

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791801

研究課題名(和文) マイクロRNAによる頭頸部癌転移のリスク診断の試み

研究課題名(英文) Role of miR-200c/miR-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

玉川 俊次 (TAMAGAWA, SHUNJI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40543781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が浸潤・転移する際のプロセスの一つとして上皮間葉移行が報告されている。上皮間葉移行は癌の浸潤・転移と深く関わり、細胞接着因子であるE-Cadherinの発現低下は癌細胞が上皮細胞の性質を失う主な過程の一つとされている。

本研究では、頭頸部癌細胞株においてmicroRNA141/200cと細胞間接着因子であるE-Cadherinの発現との関係を示した。頭頸部癌細胞株にmicroRNA141/200cを導入し、上皮間葉移行関連遺伝子の変化、細胞機能の変化について検討した。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal-transition (EMT) is a critical step in tumor invasion and metastasis, while its fate is mainly defined by the balanced expression between the miR-200 family and ZEB transcription factors.

In this study, we observed a reciprocal correlation between miR-200c/mir-141 and ZEB1, as well as between ZEB2 and E-cadherin expression in a panel of 13 head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. We also confirmed that the enforced expression of miR-200c and miR-141 significantly reduced the migration capacity of HNSCC cells.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 転移 microRNA

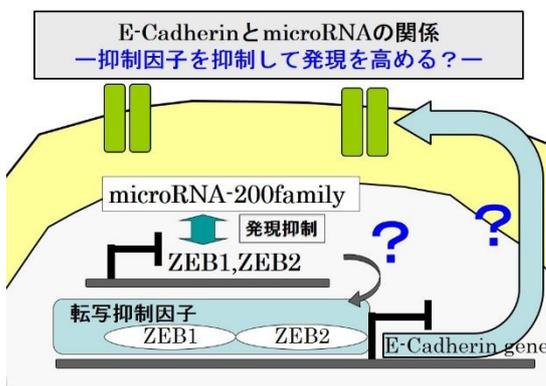
1. 研究開始当初の背景

近年、18~25塩基の蛋白をコードしない低分子量 RNA(microRNA)が発見された。microRNAは標的メッセンジャーRNAの3'非翻訳領域に結合し、「ファインチューナー」として分化、増殖、アポトーシスなど遺伝子発現をさまざまな形で調整することが分かってきた。microRNA発現異常が癌の発現、浸潤、転移と関連することが次々と報告されており、microRNAを癌の治療・診断へ応用しようとする動きが世界中で活発化している。

前立腺癌や乳癌の細胞株を用いた研究では、microRNA200familyはE-Cadherinの転写抑制因子であるZEB1、ZEB2の発現を抑制し、転写抑制因子が抑制されることでE-Cadherinの発現を亢進させることが報告されている。しかし、頭頸部癌においてはmicroRNA200familyとZEB1、ZEB2、E-Cadherinの関係については十分明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は頭頸部癌細胞株を用いて、上皮間葉移行；EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)におけるmicroRNA200familyの役割を明らかにすることである。EMTの中でも細胞間接着因子であるE-Cadherin及びE-Cadherinの転写抑制因子であるZEB1、ZEB2について着目し、頭頸部癌細胞株におけるmicroRNA200familyとE-Cadherin、ZEB1、ZEB2との関係について検討を行った。また、microRNA200familyを頭頸部癌細胞株に導入することで引き起こされる運動能、浸潤能、増殖能などの細胞機能の変化についても検討した。さらに、microRNA200familyの発現を亢進させてもE-Cadherin、ZEB1、ZEB2の発現に影響を認めない細胞株を認めたことからZEB1、ZEB2のメチル化についても検討した。



3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌細胞株(UTSCC)における

E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現量の検討

頭頸部癌細胞株(UTSCC series)におけるE-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現について検討した。細胞株を96wellのプレートで培養し、コンフルエンスが70%に達した時点でRNAの抽出、逆転写を行い、cDNAを合成した。リアルタイムPCR(Ct法)を用いてE-Cadherin、ZEB1、ZEB2の発現を比較検討した。比較的E-Cadherinの発現が低く、安定して培養が容易な細胞株であるUTSCC-60Aを基準株として用い検量線を作成した。

(2) 頭頸部癌細胞株(UTSCC series)におけるE-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子とmicroRNA200c/141発現の検討

頭頸部癌細胞株(UTSCC series)におけるE-Cadherin、ZEB1、ZEB2とmicroRNA200c/141の発現について比較した。1と同様にUTSCCシリーズ細胞株(計13株)を培養し、リアルタイムPCR(Ct法)を用いてE-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子とmicroRNA200c/141の発現を比較検討した。

**頭頸部癌細胞株における  
microRNA200familyと転移関連遺伝子の発現**

細胞株の名前	原発部位	部位	転移
UTSCC-6A	喉頭	喉頭	当発
UTSCC-6B	声門上	喉頭	転移
UTSCC-9	声門	喉頭	当発
UTSCC-16B	舌	頸部	転移
UTSCC-24A	舌	舌	当発
UTSCC-24B	舌	頸部	転移
UTSCC-54C	喉結核	喉部	転移
UTSCC-60A	扁桃	扁桃	当発
UTSCC-60B	扁桃	喉部	転移
UTSCC-74A	舌	舌	当発
UTSCC-90	舌	舌	当発
UTSCC-110A	舌根	上顎	当発
OKK-M	上顎癌		転移

UTSCC-series of cell lines established by Professor Reidar Grénman, University of Turku, Finland (Grénman, Burk et al. 1989; Pekkola-Heino, Jaakkola et al. 1995).

