

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590728

研究課題名（和文） 食道扁平上皮癌における Mcl-1 制御機構解明とその臨床的意義

研究課題名（英文） Clinical significance and regulatory mechanisms of Mcl-1 in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者 磯本 一 (ISOMOTO HAJIME)

長崎大学・病院・准教授

研究者番号：90322304

研究成果の概要（和文）：microRNA (miR) が発癌や癌の悪性度に関与することが明らかになりつつあるが、食道扁平上皮癌 (SCC) 特異的な発現 miR を同定し、Mcl-1 発現制御との関与を明らかにすることを目的にした。ヒト SCC 株とヒト不死化正常 SC 由来細胞から抽出した RNA を用い、miRNA array により miRNA 発現の相違を網羅的に解析した。SCC 株各種、Het1A、食道腺癌細胞株、胃腺癌株などから RNA を抽出し、有意に（2倍以上）発現変化を示した miRNA を realtime PCR にて定量した。Het1A に比べ、OE21 と TE10 とで共通して有意に発現上昇していた miR は 205 であった。STAT3-Mcl-1 経路の負の制御因子 SOCS3 をターゲットとする miR が miR-205 である。Pre-miR-205 (precursor)、Anti-miR-205 (Inhibitor) を SCC 細胞導入し、増殖能 (cell count, MTT assay)、アポトーシス (TUNEL、DAPI staining)、浸潤能 (マトリゲルでの migration assay)、遊走能 (wound healing assay) を検討した。Anti-miR-205、Pre-miR-205 による機能解析では、増殖やアポトーシスに有意な影響は及ぼさなかったが、Pre-miR-205 によりマトリゲル浸潤細胞数が有意に ( $p < 0.01$ ) 減少した。wound healing assay の結果では、明らかな影響はみられなかった。一方、DNA メチル化と miR 発現の epigenetic 制御を SCC で解明するため、SCC 細胞にデオキシシチジン (5-aza)、トリコスタチン A (TSA) を作用させ、前後での発現変化を realtime PCR で調べた。その中で、miR-10a は食道腺癌細胞に比べ、SCC で有意に発現の低下がみられた上に、5-aza 添加で2倍、5-aza+TSA で約3倍発現が増加した。Pre-miR-29b 導入により Mcl-1 発現が低下した。

研究成果の概要（英文）：We sought to identify esophageal squamous cell carcinoma (SCC) specific microRNA (miR) to elucidate regulatory mechanisms of Mcl-1. RNA from SCC cell lines, immortalized non-malignant SC cell and various malignant cells was subjected to miR microarray. The candidate miRs were analyzed by quantitative RT-PCR. MiR-205 can be specifically upregulated in the SCC. As for its function, miR-205 was associated with migration capacity with Matrigel assay, but not with proliferation, apoptosis and wound healing, when assessed by cellular transfection of its precursor or inhibitor. On the other hand, miR-10a was substantially downregulated in the SCC, and could be restored by treatment with 5-azadeoxycytidine and/or trichostatin A.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Mcl-1, STAT3, microRNA, epigenetics

1. 研究開始当初の背景

JAK/STAT3 を介した自律的増殖亢進やアポトーシス機構からの回避が発癌や食道扁平上皮癌の進展に関与していると考えられている。Mcl-1 は抗アポトーシス Bcl-2 ファミリー蛋白で、JAK/STAT3 系により発現制御を受けている。プロモーター領域 DNA メチル化やマイクロ RNA (miR) によるエピジェネティック機構によって転写・翻訳制御されていることが明らかになってきた。JAK 活性化による STAT3 活性化を負に制御する因子として SOCS3 が挙げられるが、SOCS3 の減弱と JAK/STAT3/Mcl-1 の過剰なシグナル伝達が食道扁平上皮癌細胞の生存に重要な役割を果たしていると考えられる。Mcl-1 発現の転写及び転写後修飾の分子基盤を研究することが、食道扁平上皮癌の発癌機構解明や新たな治療法の開発に繋がると考えて立案に至った。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌細胞株を用いて、JAK/STAT/Mcl-1 の発現亢進のメカニズムを解明する。特に、miR による制御を受けている可能性があるため、食道正常上皮や他癌に比べ miR マイクロアレイで発現変動がみられた mir は、Northern blot や realtime PCR にて確認する。候補であると確認された miR の前駆体を細胞導入することで機能解析をする。食道扁平上皮癌細胞のアポトーシス・細胞増殖・浸潤遊走能に影響を齎すかを検討して行く。

