

## 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 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659858

研究課題名（和文） 口腔癌の浸潤における microRNA の関与とその分子機構の解明

研究課題名（英文） The involvement and their molecular mechanism of microRNAs in the invasion of oral cancer

研究代表者

工藤 保誠 (KUDO YASUSEI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：50314753

研究成果の概要（和文）：

我々は、樹立した口腔癌細胞株と高浸潤能を有するクローンを用いて microRNA(miRNA)発現プロファイルを網羅的に解析し、高浸潤能細胞で発現が低下したいくつかの miRNA から、miR-203 を口腔癌の浸潤に関わる miRNA として同定した。さらに、その標的 mRNA として、NUAK および SNAI2 を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We identified miR-203 as an invasion related microRNA (miRNA) by comparing miRNA expression profile between oral cancer cell line and its highly invasive clone. Moreover, we identified NUAK and SNAI2 as a target mRNA of miR-203.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は、タンパク質をコードしない小さな RNA 分子で、ゲノム上にヒトでは 800 を超える miRNA が同定されている。ヒト遺伝子産物の約 1/3 が、miRNA による制御を受けると考えられている。miRNA は、RNA 干渉 (RNAi) と関連のある Argonaute タンパク質と共に複合体を形成し、miRNA と部分的に相補的な mRNA と結合し、mRNA の分解や翻訳の抑制を介して遺伝子調節に関わると考えられている。miRNA による遺伝子調節機能は腫瘍形成、発生、ウイルス感染などに関与することが示唆されているが、多くの miRNA は未だそのターゲットとなる遺伝子が明らかにされていない。これまでに、我々は、口腔癌患者の頸部リンパ節転移巣より高浸潤能を有する細胞株を樹立し (Oral Oncol 39:515-520, 2003)、in vitro

invasion assay 法を応用してその細胞から高浸潤能を有するクローンを分離した (Clin Cancer Res 10: 5455-5463, 2004)。さらに、我々はマイクロアレイを用いて親株と高浸潤能細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、浸潤に関わるいくつかの候補遺伝子を同定した (Cancer Res 66: 6928-6935, 2006; Clin Cancer Res 14: 6097-6105, 2008; Am J Pathol: in press)。我々は、樹立した口腔癌細胞株と高浸潤能を有するクローンを用いて miRNA 発現プロファイルを網羅的に解析し、高浸潤能細胞で発現が低下したいくつかの miRNA を同定した。そこで、本研究では、同定した miRNA の浸潤への関与とその分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

microRNA (miRNA)による遺伝子調節機能は、腫瘍形成、発生、ウイルス感染などの様々な生命現象に関与することが示唆されている。口腔癌は、発生率が年々増加傾向にあり、外科的切除により審美的・機能的あるいは心理的な損失が大きく、QOLの低下が著しい。口腔癌の浸潤・転移は、患者の予後を左右する最も重要な要因であることから、口腔癌の浸潤機構の解明は効果的な診断・治療を開発するために重要な課題である。我々は、口腔癌のリンパ節転移巣より樹立した細胞株とその細胞より分離した高浸潤能クローンのmiRNA発現プロファイルを網羅的に解析し、高浸潤能細胞で発現が低下していたいくつかのmiRNAを同定した。そこで、本研究では同定したmiRNAの浸潤への関与とその分子機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、我々が樹立した口腔癌細胞株と高浸潤能を有する細胞のアレイを用いたmiRNAの発現プロファイルの解析データから、高浸潤能を有する細胞で発現低下していたmiRNAに着目し、それらの浸潤への関与を標的mRNAの検索も含めて検討する。さらに、同定したmiRNAの口腔癌細胞の浸潤への関与を詳細に検討する。最終的には、口腔癌組織におけるmiRNAの発現と標的mRNAの発現を検討した。

(1) 口腔癌の浸潤に関わるmiRNAの同定  
ヒト約900種のmiRNAを網羅的に検索するアレイである“3D-Gene” Human miRNA (東レ)を用いて、親株と高浸潤能を有する細胞のmiRNAの発現を網羅的に比較検討した結果、高浸潤能を有する細胞で、miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141)とmiR-203が発現低下していた。miR-200 familyの発現低下がE-cadherinの発現低下を介して、EMTに関わることはすでに報告されているため、miR-203に着目し、次の検討を行った。

①口腔癌細胞株におけるmiR-203の発現  
我々が有している口腔癌細胞株におけるmiR-203の発現をreal-time PCRにより検討した。

②miR-203の浸潤への関与の検討  
miR-203の発現が認められない癌細胞に、内在性の成熟miRNAの機能を模倣したmiR-203 mimicを導入し、癌細胞の浸潤が抑制されるかどうかを検討した。また、miRNAの発現の高い癌細胞にmiR-203 inhibitorを導入し、その発現を抑制し、癌細胞の浸潤が促進されるかを検討した。

(2) 口腔癌の浸潤に関わるmiR-203の標的mRNAの検索

miR-203の標的mRNAの同定を試みた。miRNAは、標的mRNAに結合し、mRNAの分解あるいは翻訳抑制を行う際にAgo2を含めたRISC複合体を形成することから、標的mRNAの同定には、Ago2抗体を用いた免疫沈降法を応用した。

#### ①標的mRNAの同定

miR-203を導入した細胞とコントロール細胞からAgo2抗体を用いて、免疫沈降法によりRISCに取り込まれた標的mRNAを精製し、マイクロアレイにより標的mRNAを同定した。さらに、既存のデータベースであるTarget Scanを用いて、miR-203の標的mRNAとのオーバーラップを調べ、絞り込みを行った。次に、絞り込んだ標的mRNAから、miR-203を導入した細胞で発現低下するものとmiR-203 inhibitorの導入により発現があがるものを調べた。

#### ②標的mRNAの浸潤への関与の検討

上記解析により絞り込んだ標的mRNAが浸潤にかかわるかどうかを標的mRNAを癌細胞へ導入することにより浸潤への関与を検討した。浸潤能は、マトリゲルを用いたin vitro invasion assayにより解析した。

#### ③ルシフェラーゼアッセイによる標的mRNAのmiRNAによる発現抑制の検討

ルシフェラーゼアッセイにより、miRNAが直接標的mRNAを抑制するかどうかを検討する。

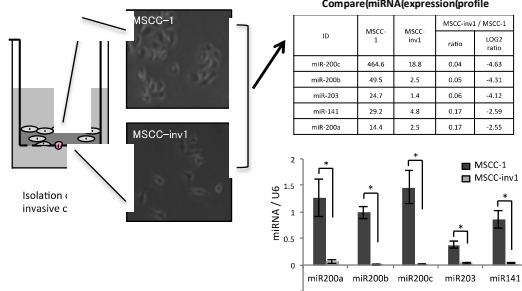
(3) 口腔癌症例におけるmiR-203および標的mRNAの発現の検討

口腔癌症例の組織から抽出したtotal RNAを用いてmiR-203とその標的mRNAの発現をreal-time PCRを用いて定量的に解析し、臨床病理学的データより癌の浸潤動態や転移との相関を調べた。また、標的mRNAの抗体を購入あるいは作製し、口腔癌症例のパラフィン包埋切片を用いてその発現を検討し、臨床病理学的データより癌の浸潤動態や転移との相関を調べた。

### 4. 研究成果

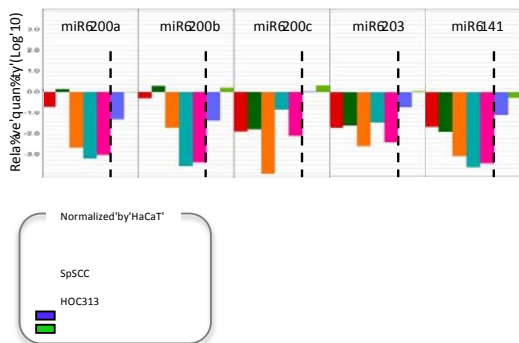
microRNA (miRNA)による遺伝子調節機能は、腫瘍形成、発生、ウイルス感染などの様々な生命現象に関与することが示唆されている。口腔癌は、発生率が年々増加傾向にあり、外科的切除により審美的・機能的あるいは心理的な損失が大きく、QOLの低下が著しい。口腔癌の浸潤・転移は、患者の予後を左右する最も重要な要因であることから、口腔癌の浸潤機構の解明は効果的な診断・治療を開発す

図1



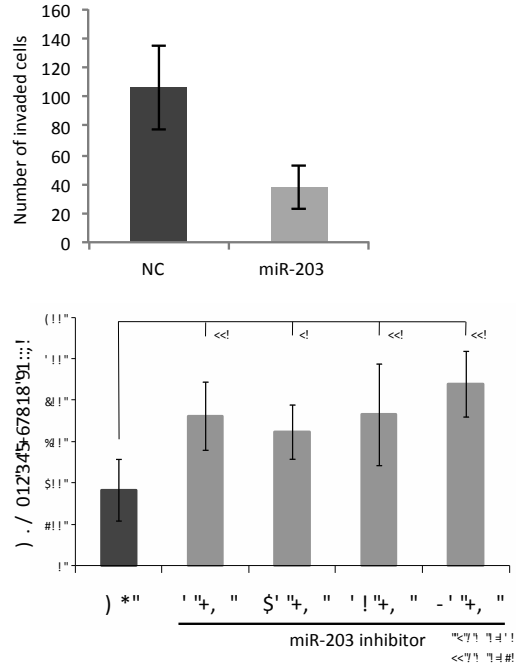
るために重要な課題である。我々は、ヒト約900種のmiRNAアレイを用いて、口腔癌のリンパ節転移巣より樹立した細胞株とその細胞より分離した高浸潤能クローンのmiRNA発現プロファイルを網羅的に比較検討した結果、高浸潤能を有する細胞で発現低下していたmiRNAとして、miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141) と miR-203 を同定した (図1)。そこで、我々が有している口腔癌細胞株におけるmiRNAの発現をreal-time PCRにより検討ところ、EMT (上皮間葉移行) をおこした癌細胞でのみ発現低下がみられた (図2)。miR-200 family の発現低下がE-cadherinの発現低下を介して、EMTに関わることはすでに報告されているため、miR-203に着目し、浸潤やEMTへの関与につ

図2



いて検討した。miR-203の発現が認められない癌細胞に、内在性の成熟miRNAの機能を模倣したmiRNA mimicを導入し、癌細胞の浸潤への影響を検討したところ、浸潤が抑制された。また、miR-203の発現の高い癌細胞にmiRNA inhibitorを導入し、その発現を抑制したところ、癌細胞の浸潤が促進されたことから、miR-203は、口腔癌の浸潤に深く関与することが明らかとなった (図3)。また、EMTへの影響についても検討したところ、E-cadherinの発現変化はみられなかったが、細胞の形態や他のEMTマーカーであるvimentinの発現変化が認められた。次に、miR-203の標的mRNAを同定するため、Ago2抗体を用いて、標的mRNAを含めたRISC複合体を免疫沈降し、その産物をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果 (図4左

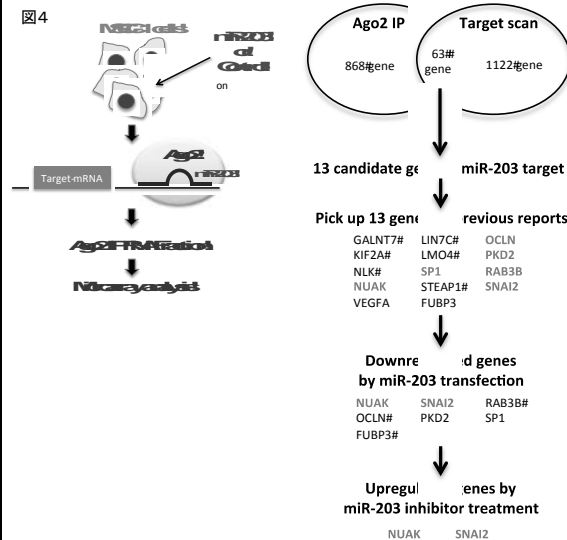
図3



上グラフでは、成熟miR-203の導入により、口腔癌細胞の浸潤能が抑制されているが、miR-203 inhibitorの導入により、浸潤能の増強がみられたことから、miR-203は口腔癌細胞の浸潤に深く関与することが明らかとなった。

に示す) と既存のデータベースにおける標的候補mRNAを照らし合わせ、63遺伝子を標的候補mRNAとして同定した (図4右に示す)。さらに、これまでの文献から、癌の浸潤、EMT誘導などに関わる13遺伝子に着目し、miR-203の導入により発現が低下し、miR-203 inhibitorの導入により発現が増加する遺伝子を調べたところ、NUAKおよびSNAI2の2遺伝子を標的mRNAとして同定した (図4右に示す)。SNAI2は、すでにmiR-203の標的遺伝子として報告されており、E-cadherinのリプレッサーとしてよく知られている因子であるため、NUAKに着目した。口腔癌細胞株から、NUAKの3' UTR領域をクローニングし、ルシ

図4



フェレーズ解析を行ったところ、miR-203によりルシフェレーズ活性が抑制されたことから、NUAKがmiR-203の新規標的遺伝子であることを明らかにした。現在、NUAKの口腔癌細胞における浸潤への関与について詳細に検討しているところである。また、口腔癌症例におけるmiR-203の発現を調べたところ、多くの症例で発現低下がみられ、NUAKの発現と逆相関していた。また、口腔癌細胞におけるmiR-203の発現低下は、プロモーター領域のメチル化によって引き起こされることを明らかにした。実際に、メチル化阻害剤である5' Azaを処理すると、miR-203の発現の増加がみられた。

以上のように、我々は、口腔癌の浸潤に関わるmicroRNAとして、miR-203を同定し、その標的遺伝子としてNUAKとSNAI2を同定した。これら結果をまとめて、論文として投稿する予定である。

#### 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 5 件)

1. Kudo, Y.\*, Iizuka, S., Yoshida, M., Tsunematsu, T., Subarnbhesaj, A., Siriwardena, S.B.S.M., Tahara, H., Ogawa, I., Takata, T. Matrix metalloproteinase-13 directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 287:38716-38728, 2012. \*責任著者, 査読有り, PMID:22992737
2. Kudo, Y.\*, Iizuka, S., Yoshida, M., Nguyen, P.T., Siriwardena, S.B.S.M., Tsunematsu, T., Obayashi, M., Ando, T., Hatakeyama, D., Shibata, T., Koizumi, K., Maeda, M., Ogawa, I., Takata, T. Periostin promotes tumor lymphangiogenesis in a direct and an indirect manner. *PLoS ONE* 7, e44488, 2012. \*責任著者, 査読有り, doi: 10.1371/journal.pone.0044488, PMID: 22952986
3. Desrochers, T.M., Shamis, Y., Alt-Holland, A., Kudo, Y., Takata, T., Wang, G., Jackson-Grusby, L., Garlick, J.A. The 3D tissue microenvironment modulates DNA methylation and E-cadherin expression in squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 7:34-46, 2012. PMID: 22207358
4. Deraz, E.M., Kudo, Y.\*, Yoshida, M., Tani, H., Tsunematsu, T., Siriwardena, B.S.M.S., Kiekhäe, M.R., Qi, G., Iizuka, S., Ogawa, I., Campisi, G., Lo Muzio, L., Abiko, Y., Kikuchi, A.,

Takata, T. MMP-10/stromelysin-2 promotes invasion of head and neck cancer. *PLoS ONE* 6(10): e25438, 2011. \*責任著者, 査読有り, doi: 10.1371/journal.pone.0025438, PMID: 21998657

5. Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., Takata, T., Shimamoto, A., Ochiya, T., Tahara, H. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol* 193(2):409-424, 2011. 査読有り, PMID: 21502362

[学会発表] (計 5 件)

1. 大林真理子, 吉田真希, 工藤 保誠, 高田隆. 口腔癌における浸潤抑制因子としてのmiR-203の同定. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19-21日, 札幌市(ロイトン札幌)
2. Nguyen PT, Inubushi T, Tsunematsu T, Kudo Y, Kamata N, Ogawa I, Takata T. FGFR-1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through suppression of AP-1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 第23回日本臨床口腔病理学会・学術大会 2012年8月30日, 東京都(東京医科歯科大学)
3. Obayashi M, Kudo Y, Yoshida M, Hino Y, Fukunaga S, Tahara H, Takata T. Identification of microRNA-203 as an inhibitor of invasion in oral cancer. 59<sup>th</sup> JADR Annual Meeting. 2011年10月8-9日, 広島市(広島国際会議場)
4. 大林真理子, 工藤保誠, 吉田真希, 日野由美子, 福永早央里, 田原栄俊, 高田 隆. 口腔癌における浸潤抑制因子としてのmiR-203の同定. 第3回RNAi研究会 2011年8月26-27日, 広島市(広島プリンスホテル)
5. 大林真理子, 工藤保誠, 吉田真希, 日野由美子, 福永早央里, 田原栄俊, 高田 隆. 口腔癌における浸潤抑制因子としてのmiR-203の同定. 第30回分子病理学研究会 2011年7月22-24日, 倉敷市(下電ホテル)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 保誠 (KUDO YASUSEI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 50314753

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号 :