RNA抽出  
cDNA合成

**E-Cadherin、ZEB1、ZEB2  
microRNA 141 200cの発現を評価**

ハウスキーピング遺伝子(UTSCC-60A standard curve)  
mRNA: GAPDH      microRNA: RNU6B

(3) microRNA141/200cのトランスフェクションによるE-Cadherin、ZEB1、ZEB2の発現変化の検討

成長が早く安定して培養可能である舌癌原発巣から樹立された細胞株 UTSCC-24A、転移巣から樹立された細胞株 UTSCC-24B を24時間培養し、microRNA141/200c Precursorをトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に逆転写を行い、リアルタイムPCRを用いてE-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現変化を検討した。

**microRNA200familyの  
トランスフェクションによる遺伝子発現の変化**

UTSCC細胞株  
コンフルエンス70%まで培養

トランスフェクション

トランスフェクション試薬  
siPORT Amine (Ambion)

Pre-mi<sup>TM</sup> miRNA Precursor  
Molecule (Ambion)

ネガティブコントロール  
Pre-mi<sup>TM</sup> miRNA Precursor  
Negative Control (Ambion)

48時間後

RNA抽出  
cDNA合成

Real time PCRで遺伝子発現の変化を調べた

(4) microRNA141/200c のトランスフェクションによる頭頸部癌細胞株の細胞運動能、浸潤能、増殖能の変化

UTSCC-24B を 24well のプレートで培養し microRNA141/200c Precursor をトランスフェクション後、wound assay、migration assay、invasion assay、Wst assay を行い細胞の運動能、浸潤能、増殖能の変化を検討した。

(5) 頭頸部癌細胞株における ZEB1、ZEB2 遺伝子のメチル化の検討

microRNA141/200c Precursor のトランスフェクション実験にて microRNA141/200c の発現を亢進させるも E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 の発現に影響を受けない細胞株 (UTSCC-60A、UTSCC-60B) が存在することが明らかとなった。UTSCC-60A、UTSCC-60B をそれぞれ 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-dC) にて脱メチル化処理し E-Cadherin、ZEB1、ZEB2、microRNA200c/141 の発現変化について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 頭頸部癌細胞株における E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現量の検討 (付図 1)

頭頸部癌細胞株 (UTSCC series) の内 9/13 株では、基準株とした UTSCC60A と比較して E-Cadherin の発現が高く ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現は低下していた。残りの 3 株では E-Cadherin の発現は低く、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現が高かった。

図 1

頭頸部癌細胞株 (UTSCC) における E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現量の検討

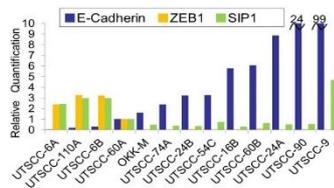


図 1 頭頸部癌細胞株 (UTSCC series) における E-Cadherin、ZEB1 and ZEB2 の mRNA 発現

(2) 頭頸部癌細胞株における E-Cadherin、

図 2

頭頸部癌細胞株 (UTSCC series) における E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 遺伝子と microRNA200c/141 発現の検討

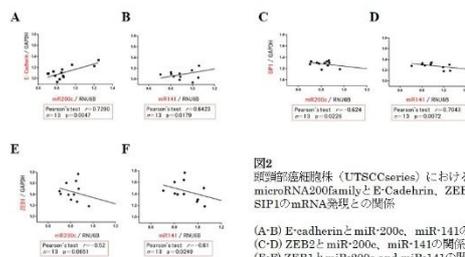


図 2 頭頸部癌細胞株 (UTSCC series) における microRNA200 family と E-Cadherin、ZEB1、SIP1 の mRNA 発現との関係

(A-B) E-cadherin と miR-200c、miR-141 の関係 (C-D) ZEB2 と miR-200c、miR-141 の関係 (E-F) ZEB1 と miR-200c と miR-141 の関係

ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現と microRNA200c/141 の発現の検討 (付図 2)

E-Cadherin と microRNA141 及び microRNA200c の発現には正の相関関係を認めた。一方、ZEB1、ZEB2 と microRNA141 及び microRNA200c の発現には負の相関関係を認めた。

(3) microRNA141/200c のトランスフェクションによる E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 の発現変化の検討 (付図 3)

