

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 4 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012年度

課題番号：23791876

研究課題名（和文）

癌抑制マイクロ RNA を基点とした下咽頭癌・食道癌の新規分子ネットワークの解明

研究課題名（英文）

Identification of hypo-pharyngeal and esophageal squamous cell carcinoma molecular pathways based on microRNA expression signature

研究代表者

吉川 直子 (KIKKAWA NAOKO)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50400924

研究成果の概要（和文）：

下咽頭・食道扁平上皮癌の microRNA (miRNA) 発現プロファイルから、miR-218 が癌部で発現抑制されている事が認められた。そこで、miR-218 の機能解析を行い、miR-218 は、癌細胞の浸潤・遊走に關与する癌抑制型 miRNA である事が示された。更に、miR-218 が制御する標的遺伝子を探索した結果、Laminin-332 の構成タンパクの一つである LAMB3 を見出した。Laminin-332 は、細胞の基底膜を構成する主要なタンパク質の一種であり、細胞の接着、遊走、増殖に關与する報告がある。miR-218 の発現抑制による LAMB3 の発現異常は、ヒト扁平上皮癌の転移に大きく關与する事が示された。

研究成果の概要（英文）：

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding crNA molecules of 19-22 nucleotides that regulate protein-coding 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 several types of human cancer, and that they play significant roles in the initiation, progression and metastasis of human cancers. The results of the miRNA expression signatures of hypo-pharyngeal and esophageal squamous cell carcinoma indicated that *miR-218* was downregulated in cancer cells and suggested as a tumor suppressive miRNA. Gain-of-function assays demonstrated that *miR-218* inhibited cancer cell proliferation and invasion through targeting *LAMB3*. The *LAMB3* are an important and biologically active part of the basal lamina, influencing cell differentiation, migration, adhesion, proliferation, and survival.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：

(1) 頭頸部癌 (2) マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

下咽頭・食道扁平上皮癌の治療課題である局

所制御と臓器温存の更なる向上を図るために、手術療法・化学療法・放射線療法が開発され、治療成績の向上が認められている。しかしながら、これら癌の遠隔転移をきたした症例の予後は極めて不良であり、今後治療成績を更に向上させるためには、遠隔転移の制御が不可欠である。しかしながら、下咽頭・食道扁平上皮癌の遠隔転移の分子メカニズムは、いまだ十分に解明されていないのが現状である。

近年、種々のタンパクコード遺伝子 (mRNA) の発現調節に関わる RNA 分子として、タンパク質をコードしない機能性 RNA (non-coding RNA) の一つである microRNA (miRNA) が注目されている。miRNA は真核生物のゲノム中にコードされている内在性の遺伝子であり、最終的に 19~24 塩基長の低分子 RNA として機能している。miRNA は、配列特異的に mRNA を標的として、mRNA の分解やその翻訳を阻害する事で遺伝子の発現を制御している。現在、miRNA のデータベース上では、ヒトで 1,600 種類の前駆体 miRNA および 2,042 種類の成熟型 miRNA が登録されている。(miRBase Release19:<http://www.mirbase.org/>)。また、タンパクコード遺伝子の 30%以上がこれらの miRNA によって制御されている、と言う報告もある。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、このバランスの崩壊が癌を含むヒトの疾患に深く関与している事が推測される。

癌研究においては、これまでに癌細胞・癌組織で発現変動する miRNA の発現プロファイルの作成が精力的に行われてきた。miRNA の発現異常は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。癌細胞・癌組織で発現低下してい

る miRNA から、「癌抑制型 miRNA」が、発現亢進している miRNA から「癌遺伝子型 miRNA」が相次いで発見され、miRNA が癌の発生・進展・転移に深く関わっている事が示されている。

2. 研究の目的

これまでに我々は、下咽頭・食道扁平上皮癌の臨床検体を用いて miRNA の発現プロファイルを作成してきた。今回の研究では、癌部で発現低下していた miRNA の中から miR-218 に注目し、癌抑制機能の解析と、miR-218 が制御する標的遺伝子の探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) miR-218 の機能解析

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 miR-218 について、細胞増殖能、遊走能、浸潤能などの機能解析を試行した。下咽頭・食道扁平上皮癌細胞株に合成した成熟型 miR-218 を核酸導入し検討を行った。

(2) miR-218 の標的遺伝子の探索

miR-218 が制御する遺伝子の探索は、miR-218 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で行った。

(3) 臨床検体における発現確認

下咽頭・食道扁平上皮癌における miR-218 および標的遺伝子の発現を PCR 法を用いて確認した。

(4) 標的遺伝子の機能解析

更に、標的遺伝子の下咽頭・食道扁平上皮癌での機能を調べるために、siRNA を用いたノックダウンの実験を行った。

4. 研究成果

(1) 下咽頭・食道扁平上皮癌における

miR-218 の癌抑制機能の確認

これまでに我々は、下咽頭および食道扁平上皮癌の臨床検体を用いて microRNA (miRNA) の発現プロファイルを作成してきた。今回の研究では、癌部で発現低下していた miRNA の中から miR-218 に注目し癌細胞における機能解析を行った。miR-218 の発現が抑制されている下咽頭・食道扁平上皮癌細胞株 (FaDu 等) に miR-218 を導入すると、遊走能および浸潤能が著明に抑制される事が、遊走アッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイによって明らかになった。この事から miR-218 は癌の転移抑制に関わる癌抑制型 miRNA として機能してしている事が示唆された。

(2) miR-218 の標的遺伝子 Laminin-332 の同定

miRNA は標的遺伝子の mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に配列特異的に結合し、その翻訳を阻害する事で標的遺伝子の発現を負に制御している。また、一つの miRNA は複数の標的遺伝子を持つという特徴がある。本研究では、miR-218 を導入した細胞を用いたゲノム科学的な手法により、miR-218 の標的遺伝子群の探索を行った。これら遺伝子群に対して機能分類する事により、遊走・浸潤に関わる focal adhesion pathway に含まれる遺伝子群が重要である事が示唆された。興味深い事に miR-218 導入により発現低下した遺伝子群の中には laminin-332 を構成する全ての遺伝子 (LAMA3、LAMB3 および LAMC2) が含まれていた。Laminin-332 は、細胞の基底膜を構成する主要なタンパク質の一種であり、細胞の接着、遊走、増殖に関与する報告がある。そこで、本研究では、miR-218 の標的候補である

と考え、解析を進めた。

細胞株を用いて行った qRT-PCR およびウエスタンブロットの結果から、LAMA3、LAMB3 および LAMC2 の発現は miR-218 導入によって有意に抑制される事が明らかとなった。更に LAMB3 の 3' UTR に miR-218 が直接結合する事がルシフェラーゼアッセイで明らかとなった。

(3) 頭頸部扁平上皮癌臨床検体における

miR-218 および laminin-332 の発現

下咽頭・食道扁平上皮癌臨床検体 35 例を用いて miR-218 および laminin-332 (LAMA3、LAMB3 および LAMC2) の発現を qRT-PCR で測定した。正常組織に比べて癌部で miR-218 の発現が有意に低下している一方、LAMA3、LAMB3 および LAMC2 の発現は癌部で有意に上昇していた。miR-218 の発現は LAMA3、LAMB3 および LAMC2 の発現とそれぞれ負の相関関係を認めた。

(4) LAMB3 の下咽頭・食道扁平上皮癌における機能解析

頭頸部扁平上皮癌細胞株に si-LAMB3 を導入すると癌細胞の増殖、遊走および浸潤能が有意に抑制される事が明らかとなった。この結果は、LAMB3 が下咽頭・食道扁平上皮癌において癌遺伝子機能を有している事を示唆している。

以上の結果より、癌抑制 microRNA を基点とした癌分子ネットワークの描出により、下咽頭・食道扁平上皮癌の治療標的の探索が可能である事が示唆された。

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 7 件)

① Kinoshita T, Hanazawa T, Nohata N,

Kikkawa N, Enokida H, Yoshino H, Yamasaki T, Hidaka H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N.

Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through targeting laminin-332 in head and neck squamous cell carcinoma. 査読あり
Oncotarget. 2012 Nov;3(11):1386-400.

②Nohata 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.

③ Kikkawa 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4件)

①Naoko Kikkawa, Takashi Kinoshita, Nijiro Nohata, Toyoyuki Hanazawa, Hirofumi Yoshino, Hedeki Enokida, Masayuki Nakagawa, Yoshitaka Okamoto, Naohiko Seki
Tumor suppressive microRNA-375 regulates molecular targets in head and neck squamous cell carcinoma
第71回日本癌学会 (平成24年9月19・20日 ロイトン札幌 札幌)

②吉川直子、花澤豊行、野畑二次郎、木下崇、鈴木誉、茶藪英明、櫻井大樹、岡本美孝、関直彦
癌抑制型 microRNA-375 が制御する頭頸部扁平上皮癌の新規分子ネットワークの解明
第36回 日本頭頸部癌学会学術講演会 (平成24年6月7・8日 島根県民会館 島根)

③吉川直子、花澤豊行、野畑二次郎、ムラディルムラリフ、鈴木誉、茶藪英明、櫻井大樹、佐々木慶太、岡本美孝、関直彦
頭頸部扁平上皮癌における microRNA-1 の癌抑制機能と新規分子ネットワークの解明
第35回 日本頭頸部癌学会 (平成23年6月9日・10日 ウィンクあいち 名古屋)

④吉川直子、花澤豊行、野畑二次郎、鈴木誉、茶藪英明、櫻井大樹、堀口茂俊、岡本美孝
下咽頭癌における癌抑制マイクロRNAの探索
第112回 日本耳鼻咽喉科学会 (平成23年

5月19日20日21日 国立京都国際会館 京都)

〔その他〕
ホームページ等
<http://genome.jet.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 直子 (KIKKAWA NAOKO)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50400924