

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592187

研究課題名（和文）機能性核酸ネットワーク解明に基づく頭頸部扁平上皮癌発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of differentially expressed microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma based on microRNA expression signature

研究代表者

関 直彦（SEKI NAHIKO）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

研究成果の概要（和文）：microRNA（miRNA）は19～21塩基の1本鎖RNAであり、タンパクコード遺伝子の発現を制御している。近年、miRNAが癌の発生・進展・転移に関与している事が報告されている。頭頸部扁平上皮癌のmiRNAの発現プロファイルから、miR-1、miR-133aおよびmiR-375の発現が癌細胞で顕著に抑制されている事を見出した。そこで、miR-1、miR-133a、miR-375の各miRNAを扁平上皮癌由来の細胞株に核酸導入し、機能解析を行った。その結果、3種のmiRNAは、癌の増殖・遊走・浸潤を有意に抑制し、アポトーシスの誘導を起こすことを発見した。この事から、miR-1、miR-133aおよびmiR-375は頭頸部扁平上皮癌において癌抑制機能を有する事が判明した。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are endogenous short non-coding RNA molecules that regulate gene expression by repressing translation or cleaving RNA transcripts in a sequence-specific manner. A growing body of evidence suggests that miRNAs are aberrantly expressed in many human cancers and that they play significant roles in the initiation, development and metastasis of human cancers. Recently, our expression profile revealed that microRNA-1, microRNA-133a and microRNA-375 are frequently downregulated in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Ectopic expression of three miRNAs (microRNA-1, microRNA-133a and microRNA-375) inhibited cell growth, migration and invasion of HNSCC cells, suggesting these microRNAs function as tumor suppressors in HNSCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成23年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉学

キーワード：癌・マイクロRNA・機能性核酸・癌抑制遺伝子・頭頸部扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2004年にヒトゲノム解読プロジェクト

トが完了し、その結果としてヒトゲノム中には数多くのタンパク質をコードしない機能性 RNA (non-coding RNA : ncRNA) の存在が明らかになった。ヒトの転写産物のうち、実に 98%がこのノンコーディング領域であり、タンパクがコードされているのはわずか 2%程度である事が判明した。さらに、これまで役割をもたない、いわゆるジャンクとみなされていた ncRNA には遺伝子発現制御など重要な役割が存在する事が明らかになってきた。ncRNA の一つである microRNA (miRNA) は 19~21 塩基の 1 本鎖 RNA であり、タンパクコード遺伝子の発現を制御している事から、癌の発生や進展、転移に関与している事が示唆されている。

(2) miRNA の大きな特徴として、一つの miRNA が複数のタンパクコード遺伝子発現を制御していることであり、これと同時に一つのタンパクコード遺伝子は複数の miRNA によって制御されていることから、細胞内ではタンパクコード遺伝子と miRNA を含む ncRNA との極めて複雑な分子ネットワークが形成されていることが示唆されている。それゆえに正常細胞の中では、タンパクコード遺伝子と miRNA の複雑な分子ネットワークによって、正常な遺伝子発現を精巧に保っており、このバランスが崩壊することが癌を含むヒトの疾患の発生・進展に深く関与していることが推測される。

(3) 癌においては、miRNA の発現異常が様々な癌で報告されており、癌の発生、進展、転移において様々な miRNA が関与している事は周知の事実である。近年では、癌細胞で発現変化を認めた miRNA を研究の対照として、癌部で発現抑制されている癌抑制型 miRNA、癌部で発現が亢進している癌遺伝子型 miRNA の探索と機能解析が精力的に行われはじめ

た。

## 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌において、機能性 RNA である miRNA を解析の対象とした研究は十分に行なわれておらず、頭頸部扁平上皮癌と miRNA の関連は不明な点が多い。そこで本研究では、頭頸部扁平上皮癌の miRNA の発現プロファイルを独自に作製し、癌関連 miRNA の探索を試みた。更に、癌細胞で発現が抑制されている miRNA を研究対象として、その機能解析と癌抑制型 miRNA が制御する遺伝子 (群) の探索法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 頭頸部扁平上皮癌臨床検体を用いた miRNA 発現プロファイルの作製は、Life Technologies 社の TaqMan® Low Density Array Human MicroRNA Panel を用いた。癌組織由来 RNA と非癌組織由来の RNA を用いて各 miRNA の発現を測定し、内在性 RNA で標準化した後、癌部と非癌部を比較した。

(2) miRNA 発現プロファイルにおいて癌組織で発現低下を認めた miRNA (miR-1、miR-133a および miR-375) について癌抑制型 miRNA の候補として、細胞増殖能、遊走能、浸潤能などの機能解析を試行した。実際には、頭頸部扁平上皮癌由来細胞株 (HSC3、FaDu および SAS) に合成した成熟型 miRNA を核酸導入し検討を行った。

(3) 癌抑制型 miRNA が制御する遺伝子 (群) の探索は、癌抑制型 miRNA (miR-1、miR-13 および miR-375) を癌細胞株に核酸導入した後 RNA を回収し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析法と、miRNA データベースを組み合わせた方法を考案し施行した。

## 4. 研究成果

(1) ゲノム上の構造を調べてみると、興

味深いことに、miR-1 と miR-133a はヒトゲノム上にクラスターとして近接しており、更に、同様のクラスターが 2 つの染色体上 (20q13.33 と 18q11.2) に存在している。miR-1 および miR-133a は、ショウジョウバエ、マウス、ヒトの筋組織中で高い発現が認められているクラスター-miRNA であり、これらは myomiRs とも呼ばれている。当初は、心筋・骨格筋の分化・増殖に関与する他、心不全や不整脈など心疾患の関連が報告されていた。我々は、miR-1/miR-133a クラスターが癌組織で有意に発現抑制されていることから、これら miRNA が癌抑制機能有している仮定を立て以下の解析を行った。扁平上皮癌や膀胱癌、腎癌、前立腺癌由来の複数の細胞株に核酸導入し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能、アポトーシス誘導能などの解析を試行した結果、miR-1 または miR-133a は各々癌の増殖・遊走・浸潤を有意に抑制し、アポトーシスの誘導を起こす事を見出した。

(2) 次に我々は、癌抑制型 miR-1/miR-133a クラスターは、癌遺伝子機能を有する遺伝子 (群) を共通して制御していると予想した。そこで、我々はマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析から miR-1/miR-133a クラスターによって制御される遺伝子 (群) の探索を行った。解析の結果、transgelin 2 (TAGLN2) は miR-1 と miR-133a の両方の導入細胞でその発現が大きく低下し、更に、タンパクコード遺伝子の 3' UTR 配列と miRNA のシード配列から結合を予測するプログラム

(TargetScanHuman:<http://www.targetscan.org/>) を用いたところ、TAGLN2 の 3' UTR には miR-1 と miR-133a がそれぞれ結合する部位が存在した。この事から TAGLN2 は miR-1/miR-133a クラスターの直接的な標的

遺伝子と考えられた。miR-1 または miR-133a の核酸導入によって、TAGLN2 の mRNA とタンパクの発現は明らかに抑制され、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイによって miR-1 および miR-133a が TAGLN2 の 3' UTR 予想結合部位で直接結合する事が証明された。

(3) miRNA 発現プロファイルから、miR-375 は癌組織において顕著に発現が抑制されている事が認められ、癌抑制型 miRNA の候補と考え機能解析を施行した。臨床検体を用いてその発現を確認すると、扁平上皮癌組織では非癌組織と比較して、有意に miR-375 発現が低下していた。更に、扁平上皮癌由来細胞株に miR-375 を核酸導入する事により、癌細胞の増殖抑制や遊走能の抑制が観察された。以上の解析結果から、miR-375 も癌抑制型 miRNA であると判断した。しかしながら、前立腺癌では miR-375 は癌部で発現が亢進している事が報告されており、癌遺伝子型の miRNA である可能性が示唆されている。同じ miRNA が細胞によって癌抑制型あるいは癌遺伝子型と逆の機能を有することは大変興味深い知見である。miRNA の発現制御機構が癌種によって異なっている事が推定されるが、その詳細な分子機構は未だ解かっていない。最近の食道扁平上皮癌の解析では、miR-375 の発現抑制にはゲノム上のメチル化が関与している事が示された。エピジェネティックな影響で発現制御を受ける miRNA とその miRNA によって発現制御されるタンパクコード遺伝子の複雑なネットワークの解明が細胞ごとに必要であり、その網羅的な解析方法の開発が待ち望まれている。

(4) 次に我々は、扁平上皮癌において miR-375 が制御する遺伝子 (群) の探索について miR-375 導入細胞を用いて行った。癌細胞を用いた解析の結果から、AEG-1/MTDH

(astrocyto-elevated gene-1/metadherin) が miR-375 の共通の標的遺伝子である事が示唆された。AEG-1/MTDH は当初、胎児アストロサイト細胞において HIV-1 または TNF-alpha により誘導される遺伝子をしてクローニングされた。その後、悪性星細胞種や神経芽細胞種などの多くの癌において過剰発現する事が確認されている。我々の解析からも、扁平上皮癌で発現が更新している事が示された。AEG-1/MTDH 遺伝子ノックダウンによる解析では、癌細胞の増殖抑制を認めており、扁平上皮癌において、癌抑制型 miR-375 の発現抑制と AEG-1/MTDH 遺伝子の過剰発現の分子機構が明となった。

(5) 2004年にヒトゲノム解読プロジェクトが完了し、その結果としてヒトゲノム中には数多くのタンパク質をコードしない機能性 RNA (non-coding RNA: ncRNA) の存在が明らかになった。ヒトの転写産物の多くが機能未知である ncRNA であり、タンパクコード遺伝子は僅か数%にすぎない。miRNA は癌研究分野で注目され、ここ数年で大きく解析が進んだ ncRNA の一種であるが、その機能や制御する分子ネットワークはほとんど解かっていない。本研究により、頭頸部扁平上皮癌において僅か 21 塩基の RNA 分子が癌抑制遺伝子として機能する事が証明された。この小さい RNA 分子が制御する分子ネットワークの新しい解明方法の開発が急務であり、ゲノム中に存在する ncRNA-mRNA ネットワークの全体像を描き出す事が、ポスト・ゲノムシーケンス時代の癌研究の大きなテーマであると考えられる。

#### 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 15 件)

①Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Sakurai

D, Fujimura L, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Katayama A, Harabuchi Y, Okamoto Y, Seki N. Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. 査読あり  
Br J Cancer. (2011) 105:833-41.

②Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Sakurai D, Fujimura L, Kawakami K, Chiyomaru T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). 査読あり  
J Hum Genet. (2011) 56:595-601.

③Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Sakurai D, Sasaki K, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. 査読あり  
Int J Oncol. (2011) 39:1099-107.

④Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, Fuse M, Kikkawa N, Yoshino H, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Okamoto Y, Seki N. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. 査読あり  
Oncotarget. (2011) 2:29-42.

⑤Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Fujimura L, Yoshino H, Kawakami K, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. 査読あり  
Int J Oncol. (2011) 38:209-17.

⑥Kikkawa N, Hanazawa T, Fujimura L, Nohata N, Suzuki H, Chazono H, Sakurai D, Horiguchi S, Okamoto Y, Seki N. (2010) miR-489 is a tumour-suppressive miRNA target PTPN11 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC). 査読あり  
Br J Cancer. (2010) 103:877-84.

〔学会発表〕(計10件)

①Nijiro Nohata, Toyoyuki Hanazawa, Takashi Kinoshita, Naoko Kikkawa, Muradil Mutallip, Takeshi Chiyomaru, Kazumori Kawakami, Hirofumi Yoshino, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki  
Tumor suppressive microRNA-1/-133a regulates multiple oncogenes in maxillary sinus squamous cell carcinoma.  
16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine (October, 6-8, 2011, Rhodes Island, Greece)

②Takashi Kinoshita, Nijiro Nohata, Toyoyuki Hanazawa, Naoko Kikkawa, Mutallip Muradil, Hirofumi Yoshino, Kazumori Kawakami, Takeshi Chiyomaru, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki  
Tumor suppressive microRNA-375 targeting multiple oncogenes in maxillary sinus squamous cell carcinoma (MSSCC).  
第70回 日本癌学会学術総会 (平成23年10月3日・4日・5日 名古屋国際会議場 名古屋)

③Nijiro Nohata, Toyoyuki Hanazawa, Naoko Kikkawa, Miki Fuse, Takeshi Chiyomaru, Kazumori Kawakami, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki  
miR-133a as a tumor suppressive microRNA targeting multiple oncogenes in head neck squamous cell carcinoma.  
AACR 102nd Annual Meeting (April2-6, 2011, Orlando, Florida)

④Toyoyuki Hanazawa, Nijiro Nohata, Naoko Kikkawa, Akihiro Katayama, Yasuaki Harabuchi, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki  
Identification of tumor suppressive microRNAs in maxillary sinus squamous cell carcinoma based on microRNA expression signature.  
AACR 102nd Annual Meeting (April2-6, 2011, Orlando, Florida)

〔その他〕

ホームページ等

<http://genomejet.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

関 直彦 (SEKI NAOHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

(2)研究分担者

花澤 豊行 (HANAZAWA TOYOYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90272327