UTSCC24A、UTSCC24B への microRNA141/200c Precursor のトランスフェクションにて、ZEB1 の発現は低下し、E-Cadherin の発現が亢進した。ZEB2 の発現には変化を認めなかった。

図 3

microRNA141/200c のトランスフェクションによる E-Cadherin、ZEB1、ZEB2 の発現変化の検討

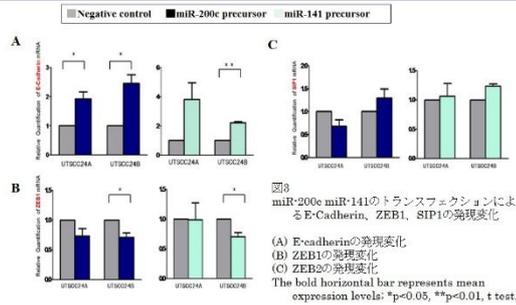


図 3 miR-200c miR-141 のトランスフェクションによる E-Cadherin、ZEB1、SIP1 の発現変化

(A) E-cadherin の発現変化 (B) ZEB1 の発現変化 (C) ZEB2 の発現変化 The bold horizontal bar represents mean expression levels; \*p<0.05, \*\*p<0.01, †t test.

(4) microRNA141/200c のトランスフェクションによる頭頸部癌細胞株の細胞運動能、浸潤能、増殖能の変化 (付図 5)

UTSCC24B への microRNA141/200c Precursor のトランスフェクションにて、wound healing、migration は低下し細胞の運動能低下を認めたが、浸潤能、増殖能に関しては変化を認めなかった。

図 4

microRNA141/200c のトランスフェクションによる頭頸部癌細胞株の運動能、浸潤能、増殖能の変化

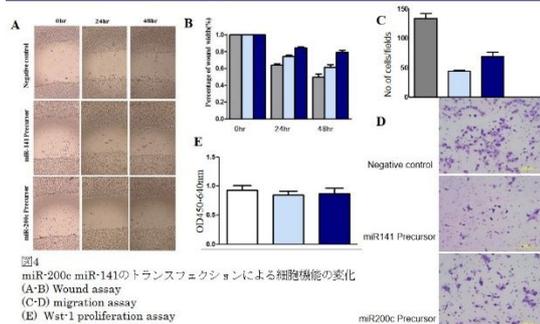


図 4 miR-200c miR-141 のトランスフェクションによる細胞機能の変化 (A-B) Wound assay (C-D) migration assay (E) Wst-1 proliferation assay

(5) 頭頸部癌細胞株における ZEB1、ZEB2 遺伝子のメチル化の検討 (付図 6)

UTSCC60A、UTSCC60B に脱メチル化処理を行うことで ZEB1、ZEB2 の発現は著明に亢進したが、microRNA141/200c は変化を認めなかった。

図5 頭頸部癌細胞株におけるZEB1、ZEB2遺伝子のメチル化の検討

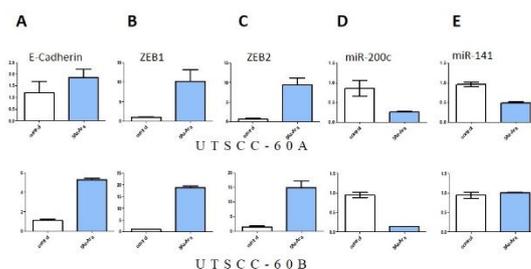


図5 UTSCC60A、UTSCC60Bの細胞株に5-Aza-CdRにて脱メチル化処理を行った後の発現変化 (A)E-cadherin, (B) ZEB1, (C) ZEB2, (D) miR-200c (E) miR-141

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1件) 査読あり

Shunji Tamagawa, Levent Bekir Beder, Muneki Hotomi, Mehmet Gunduz, Kazuya Yata, Reidar Grenman, Noboru Yamanaka  
International Journal of Molecular Medicine  
2014 Apr;33(4):879-86

Role of miR-200c/miR-141 in the regulation of epithelial-mesenchymal transition and migration in head and neck squamous cell carcinoma

〔学会発表〕(計3件)

頭頸部癌細胞株における microRNA200family の役割  
玉川俊次 矢田和弥 山内一真  
戸川彰久 保富宗城 山中昇  
頭頸部癌学会  
2014/6/13 東京

頭頸部癌細胞における上皮間葉移行と microRNA200family  
玉川俊次 矢田和弥 山内一真  
戸川彰久 保富宗城 山中昇  
第114回 日本耳鼻咽喉科学会総会  
2013/12/11-13 札幌

頭頸部癌細胞株における microRNA200family と転移機能について  
玉川俊次 矢田和弥 山内一真

戸川彰久 保富宗城 山中昇  
第113回 日本耳鼻咽喉科学会総会  
2013/5/18 新潟

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
玉川 俊次 (Tamagawa Shunji)  
和歌山県立医科大学 医学部・助教  
研究者番号: 40543781

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号: