

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590076

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌特異的なmicroRNAの機能解析及びその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of roles and their molecular mechanisms on microRNAs specific in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

土屋 創健(tsuchiya, soken)

熊本大学・生命科学研究部・講師

研究者番号：80423002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌臨床サンプルにおいて、発現量が有意に変化していたmicroRNAのうち、3種が癌細胞の増殖に関与すること、2種が癌細胞の遊走に関与することを見いだした。さらに、食道扁平上皮癌細胞におけるこれらのmicroRNAの標的遺伝子を網羅的に同定した。上記中で最も顕著な効果を発揮した、遊走抑制能を有するmicroRNAの標的遺伝子をそれぞれノックダウンし、遊走能に関わる遺伝子を同定したところ、2種の細胞外分泌に関わる遺伝子が食道扁平上皮癌細胞の遊走能を促進することを新たに見いだした。以上より、食道扁平上皮癌細胞が細胞外分泌システムを利用して自身の遊走能を促進する可能性を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the microRNAs whose expressions are changed in human esophageal squamous cell carcinoma as compared with neighboring normal tissues, I found that three microRNAs are involved in cancer cell survival and proliferation and other two microRNAs are involved in cancer cell migration. Furthermore, I comprehensively identified target candidate genes degraded by these microRNA in esophageal squamous cell carcinoma cells. Migration of esophageal squamous cell carcinoma cells was inhibited by each knockdown of two target genes among six target genes of the microRNA, which was most potently inhibited cancer cell migration. As these target genes play important roles on exosytic release, my findings show for the first time the possibility that esophageal squamous cell carcinoma cells accelerate cancer cell migration through exosytic release system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：microRNA 食道扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は男性に多く、発生頻度・死亡者数で7番目に多い癌である。近年の外科治療及び放射線化学療法の進歩にも関わらず、高頻度に遠隔転移・再発を起こす傾向のある悪性度の高い癌であり、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1,000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 の役割についてはほとんど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 の役割は未だほとんど明らかになっていないことから、研究代表者が発見した食道扁平上皮癌における microRNA の有意な発現量変化が食道扁平上皮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) 合成 microRNA を食道扁平上皮癌細胞株に導入し、癌細胞増殖及び遊走能における影響をそれぞれ WST1 assay と transwell を用いた migration assay 法を用いて調べた。

(2) 食道扁平上皮癌における microRNA の標的候補遺伝子を見いだすため、合成 microRNA を導入した際の遺伝子発現プロファイル変化を網羅的発現比較解析から同定した。

(3) 食道扁平上皮癌における標的候補遺伝子の機能・役割を調べるため、small interfering RNA (siRNA) を用いて loss of function 解析を行った。

(4) 標的遺伝子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

色を行った。

## 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌の臨床サンプル (n = 82) において正常組織と比較して有意に発現量の変動した複数の microRNA を同定した。まず、細胞生存・増殖の指標である WST-1 assay を用いて、これらの microRNA が食道扁平上皮癌細胞の増殖に及ぼす影響を、合成 microRNA を食道扁平上皮癌細胞株に導入して調べたところ、3種の microRNA (いずれも癌組織で発現低下) の導入によりそれぞれ食道扁平上皮癌の細胞増殖が有意に抑制されることを見いだした。次に、トランズウェルを用いた癌細胞の遊走活性評価系を構築し、癌細胞の遊走活性に及ぼす効果を検証したところ、別の microRNA (癌組織で発現亢進) が癌細胞の遊走を促進、さらに別の microRNA (癌組織で発現低下) が癌細胞の遊走を抑制することを見いだした。

(2) microRNA の作用は mRNA の 3' untranslated region (UTR) に相補配列依存的に結合して mRNA を分解もしくはその翻訳を抑制することにより発揮されることから、5種の microRNA の食道扁平上皮癌における標的 mRNA を網羅的な発現比較解析を用いて探索した。具体的には食道扁平上皮癌細胞株に5種の microRNA をそれぞれ導入した際の遺伝子発現プロファイル変化を捉え、導入により発現が低下した遺伝子を抽出し、さらにその遺伝子の 3' UTR に導入 microRNA と相補性を有する配列を有するかどうかで、導入 microRNA の直接的な標的候補遺伝子であるかどうかを推測した。その結果、それぞれ 17、4、4 (以上、癌細胞増殖抑制効果を有する microRNA)、18 (癌細胞遊走促進効果を有する microRNA)、6 (癌細胞遊走抑制効果を有する microRNA) 個の標的候補遺伝子を見いだした。

(3) 上述の5種の microRNA の中で最も顕著な効果を発揮した、癌細胞遊走抑制効果を有する microRNA に着目し、その作用メカニズムの解明を行った。具体的には loss of function 解析として siRNA を用いた標的遺伝子のノックダウン実験を行ったところ、6種の標的遺伝子の内、2種の標的遺伝子のそれぞれのノックダウンにより食道扁平上皮癌細胞の遊走能が有意に低下した。

(4) さらに(3)の2種の標的遺伝子において、それぞれの特異的抗体を用いてヒト食道扁平上皮癌臨床サンプルにおける免疫染色を行ったところ、いずれにおいても正常組織と比較して癌組織における発現亢進が示唆された。

以上の成果により、食道扁平上皮癌細胞が細胞外分泌システムを利用して自身の遊走能を促進している可能性が新たに見いだされた。

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2件)

Tsuchiya S. The Role of MicroRNA-210 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Yakugaku Zasshi* 132, 1069-1073, 2012. 査読有り

Ichikawa T., Sato F., Terasawa K., Tsuchiya S., Toi M., Tsujimoto G. and Shimizu K. Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells. *PLoS One* 7, e31422, 2012. 査読有り

[学会発表](計10件)

土屋創健、嶋田裕、清水一治、杉本幸彦  
miR-210 による食道扁平上皮癌細胞増殖抑制機構の解明  
第30回日本薬学会九州支部大会  
2013年12月7日  
長崎国際大学(長崎)

濱田ひかり、土屋創健、杉本幸彦  
食道扁平上皮癌の遊走における microRNA の機能解明  
第30回日本薬学会九州支部大会  
2013年12月7日  
長崎国際大学(長崎)

土屋創健  
microRNA を起点とした食道癌の創薬ターゲット探索  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013 アカデミア創薬シンポジウム 創薬から学問へ  
2013年8月31日  
熊本大学(熊本)

土屋創健  
食道扁平上皮癌における miR-210 の機能・役割とその分子機構  
第62回日本薬学会近畿支部総会・大会 支部会奨励賞受賞者講演  
2012年10月20日  
武庫川女子大学(兵庫)

土屋創健

食道扁平上皮癌における microRNA とその標的遺伝子に着目したバイオマーカー探索

第12回日本抗加齢医学会総会 ベーシックサイエンス4 先制医療とバイオマーカー

2012年6月24日  
パシフィコ横浜(神奈川)

土屋創健、嶋田裕、杉本幸彦、辻本豪三、清水一治

食道扁平上皮癌における microRNA-210 の癌細胞増殖抑制機構

日本薬学会第132年会  
2012年3月30日  
北海道大学(北海道)

土屋創健

食道扁平上皮癌における microRNA-210 の機能と創薬ターゲット

第85回日本薬理学会年会 シンポジウム8 悪性腫瘍のオミックス創薬ターゲット戦略

2012年3月14日  
国立京都国際会館(京都)

Sato F., Ito T., Tsuchiya S., Kawaguchi-Sakita N., Shimizu K., Tsujimoto G., Toi M.

Epigenetics-regulated microRNAs related with epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells.

San Antonio Breast Cancer Symposium  
2011年12月7日  
San Antonio Convention Center (米国 サンアントニオ)

土屋創健、嶋田裕、藤原大、佐藤史顕、辻本豪三、清水一治

食道扁平上皮癌における FGFR1 の発現抑制を介した microRNA-210 の細胞増殖抑制機構

第61回日本薬学会近畿支部総会・大会  
2011年10月22日  
神戸学院大学(神戸)

土屋創健、嶋田裕、辻本豪三、清水一治

食道扁平上皮癌における microRNA-210 の癌細胞増殖抑制機構の解明

第84回日本生化学会大会  
2011年9月24日  
国立京都国際会館(京都)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

〔その他〕

報道関連情報

日経バイオテク

京大の土屋助教、食道扁平上皮がんにおけるオミックス創薬ターゲット戦略を紹介

2012年3月20日

ホームページ情報

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seika/>

招待講演（計1件）

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年6月2日

熊本大学（熊本）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 創健（TSUCHIYA, SOKEN）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80423002