性を、もう一方は走化性と運動性の両方を促進することで遊走能を促進することを世界で初めて明らかにした。

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 1 件)

Shimada Y., Okumura T., Takei Y., Watanabe K., Nagata T., Hori T., Tsuchiya S., Tsukada K. and Shimizu K. Role of fibroblast growth factor receptors in esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 13, 30-41, 2016.

〔図書〕(計1件)

土屋創健 運動による心保護作用への
microRNA の多大な貢献：ファルマシア
11号, 51, 1094, 公益社団法人 日本薬
学会, 2015.

〔その他〕

ホームページ情報

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 創健 (TSUCHIYA, SOKEN)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80423002