### 3. 研究の方法

食道扁平上皮癌細胞株を用いて、Mcl-1 発現と JAK/STAT3 pathway 活性化を Western blot や STAT3 DNA 結合配列プローブを用いた Gel shift assay により証明する。JAK/STAT3 pathway 活性化の negative regulator, SOCS3 の発現が減弱・消失しているかを realtime PCR と Western blot を用いて調べる。miR によって翻訳抑制を受ける標的蛋白遺伝子は Target scan などのコンピュータソフトウェアを用いて予測する。正常食道扁平上皮細胞と食道扁平上皮癌細胞から small RNA を抽出し、マイクロアレイを用い発現のプロファイリングを行う。Mcl-1 特異的 miR として miR-29b、SOCS-3 特異的 miR としては miR-205 が挙げられるので、realtime PCR 法で定量的に解析する。斯様にして同定した Mcl-1 制御作用を有する mir の前駆体或いはアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞導入し、細胞増殖性試験 (MTT assay)、アポトーシス (アネキシン V によるフローサイトメトリ)、浸潤能 (マトリゲルでの migration assay)、遊走能 (wound healing assay) をなどの検討を行って細胞機能を明らかにする。食道扁平上皮癌患者の癌部及び非癌正常部から生検組織から RNA を抽出し同定される miR 発現を realtime PCR で比較定量する。一方、食道扁平上皮癌細胞株にデオキシシチジン (5-aza)、トリコスタチン A (TSA) を作用させ、前後での発現変化を realtime PCR で調べた。

### 4. 研究成果

食道扁平上皮癌では、STAT3 活性化—Mcl-1 の亢進、SOCS3 の減弱がみられる。ヒト不死化正常 SC 由来細胞に比べ、食道扁平上皮癌細胞株で共通して有意に発現上昇していた miR は、順に 203、429、205、200c、141 であり、発現低下していた miR は、順に 153、100、125b、10a、99a、376a、379、651、146b、29b であった。中でも SCC 特異的に発現変化がみられた miR は 205 であった。SOCS3 をターゲットとする miR の 1 つが miR-205 である。SCC 特異的な miR-205 に対する Pre-miR-205 (precursor)、Anti-miR-205 (Inhibitor) を SCC 細胞導入による機能解析では、増殖やアポトーシスに有意な影響は及ぼさなかったが、Pre-miR-205 によりマトリゲル浸潤細胞数が有意に減少した。miR-205 と共に、EMT に深く関与する miR として miR-200 ファミリーが同定されている。その中で、miR-141 或いは miR-200c の precursor を細胞導入すると、N-cadherin の発現が増加した。一方これらの Anti-miR は E-cadherin 発現を減弱する。wound healing assay の結果では、明らかな影響はみられなかった。一方、DNA メチル化と miR 発現の epigenetic 制御を SCC で解明するために、SCC 細胞 OE21 に 5-aza と TSA を作用させた。特に、miR-10a は食道腺癌細胞に比べ、SCC で有意に発現の低下がみられたために、この miR に着目し、5-aza 添加で 2 倍、5-aza+TSA で約 3 倍発現が増加した。以上から、SCC 特異的 miR として 205 が同定された。miR-10a 発現は epigenetic 制御として、DNA メチル化による影響を受けている可能性が示唆された。miR-205 は食道扁平上皮癌の浸潤能に関与し、SOCS3 減弱せしめて、食道扁平上皮癌細胞の生存=悪性度に繋がっていくものと考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. miRNA205 と miRNA 10a は食道扁平上皮癌に特異的マーカーと成りうるか?

第 67 回日本癌学会総会・平成 20 年 10 月 28 日・名古屋

2. miRNA205 と miRNA 10a は食道扁平上皮癌に特異的である

第 5 回日本消化管学会・平成 21 年 2 月 12 日・東京

3. miRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells Gastro2009・平成 21 年 11 月 27 日・London

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯本 一 (ISOMOTO HAJIME)

長崎大学・病院・准教授

研究者番号: 90322304

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: