

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590382

研究課題名（和文） 消化管上皮細胞の増殖・分化に関わる生理活性物質の局所での転写・翻訳調節機構の解明

研究課題名（英文） Transcriptional and translational regulation of peptide factors for the growth and differentiation of gastrointestinal epithelial cells

研究代表者

伊藤 浩史 (ITOHI HIROSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80253847

研究成果の概要（和文）：扁平上皮癌で発現しているマイクロ RNA(miRNA)全般についてマイクロアレイを用いて解析し、扁平上皮で特異的に発現している miR-205 や扁平上皮癌で発現亢進している miR-21 を含む複数個の miRNA を同定した。また、培養扁平上皮癌細胞株を用いて、肝細胞増殖因子刺激前後での miRNA の発現変化について比較検討を行い、miR-27b、miR-200c を含む複数の miRNA が HGF の下流の機能分子の発現に影響を与えていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： MicroRNA (miRNA) expression pattern and target mRNAs of squamous cell carcinoma (SCC) are different from those of other organ's malignancies. MiR-205 might be a specific marker miRNA of both normal and malignant squamous epithelia, while miR-21 might be a putative oncogenic miRNA in SCC. In addition, several miRNAs including miR-200c and miR-27b are down-regulated by HGF stimulation. These miRNAs might play an important role for the translation of HGF downstream functional molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：分子・消化管粘膜上皮

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年分子生物学の目覚ましい進歩により、消化管癌細胞の増殖や、消化管粘膜再生時における上皮細胞の増殖・分化に、様々な生理活性物質が関与しており、遺伝子変異や転写調節などにより、その発現が部位特異的に、また時々刻々と変化していることが明らかになってきた。このような生理活性物質のひとつである肝細胞増殖因子 Hepatocyte Growth Factor (HGF)は、劇症肝炎の患者血清から精製された培養肝細胞の増殖因子で

あるが、現在では肝細胞のみならず、消化管上皮の増殖・分化にきわめて重要な役割を持つことが示されている。HGF は間葉系細胞より非活性型前駆体として分泌され、HGF 活性化蛋白である HGF Activator (HGFA) による活性化を受けて初めて生理活性をもつ。従って HGF そのものの発現調節のみならず、その活性化に関わるプロテアーゼ (HGFA) とそのインヒビターである HGFA inhibitor type-1 (HAI-1) and type-2 (HAI-2) の局所での発現バランスが、実際の HGF の生理活性を決定し

ており、消化管粘膜局所での効果的な HGF の活性化機構こそが HGF 活性化調節においてきわめて重要であることが我々の研究から明らかになってきた。

(2) 我々はこれまでに消化管の傷害粘膜の再生修復や消化器癌における HGFA 及びその活性化調節因子 HAI-1、HAI-2 の役割について、HGFA や HAI-1 ノックアウトマウスの作製などを含め多数の論文を発表し、国内外における研究をリードしてきた (Itoh H, Naganuma S, et al. *Gastroenterology*, 2004; Tanaka H, Itoh H, et al. *Mol Cell Biol*, 2005)。さらに、これら一連の研究の過程で HAI-2 遺伝子の 11kb 下流にアミノ酸 106 個からなるペプチドをコードする新規遺伝子 HAI-2 Related Small Peptide (H2RSP) を発見、*in vitro* の解析から核移行ペプチドであることを示した (Itoh H, et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001)。H2RSP は RNA 結合ペプチドとして消化管上皮細胞の増殖・分化シグナル伝達機構の一部を担っており、正常消化管粘膜において、増殖の盛んな Crypt の上皮細胞では主に細胞質に、増殖が止まり分化した表層上皮細胞では核に局在し、傷害粘膜や癌の浸潤先端など増殖が盛んな部位では核に移行せず、細胞質に留まったまま高発現していた (Naganuma S, Itoh H, et al. *Virchows Arch.*, 2006; Uchiyama S, Itoh H, et al. *Gut*, 2007)。さらに *in vitro* の解析から H2RSP は核に移行することによって、上皮細胞の増殖を抑制し、分化を終了させていることが示唆されており、H2RSP は消化管上皮細胞の増殖を止め分化させるシグナル伝達を担っていることが推測された。

2. 研究の目的

(1) 本研究は消化管上皮細胞の増殖・分化に関わる生理活性物質、特に HGF 活性化関連分子及び新規核移行ペプチド H2RSP の機能を解析し、消化管上皮細胞の増殖・分化における、その病態生理学的意義の解明を行なうことを目的とし、従来から研究を行っている単層円柱上皮 (腺癌) 系のみならず、重層扁平上皮 (扁平上皮癌) 系での機能解析を目指した。

(2) 特に H2RSP を含む RNA 結合蛋白 (Msi-1 など) や、miRNA による HGF 及び HGF 関連蛋白の発現調節 (転写調節、転写後翻訳調節) に焦点を当て、HGF 活性化関連蛋白による HGF の消化管粘膜局所での巧妙な活性化機構と、それに引き続いて出現する消化管粘膜組織の形態学的変化についての詳細な検討を目的とした。

(3) そして、正常な消化管上皮の増殖・分化

のみならず、消化器の癌や炎症性疾患における、これら H2RSP などの RNA 結合蛋白、miRNA による、HGF、HGF 関連蛋白の転写翻訳調節機構についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌等の単相円柱上皮由来の癌 (腺癌) と共に、頭頸部や食道扁平上皮癌での HGF を含む HGF 関連分子の発現を、分子生物学的および免疫組織学的に検討し、また HGF 刺激前後での培養癌細胞の形態変化や増殖能の変化を観察した。

(2) 頭頸部、食道扁平上皮癌および対照となる正常扁平上皮で、マイクロアレイ法を用いて miRNA 発現プロファイリングを行い、その比較検討を行った。消化管の分野では miR-145 と let-7a が大腸癌で発現が低下することが報告されているが、その標的遺伝子は未だ不明であり、消化管上皮細胞の増殖・分化における miRNA の役割はまったく分かっていない。扁平上皮癌での miRNA の発現プロファイリングは当時まだ報告が限られていた。

(3) 病理組織診断が終了したホルマリン固定パラフィンブロックから、扁平上皮癌 (頭頸部癌、食道癌、子宮頸癌、肺癌等) と腺癌やその他の癌を数十例ピックアップしてフオイルスライドを作製、レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて、癌細胞、正常上皮細胞、各々の間質細胞等に標本を切り分けて細胞を分取して miRNA を抽出、リアルタイム RT-PCR を行い、上記 (2) で発現が変化した miRNA の定量を行って検証を行った。

(4) 頭頸部扁平上皮癌細胞株を用い、肝細胞増殖因子 HGF の刺激前後での miRNA 発現変化をマイクロアレイ法を用いて検討した。発現が変化した miRNA については、標的遺伝子の発現変化についても mRNA レベル、タンパクレベルでその発現変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 扁平上皮癌においても、腺癌と同様に、HGFA によって活性化された周囲の間質から分泌される HGF が、上皮細胞に発現する c-met を介してその増殖・分化等の機能発現に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(2) 頭頸部扁平上皮癌で発現している miRNA 全般について、マイクロアレイを用いて解析し、扁平上皮で特異的に発現している miRNA や扁平上皮癌でのみ発現が変動している miRNA を複数同定した。これらの miRNA について、通常の病理組織診断で用いているパラフィンブロックからマイクロダイセクショ

ン法によって選択的に切除した扁平上皮癌細胞と周囲の正常扁平上皮細胞での発現を調べたところ、マイクロアレイの結果とほぼ一致した。特に、全ての扁平上皮癌細胞株および正常重層扁平上皮で miR-205 が最も高発現しており、大腸癌細胞株や血液がん細胞株など非扁平上皮細胞株では検出できる量の発現は見られなかった。臨床材料を用いて、癌部分と対照非癌部分をレーザーマイクロダイセクション法で miRNA を分取して発現量を解析すると、検索したすべての臓器の扁平上皮癌、対象正常扁平上皮で miR-205 の高発現が見られた他、他臓器の癌と同様に miR-21 は正常扁平上皮に比べ有意に扁平上皮癌で高発現しており、let-7a、mir-16 も他の臓器ではがん抑制性 miRNA とされているが、扁平上皮癌では発現に変化がないか、逆に高発現する傾向にあった (図 1)。miR-205、miR-21、let-7a、miR-16、miR-30a-5p の発現を、コントロールとしてすべての細胞で同程度発現しているとされる 5S ribosomal RNA 発現量との比で各々の miRNA の発現量を標準化した後、扁平上皮癌細胞 (T) と周囲の正常重層扁平上皮細胞 (N) の当該 miRNA 発現量の比 (T/N ratio) を求めて統計学的に検討したところ、miR-205 は正常、癌を問わず、扁平上皮で著明に高発現していたが ($p>0.05$)、癌と正常重層扁平上皮の間で統計学的に有意な発現の差は見られなかった。一方 miR-21 は正常扁平上皮に比べ有意に扁平上皮癌で高発現していた ($p>0.001$)。let-7a、mir-16 も他の臓器ではがん抑制性 miRNA とされているが、扁平上皮癌では発現に変化がないか、有意さは認めないものの逆に高発現する傾向にあった。以上の結果より、miR-205 および miR-21 が口腔癌、食道癌を含む扁平上皮癌の有力な病理診断マーカーとなりえることが示唆された。凍結組織と異なり、ホルマリン固定パラフィンブロックは、病理組織診断で日常的に用いられていることから、通常の病理診断に加えて、miR-205 と miR-21 を定量することにより、原発不明癌や組織型不明癌に対する扁平上皮癌の診断マーカーになりうることを示し論文としてまとめ報告した。

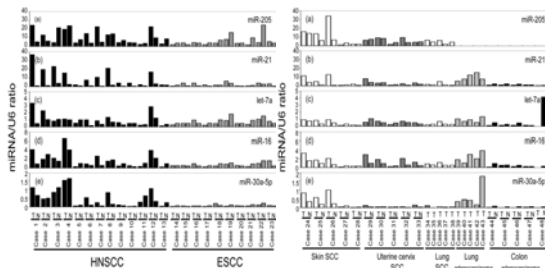


図 1 : 種々の癌組織での miRNA 発現

(3) 扁平上皮癌の有力な増殖因子であり、予

後因子である肝細胞増殖因子 (HGF) に着目し、培養頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、HGF 刺激前後でのマイクロ RNA の発現変化を検討し、HGF の機能発現に関わるマイクロ RNA の同定を試みた。その結果、頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC3 を HGF で刺激すると、短時間のうちにいくつかのマイクロ RNA の発現が変化することがマイクロ RNA マイクロアレイを用いた実験から明らかになった。これらのマイクロ RNA のうち Epithelial mesenchymal transition (EMT) 等ががんの浸潤転移に関わる機能遺伝子の発現を調節しているマイクロ RNA (miR-200c および miR-27b) に注目し、まずこの 2 つのマイクロ RNA の HGF 刺激前後の発現を詳細に検討した (図 2A)。ともに HGF 刺激後短時間のうちにその発現が著明に低下し、miR-200c の標的遺伝子である EMT に関わる ZEB1 遺伝子の発現増加とその下流の E-cadherin の発現低下、miR-27b の標的遺伝子である癌の浸潤や HGF の活性化に関わる ST14/matrilysin の発現増加がみられた (図 2B)。さらにウエスタンブロット法によるタンパクレベルでもこれら遺伝子産物の発現変化を確認し、HGF 刺激と同時にこれらマイクロ RNA をトランスフェクションすると、標的遺伝子の発現変化が消失することも確認した。



図 2 : 頭頸部扁平上皮癌細胞株における HGF 刺激によるマイクロ RNA およびその標的遺伝子発現の変化

(4) これらの実験結果から、頭頸部扁平上皮癌では、HGF 刺激によって直接、間接的にさまざまな遺伝子発現が変化するが、その一部はマイクロ RNA の発現を調節することによって行われていることが明らかになった。した

がってこれらのマイクロ RNA を投与することで、HGF 下流遺伝子の機能が阻害され、頭頸部扁平上皮癌の進展を阻害できる可能性が示唆された。現在、さらに miRNA マイクロアレイ解析から、同じように発現が変化したマイクロ RNA の機能解析を進めており、今後、予後・治療マーカーおよび治療薬としてのマイクロ RNA の可能性も追及していく予定である。

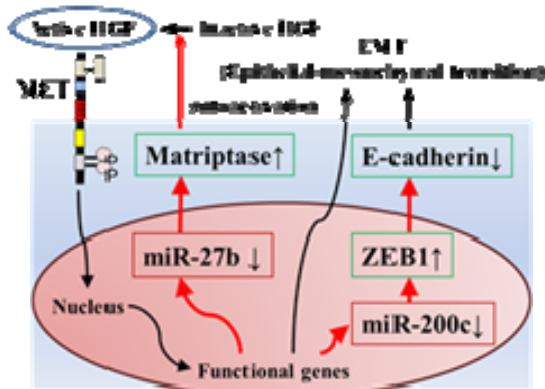


図 3 : 頭頸部扁平上皮癌における HGF 刺激によるマイクロ RNA 調節と機能発現のシエマ

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 Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H, Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck (HNSCC) and the esophagus (ESCC): miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC, *Oncol. Rep.*, 査読有、23: 1625-1633, 2010 年
- ② Komaki W, Fukushima T, Tanaka H, Itoh H, Chosa E, Kataoka H, Expression of hepatocyte growth factor activator type 1 on the epithelial cell surface is regulated by hypoxic and oxidative stresses, *Virchows Arch.*, 査読有、453: 347-357, 2008 年

[学会発表] (計 14 件)

- ① Naganuma S, Ohashi S, Kimura S, Natsuzaki M, Nakagawa H, Itoh H, ZEB1 and ZEB2 promote tumor invasion and EMT in esophageal squamous cell carcinoma, 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 10 日、神戸
- ② Susuki D, Kimura S, Naganuma S, Tsuchiyama K, Kitamura N, Fujieda S, Itoh H, Regulation of microRNA

expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous carcinoma cells, 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸

- ③ Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H, Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck (HNSCC) and the esophagus (ESCC) and their regulation by hepatocyte growth factor, 101st Annual meeting, American Association for Cancer Research (AACR), 2010 年 4 月 4 日、ワシントン DC
- ④ Naganuma S, Ohashi S, Kimura S, Natsuzaki M, Klein-Szanto AJ, Itoh H, Nakagawa H, ZEB1 and ZEB2 promote EMT and invasion in esophageal squamous cell carcinoma, 101st Annual meeting, American Association for Cancer Research (AACR), 2010 年 4 月 4 日、ワシントン DC
- ⑤ 鈴木弟, 長沼誠二, 木村相泰, 喜多村直実, 藤枝重治, 伊藤浩史, 頭頸部扁平上皮癌における肝細胞増殖因子 HGF による microRNA 発現調節, 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ⑥ 長沼誠二, 鈴木弟, 木村相泰, 喜多村直実, 伊藤浩史, 食道扁平上皮癌組織における miR-200 ファミリーの発現と EMT (epithelial to mesenchymal transition) との関連, 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ⑦ 木村相泰, 長沼誠二, 鈴木弟, 佐野和生, 伊藤浩史, miR-205 の高発現は扁平上皮のマーカーとなりうる: レーザーマイクロダイセクションによるホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出した miRNA の応用, 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ⑧ 木村相泰, 長沼誠二, 鈴木弟, 佐野和生, 伊藤浩史, 頭頸部扁平上皮癌及び食道癌におけるマイクロ RNA の発現: その病理組織学的応用について, 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、横浜
- ⑨ 木村相泰, 長沼誠二, 法木左近, 伊藤浩史, ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出された microRNA の病理診断への応用可能性, 第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 2 日、京都
- ⑩ 鈴木弟, 長沼誠二, 木村相泰, 喜多村直実, 藤枝重治, 伊藤浩史, 重層扁平上皮における肝細胞増殖因子 HGF 刺激による microRNA 発現変化, 第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 11 日、神戸
- ⑪ 長沼誠二, 鈴木弟, 木村相泰, 喜多村直実, 伊藤浩史, HGF 刺激による大腸癌細胞株の形態変化に関する miRNA の発現

- 変動、第31回日本分子生物学会年会、
2008年12月11日、神戸
- ⑫ 木村相泰、長沼誠二、鈴木弟、佐野和生、伊藤浩史、舌・食道扁平上皮癌におけるマイクロRNA (miRNA) 発現プロファイル、第31回日本分子生物学会年会、2008年12月11日、神戸
- ⑬ 木村相泰、長沼誠二、鈴木弟、佐野和生、伊藤浩史、ヒト舌・食道扁平上皮癌におけるマイクロRNA 発現プロファイル、第67回日本癌学会総会、2008年10月2日、名古屋
- ⑭ 鈴木弟、長沼誠二、木村相泰、喜多村直実、藤枝重治、伊藤浩史、頭頸部扁平上皮癌細胞株におけるHGFによるマイクロRNA発現調節、第67回日本癌学会総会、2008年10月2日、名古屋

〔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

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/byouril/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 浩史 (ITOHI HIROSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80253847

(2) 研究分担者

長沼 誠二 (NAGANUMA SEIJI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：50452123

(3) 連携研究者

片岡 寛章 (KATAOKA HIROAKI)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10214321

喜多村 直実 (KITAMURA NAOMI)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：80107424