

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790072

研究課題名 (和文) 食道扁平上皮癌におけるmicroRNAによる細胞増殖・悪性度制御機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of regulatory mechanisms for cancer cell proliferation and malignancies by microRNA in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

土屋 創健 (TSUCHIYA SOKEN)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80423002

研究成果の概要 (和文) : 特に低分化の食道扁平上皮癌において miR-210 の発現量が有意に低下していること、食道扁平上皮癌細胞株における解析から miR-210 は癌細胞において G1/G0 期及び G2/M 期における細胞周期停止とアポトーシスを誘導することを見いだした。さらに少なくとも G1/G0 期における細胞周期停止は miR-210 が *FGFRL1* の発現を低下させることで発揮されていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Here, we reports that the expression of microRNA-210 (miR-210) is downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and derived cell lines. Marked decreases in the level of miR-210 were observed especially in poorly differentiated carcinomas. We found that miR-210 inhibits cancer cell survival and proliferation by inducing cell death and cell cycle arrest in G1/G0 and G2/M. Finally, we identified fibroblast growth factor receptor-like 1 (*FGFRL1*) as a target of miR-210 in ESCC, and demonstrated that *FGFRL1* accelerates cancer cell proliferation by preventing cell cycle arrest in G1/G0. Taken together, our findings show an important role for miR-210 as a tumor suppressive microRNA with effects on cancer cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞増殖制御メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は発生頻度で8番目、死亡者数で6番目に多く、近年の外科治療及び放射線化学療法への進歩にも関わらず、高頻度に遠隔転移・再発を起す傾向のある悪性度の高い癌である。その為、予後は悪く、日本食道癌登録 (Comprehensive Registry of Esophageal

Cancer in Japan 1998, 1999, [http://www.esophagus.jp/pdf\\_files/CREC\\_JPN\\_3rd.pdf](http://www.esophagus.jp/pdf_files/CREC_JPN_3rd.pdf)) で食道癌切除後の5年生存率は36%、放射線化学療法の場合の3年生存率は約30%である。それゆえ、食道癌患者の予後改善には、既存治療法の改良及び新しい治療法の開発が必要であり、その為には食道

癌の病態のより深い理解と情報が不可欠である。近年、タンパク質をコードしないにもかかわらず、がんの発症・悪性化等に重要な役割を果たす短鎖の **non-coding RNA**、**microRNA** (現在までにヒトにおいて約 800 種類)が発見され、これまで単なる伝達役に過ぎないと考えられてきた RNA の機能性に着目した新たな生命科学の展開に大きな期待が寄せられている(Tsuchiya *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.* 2006)。しかしながら、食道扁平上皮癌における **microRNA** の役割についてはまったく明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

食道扁平上皮癌における **microRNA** の役割については未だ明らかになっていないことから、研究代表者が発見した扁平上皮食道癌における miR-210 の有意な発現減少が扁平上皮食道癌の増殖や悪性度に及ぼす影響とその分子メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 食道扁平上皮癌臨床サンプル及び細胞株における miR-210 の発現量を定量 PCR 法により定量した。

(2) miR-210 を食道扁平上皮癌細胞株に導入し、細胞増殖及び細胞周期・アポトーシスにおける影響をそれぞれ WST1 assay・BrdU 取り込み実験と FACS 解析を用いて調べた。

(3) 食道扁平上皮癌における miR-210 の標的遺伝子を同定するため、マイクロアレイを用いた網羅的な発現比較解析を行った。

(4) 食道扁平上皮癌における *FGFRL1* の機能・役割を調べるため、small interfering RNA (siRNA) と 3' UTR を削った *FGFRL1* を発現するベクターを構築して解析を行った。

(5) *FGFRL1* に対する抗体を用いて食道扁平上皮癌臨床サンプルにおける免疫染色を行うとともに、本抗体を処理した際の食道扁平上皮癌細胞株における細胞増殖への影響を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌 (Esophageal squamous cell carcinoma; ESCC) の臨床サンプル (N = 82) を用いて miR-210 の発現量を定量したところ、正常組織と比較して癌組織において発現量が有意に低下しており、特に低分化の ESCC において miR-210 の発現量が低下していた。さらに ESCC 由来細胞株 (KYSE-150, 170, 190) と正常組織由来の初代培養細胞 (HE3, HEEpiC) を用いて miR-210 発現量を比較したところ、同様にいずれの KYSE 株においても miR-210 の発現量が顕著に低下していた。

(2) そこで KYSE-170 細胞株に合成 miR-210 を導入した際の細胞増殖への影響を調べた。WST-1 assay および BrdU 取り込み実験を行った結果、miR-210 の導入により ESCC の細胞増殖が阻害された。また、その際に G1/G0 期及び G2/M 期における細胞周期停止とアポトーシスが誘導されることを見いだした。

(3) miRNA は mRNA の 3' UTR に相補配列依存的に結合してその標的 mRNA の分解及び翻訳を阻害する。そこで miR-210 が ESCC の細胞増殖を抑制しているメカニズムを明らかにするためにマイクロアレイ解析を用いて標的 mRNA の同定を行った。その結果、3' UTR に miR-210 の標的となりうる配列を有し、かつ、miR-210 を導入により最も発現が低下する遺伝子は *FGFRL1* であった。

(4) *FGFRL1* が ESCC の細胞増殖に関与するかどうかを検証した。siRNA を用いて *FGFRL1* の発現量を miR-210 導入時と同様の約 1 割程度にまで低下させたところ、WST-1 assay において値が有意に低下し、*FGFRL1* が ESCC の細胞増殖を促進していることが示唆された。さらに 3' UTR を削った *FGFRL1* を過剰発現させると miR-210 の増殖抑制効果が有意に回復することが明らかとなった。以上の結果より、miR-210 は主に *FGFRL1* の発現を制御することで ESCC において tumor suppressive miRNA として機能している可能性が示唆され、miR-210 の発現低下が低分化の癌において細胞増殖が亢進している一因である可能性が示唆された。

(5) さらに、*FGFRL1* が食道扁平上皮癌のバイオマーカー及び治療標的分子として有用であるかどうかを検証するため、食道扁平上皮癌の臨床サンプルを用いて *FGFRL1* タンパク質の免疫染色を行ったところ、正常組織と比較して癌組織における *FGFRL1* タンパク質の発現亢進が示唆された。さらに *FGFRL1* タンパク質の染色性と生存率において有意な相関が認められ、*FGFRL1* タンパク質の発現量が多いほど予後が悪い傾向が明らかとなった。加えて *FGFRL1* タンパク質の細胞外領域における抗体が食道扁平上皮癌細胞株の細胞増殖を有意に抑制することを見だし、*FGFRL1* が未だ有効な分子標的薬及びバイオマーカーが存在しない食道扁平上皮癌における新規の治療標的分子及び予後判定バイオマーカー候補として期待されることが判明した。

## 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 3 件)

① Tsuchiya S., Fujiwara T., Sato F., Shimada Y., Tanaka E., Sakai Y., Shimizu

K. and Tsujimoto G. MicroRNA-210 Regulates Cancer Cell Proliferation through Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1 (*FGFRL1*). *J. Biol. Chem.* 286, 420-428, 2011. 査読有り

② Sato F., Tsuchiya S., Meltzer S. and Shimizu K. MicroRNAs and Epigenetics. *FEBS J.* 278, 1598-1609, 2011. 査読有り

③ Imanaka Y., Tsuchiya S., Sato F., Shimada Y., Shimizu K., Tsujimoto G. MicroRNA-141 Confers Resistance to Cisplatin-induced Apoptosis by Targeting YAP1 in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J. Hum. Genet.* 56, 270-276, 2011. 査読有り

[学会発表] (計6件)

① 土屋創健、佐藤史顕、嶋田裕、辻本豪三、清水一治  
miR-210による新規標的遺伝子 *RAB26* の翻訳阻害は食道扁平上皮癌の細胞増殖を抑制する  
日本薬学会 (第131年会)  
2011年3月30日  
ツインメッセ静岡 (静岡)

② Tsuchiya S., Fujiwara T., Sato F., Tsujimoto G., Shimizu K.  
miR-210 regulates cancer cell proliferation through targeting *FGFRL1*  
*Biochemistry and Molecular Biology* (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会)  
2010年12月9-10日  
神戸ポートアイランド (神戸)

③ Fujiwara T., Tsuchiya S., Sato F., Shimada Y., Tsujimoto G., Shimizu K.  
Bioinformatic identification of tissue specific microRNA targets by mRNA expression profiles.  
*Biochemistry and Molecular Biology* (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会)  
2010年12月9日  
神戸ポートアイランド (神戸)

④ 今中由花子、土屋創健、佐藤史顕、嶋田裕、清水一治、辻本豪三  
miR-X Contributes to Cisplatin Resistance of Esophageal Cancer cells.  
第32回日本分子生物学会年会  
2009年12月11日  
パシフィコ横浜 (横浜)

⑤ 土屋創健、佐藤史顕、藤原大、嶋田裕、辻本豪三、清水一治  
食道扁平上皮癌におけるmicroRNA-210の発現低下とそれによる細胞周期停止解除を介した細胞増殖亢進機構の解明  
第82回日本生化学会大会  
2009年10月23日  
神戸ポートアイランド (神戸)

⑥ 土屋創健、佐藤史顕、藤原大、嶋田裕、辻本豪三、清水一治  
microRNA-210の発現低下による細胞周期停止機能の破綻を介した食道扁平上皮癌細胞の細胞増殖促進メカニズムの解明  
第54回日本人類遺伝学会大会  
2009年9月24日  
グランドプリンスホテル高輪 (東京)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 癌治療剤及び癌の予後判定方法  
発明者: 土屋創健、辻本豪三、清水一治、嶋田裕、塚田一博  
権利者: 国立大学法人京都大学  
種類: 特許  
番号: 特願2010-083157  
出願年月日: 2011年3月31日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/nanobio>

招待講演 (計3件)

① 土屋創健  
熊本大学薬学教育部大学院講義  
「がんにおける microRNA の役割」  
2011.6.2

② 土屋創健  
奈良市健康講座  
「がん研究最前線」-がん分子標的薬の現在と今後の展望-  
2010.11.11

③ 土屋創健  
東レ株式会社 "3D-Gene" テクニカルセミナー  
「食道扁平上皮癌における microRNA-210 の発現低下とそれによる細胞増殖促進メカニズムの解明」  
2010.10.23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 創健 (TSUCHIYA SOKEN)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80423002