

令和元年6月24日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19912

研究課題名(和文)食道癌における分子標的治療薬の開発を目指したlincRNAの網羅的機能解析

研究課題名(英文) MiR-141-3p is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and targets pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2, a negative regulator of the PI3K/AKT pathway

研究代表者

赤城 一郎 (Akagi, Ichiro)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：90552662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト正常食道扁平上皮細胞株、およびヒト食道扁平上皮癌由来細胞株におけるmiRNA発現を解析し、食道扁平上皮細胞の癌化に関わるmiRNAを探索した。miRNAアレイの結果より、食道扁平上皮癌細胞株のいずれにおいても発現量が上昇したmiRNAとして、miR-31, miR-141, miR-200b, miR-200cおよびmiR-205が見出された。食道扁平上皮癌細胞株におけるmiR-141の発現上昇とPHLPP2の発現低下が確かめられた。miR-141の過剰発現によってPHLPP2の発現はmRNAおよび蛋白質で抑制された。以上よりmiR-141の発がんとの関わりが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌とマイクロRNAの関連を調べたことで、今後の分子標的治療などへの可能性を広げることができた。

研究成果の概要(英文)：The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathway is frequently activated in various human cancers and plays essential roles in their development and progression.

The miRNA microarray analysis revealed that miR-31-5p, miR-141-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, and miR-205-5p were expressed at higher levels in the ESCC cell lines than the normal esophageal epithelial cell line. Bioinformatical analyses of mRNA microarray data identified several AKT/PI3K pathway-related genes as candidate targets of these miRNAs, which include tumor suppressors such as DNA-damage-inducible transcript 4 and pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2 (PHLPP2). To validate the targets of relevant miRNAs experimentally, synthetic mimics of the miRNAs were transfected into the esophageal epithelial cell line. Here, we report that miR-141-3p suppress the expression of PHLPP2, a negative regulators of the AKT/PI3K pathway, as a target in ESCC.

研究分野：分子生物学

キーワード：PI3K AKT マイクロRNA miR-141

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) の発現プロファイルは正常細胞の癌化に伴い変化することが知られている。本研究では、ヒト正常食道扁平上皮細胞株 Het-1A、および3種類のヒト食道扁平上皮癌由来細胞株 (TE-1, TE-5, および TE-8) における miRNA 発現をマイクロアレイを用いて解析し、食道扁平上皮細胞の癌化に関わる miRNA を探索した。また、食道癌の発生に深く関与する Akt pathway の関連遺伝子の中で、これらの miRNA の標的となりうる遺伝子を同様に探索し、その結果の検証を行った。

### 2. 研究の目的

マイクロ RNA を通じた食道がんの発がんメカニズムの検証および臨床的応用の可能性を探ること。

### 3. 研究の方法

#### 細胞

Het-1A は、BEBM (ロンザ) に BEGM kit (ロンザ) 中から GA-1000 以外の添加物を加えた培地を用いて 0.01 mg/ml fibronectin, 0.03 mg/ml bovine collagen type 1 および 0.01 mg/ml bovine serum albumin によりコートしたディッシュ上で培養した。TE-1, TE-5 および TE-8 は 10% の fetal bovine serum (FBS) を含む RPMI1640 を用いて培養した。

#### miRNA アレイおよび遺伝子発現アレイ

miRNA アレイは miRCURY LNA miRNA Array (Exiqon) を用いた。遺伝子発現アレイは Agilent Expression Array 解析 (タカラバイオ) を用いた。いずれも解析についてはタカラバイオの受託解析サービスを利用した。

#### RT-PCR

Total RNA はそれぞれの細胞から RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いて添付のプロトコルに従い抽出した。但し、臨床検体由来の total RNA は和光純薬より購入した。cDNA は PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ) を用いた逆転写により作製した。RT-PCR は KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて添付のプロトコルに従い行った。

#### ウェスタンブロット

PHLPP2 の検出には、一次抗体としてウサギ由来 anti-PHLPP2 抗体 (Abcam) を、二次抗体として Anti-rabbit IgG HRP-linked 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。内部標準として用いた alpha-Adaptin の検出には、一次抗体としてマウス由来 Anti-adaptin (Affinity Bioreagents) を、二次抗体として Anti-Mouse IgG (H+L) Rabbit, IgG whole, Peroxidase Conjugated (Wako) を用いた。

#### miRNA トランスフェクション

Het-1A に Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (ライフテクノロジーズ) を用いて、mirVana miRNA mimics (ライフテクノロジーズ) を導入した。

### 4. 研究成果

1. miRNA アレイの結果より、正常食道扁平上皮細胞と比較して3種の食道扁平上皮癌細胞株のいずれにおいても発現量が2倍以上に上昇した miRNA として、*miR-31*、*miR-141*、*miR-200b*、*miR-200c* および *miR-205* が見出された。また、遺伝子発現アレイの結果から食道扁平上皮癌細胞株における発現量の低下が認められ、かつ Akt pathway に含まれる遺伝子のうち、PHLPP2 にはその 3' UTR 上に *miR-141* の予測結合部位が存在した。

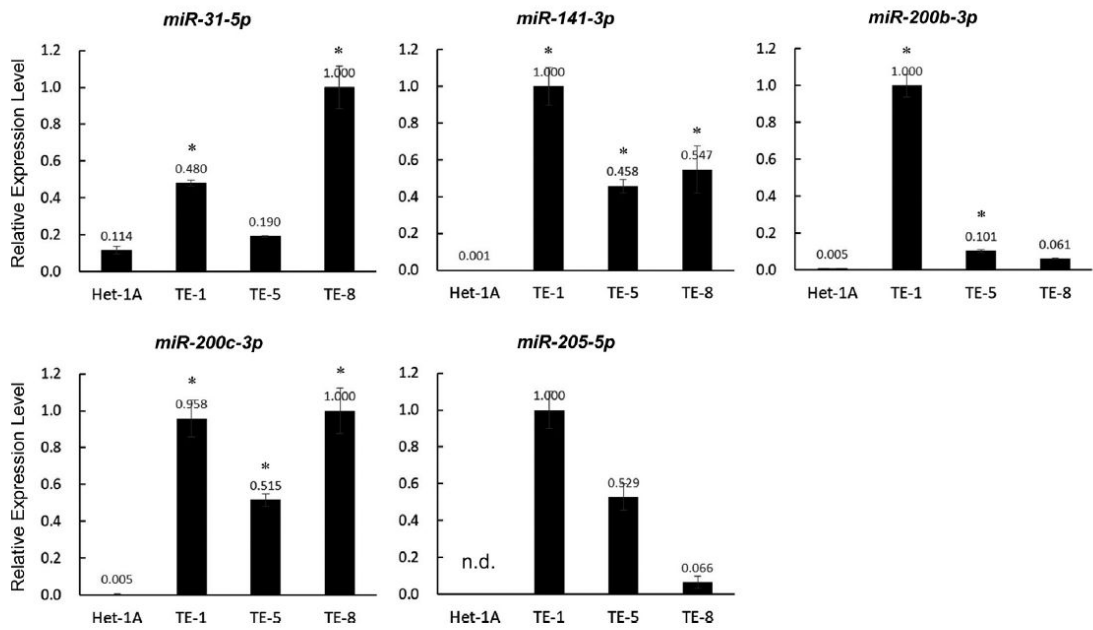
#### Abbreviations

ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
miRNA	microRNA
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
PHLPP2	pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2
PI3K	The phosphatidylinositol-3-kinase

Table 1  
MiRNAs upregulated in the ESCC-derived cell lines.

miRNA <sup>a</sup>	Fold change (Log <sub>2</sub> ratio)		
	TE-1/Het-1A	TE-5/Het-1A	TE-8/Het-1A
<i>hsa-miR-205-5p</i>	3.75	4.19	2.12
<i>hsa-miR-200c-3p</i>	2.68	2.81	2.62
<i>hsa-miR-141-3p</i>	2.57	2.62	2.55
<i>hsa-miR-200b-3p</i>	2.98	2.51	2.19
<i>hsa-miR-31-5p</i>	1.01	1.10	2.55

<sup>a</sup> The order of miRNAs is based on the averaged fold changes of the three comparisons.



**Fig. 1. Validation of the upregulation of miRNAs in tumorous esophageal squamous epithelium-derived cell lines by qRT-PCR.**

The expression levels of five miRNAs identified in microarray analyses as being expressed at higher levels in ESCC cell lines than Het-1A cells, a normal esophageal squamous epithelium cell line, were analyzed by qRT-PCR. Data were normalized to the expression level of 18S rRNA. For each miRNA, the average expression level in the cell line displaying the highest level of expression was set at 1. Data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate measurements. \* $p < 0.05$  versus Het-1A. n. d., not detected.

**Table 2**

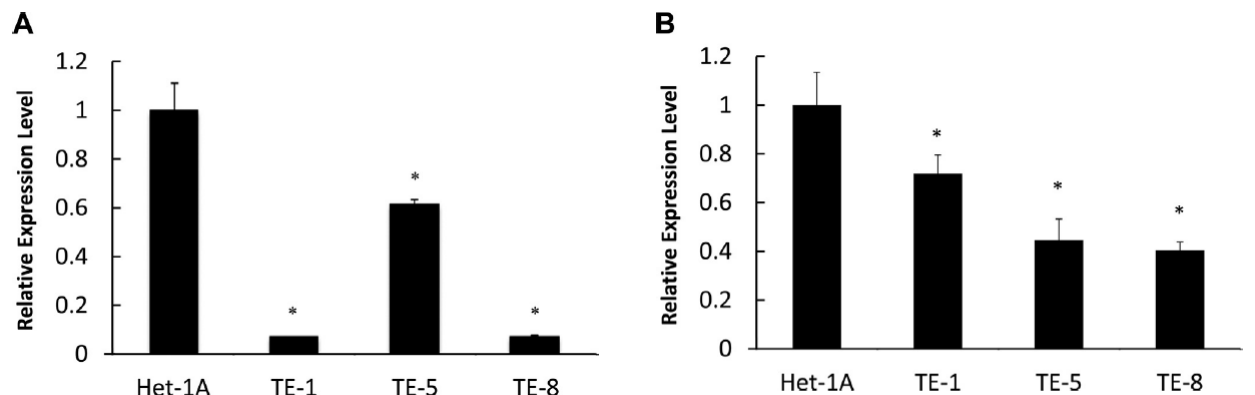
PI3K/Akt pathway-related mRNAs downregulated in the ESCC-derived cell lines.

Gene Symbol <sup>a</sup>	Fold change (Log <sub>2</sub> ratio)			Putative target sites of miRNA in the 3'-UTR <sup>b</sup>			
	TE-1/Het-1A	TE-5/Het-1A	TE-8/Het-1A	31-5p	141-3p	200 b/c-3p	205-5p
<b>TLR4</b>	-9.17	-5.73	-9.17	MT		T	T
<b>SPP1</b>	-4.52	-4.43	-3.27				
<b>CD19</b>	-4.32	-3.3	-3.96				
<b>COL2A1</b>	-4.15	-3.26	-4.13				
<b>KIT</b>	-4.2	-4.32	-3.03		M		T
<b>DDIT4</b>	-4.3	-3.49	-3.39			MT	T
<b>THBS4</b>	-5.14	-3.67	-2.89				
<b>FGF6</b>	-3.54	-2.88	-5.45				
<b>RPS6KA6</b>	-3.57	-3.68	-3.46		T		MT
<b>MYB</b>	-3.13	-7.51	-2.62			MT	
<b>ITGA10</b>	-3	-3.11	-4.44			MT	
<b>TLR2</b>	-9	-1.71	-7.14				
<b>CSF3</b>	-3.11	-3.25	-3.08		MT		
<b>KDR</b>	-3.28	-3.37	-2.8	T	MT	MT	T
<b>COL4A4</b>	-3.81	-4.53	-1.34	T		T	
<b>FGF13</b>	-5.11	-1	-4.93		MT		
<b>ULK2</b>	-4.22	-2.58	-1.5		MT	MT	
<b>IGF1</b>	-1.73	-1.81	-4.02				M
<b>RPS6KA2</b>	-1.57	-2.67	-2.47			MT	MT
<b>COL3A1</b>	-2.59	-2.74	-1.47			M	
<b>ANGPT1</b>	-1.1	-2.67	-3			M	
<b>ITGA7</b>	-2.54	-2.2	-1.42				
<b>TNXB</b>	-2.33	-1.69	-1.47				
<b>PIK3R1</b>	-4.01	-1.44	-1.08				
<b>IRS1</b>	-1.25	-1.99	-1.44	T	MT	MT	
<b>PPP2R3B</b>	-2.85	-1.04	-1.06				
<b>PHLPP2</b>	-1.12	-1.43	-1.05		MT	M	T

Gene symbols shown in bold represent genes predicted as targets of one or more miRNA(s).

<sup>a</sup> The order of genes is based on the averaged fold changes of the three comparisons.

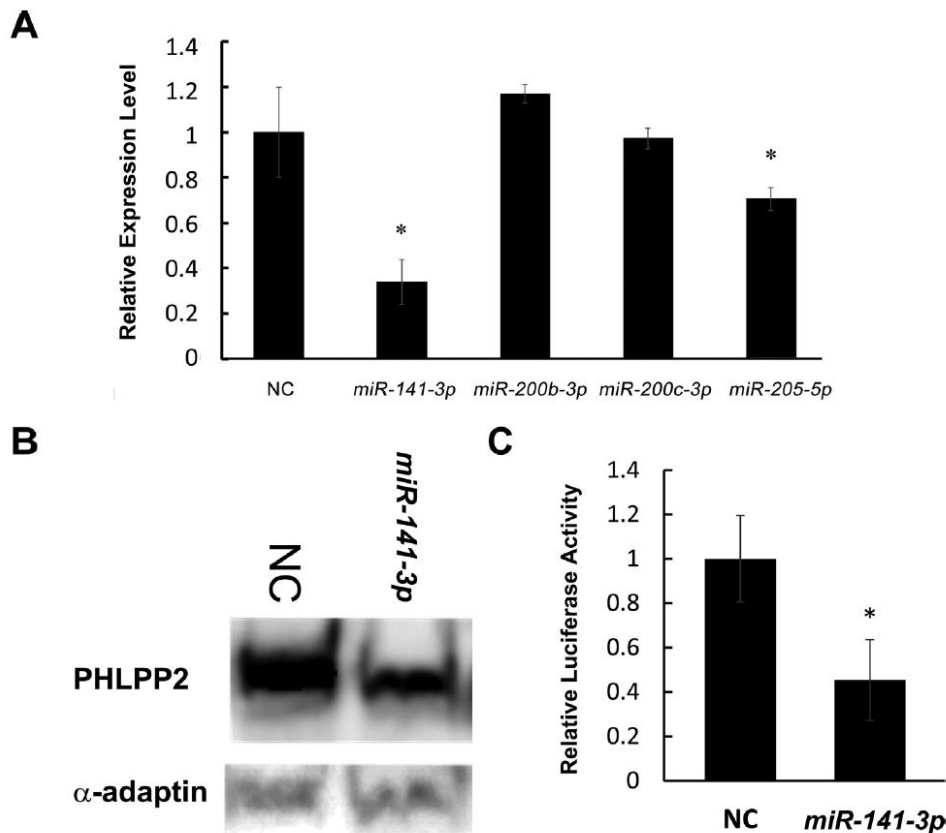
<sup>b</sup> M and T represent the presence of miRNA target site(s) predicted by MiRanda and TargetScan, respectively.



**Fig. 2. DDIT4 and PHLPP2 mRNA expression in normal and tumorous esophageal squamous epithelium-derived cell lines.**

DDIT4 (A) and PHLPP2 (B) mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Data were normalized to the expression level of GAPDH. The average normalized miR-141-3p expression level in Het-1A cells was set at 1. Data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate measurements. \* $p < 0.05$  versus Het-1A.

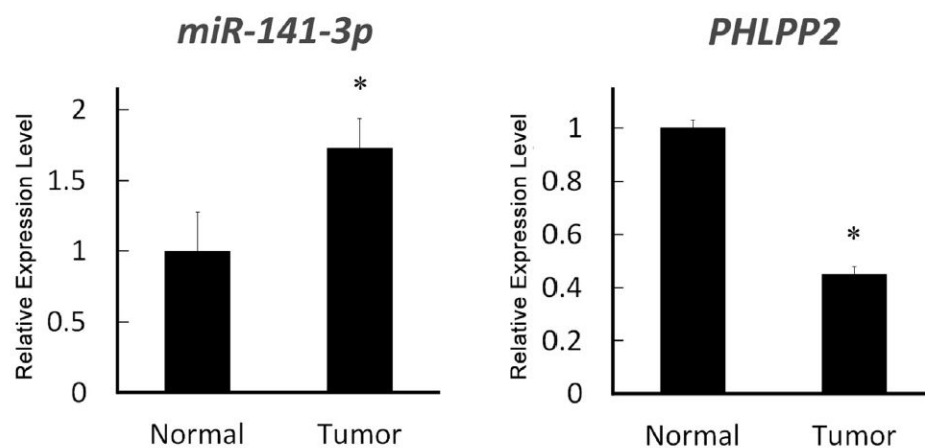
- 食道扁平上皮癌細胞株における *miR-141* の発現上昇と *PHLPP2* の発現低下が、定量的 RT-PCR および Western blot によって確かめられた。
- miR-141* の過剰発現によって *PHLPP2* の発現は mRNA および蛋白質レベルで抑制された。



**Fig. 3. Silencing of the *PHLPP2* gene by *miR-141-3p*.**

(A) Expression levels of the *PHLPP2* mRNA in Het-1A cells transfected with the indicated synthetic miRNA mimics or a negative control reagent (NC). *PHLPP2* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR, and the data were normalized to the expression level of *GAPDH*. The average normalized *PHLPP2* expression level in NC-transfected cells was set at 1. (B) Western blot analyses of *PHLPP2* protein expression in Het-1A cells transfected with or without (none) a synthetic *miR-141-3p* mimic or a negative control reagent (NC). The expression level of  $\alpha$ -adapitin was measured as an internal control. (C) A luciferase reporter assay examining targeting of the *PHLPP2* 3'-UTR by *miR-141-3p*. The activity of a firefly luciferase gene under the control of the *PHLPP2* 3'-UTR was normalized to that of constitutively controlled Renilla luciferase. Data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate measurements. \* $p < 0.05$  versus control.

- ヒト食道扁平上皮癌手術摘出組織においても *miR-141* の発現上昇と *PHLPP2* mRNA の発現低下が確認された。



**Fig. 4. Expression of *miR-141-3p* and *PHLPP2* mRNA in clinical ESCC specimens.**

The expression levels of *miR-141-3p* (A) and *PHLPP2* mRNA (B) in ESCC and normal esophageal epithelial tissues were analyzed by qRT-PCR. Data were normalized to the expression level of *18S rRNA* and *GAPDH* for *miR-141-3p* and *PHLPP2* mRNA, respectively. The average normalized levels of *miR-141-3p* and *PHLPP2* mRNA expression in the normal esophageal epithelial tissue was set at 1. Data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate measurements. \* $p < 0.05$  versus the normal esophageal epithelial tissue.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

MiR-141-3p is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and targets pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2, a negative regulator of the PI3K/AKT pathway.

Ishibashi O, Akagi I, Ogawa Y, Inui T.

Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jun 22;501(2):507-513.

RNA-Seq analysis of human cell lines established from normal and neoplastic esophageal squamous epithelium.

Akagi I, Ishibashi O.

Genom Data. 2017 Feb 5;12:4-6.

〔学会発表〕(計 1 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。