

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870716

研究課題名(和文) 肺癌細胞における miR-375 の浸潤能促進の機序解明

研究課題名(英文) How does miR-375 promote invasion in non-small-cell lung cancer?

研究代表者

依田 聡 (Yoda, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30468491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞の中で遺伝子の働きを調整する microRNA についての研究で、そのうちの一つの miR-375 が非小細胞肺癌の細胞で、Claudin-1 という遺伝子の働きを調整していること発見した。また、miR-375 が強く働くと細胞がより動き回るようになることと miR-375 の働きが強い非小細胞肺癌の患者さんで生存期間が短かったことを報告し、miR-375 が癌の転移に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study was performed concerning microRNAs which regulate the function of genes. We discovered that miR-375, one of microRNAs, regulates the gene named Claudin-1 in non-small cell lung cancer cells. We also reported that stronger expression of miR-375 was related to faster movement of cells and lung cancer patients with stronger expression of miR-375 had shorter survivals. It suggested that miR-375 is involved in metastasis of cancers.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 micro RNA

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦および世界において癌死亡の第1位でありさらに増加傾向にある。種々の治療法の進歩にもかかわらず肺癌の平均5年生存率は15%以下であり、治療の新たな標的となる分子生物学的特徴を解明することが求められている。microRNA (miRNA) は19~22塩基程度の non-coding RNA の一種で、発生、分化、apoptosis を含む様々な生物学的な機序に関わることが知られている。miRNA は標的遺伝子の3'非翻訳領域(3'UTR)に部分相補的に結合し、主に翻訳を抑制することによって、標的遺伝子の発現を抑制する。また、miRNA が、2~8塩基の seed 配列で標的遺伝子を認識するため、1つのmiRNA が複数の標的遺伝子を持ち、臓器、細胞の種類によって主たる標的遺伝子が異なることが知られている。そして、癌においても、多くのmiRNA が癌遺伝子もしくは癌抑制遺伝子として機能していることが知られ、その重要性は広く認識されている。

今回、我々が注目した miR-375 は、いくつかの癌種で癌抑制遺伝子として報告されているが、別のいくつかの癌種では転移促進遺伝子である可能性を示唆する報告がある。頭頸部扁平上皮癌では miR-375 が AEG-1 を標的遺伝子として細胞増殖を抑制し、(Nohata N et al, J Hum Genet. 2011)、miR-375 低発現群で予後が悪かったと報告されている (Harris T et al, Am J Pathol. 2012)。食道癌では insulin-like growth factor 1 receptor を標的遺伝子として細胞増殖を抑制し、miR-375 低発現群で予後が悪かったと報告されている (Kong KL et al, Gut. 2012)。他にも、胃癌、肝細胞癌などで報告があるが、標的遺伝子は多数に及ぶ。一方で、末梢血中の miRNA を測定する方法で、転移のある乳癌 (Madhavan D et al, Clin Cancer Res. 2012) や転移のある前立腺癌 (Nguyen HC et al, Prostate. 2012) の患者の末梢血で miR-375 の発現が上昇している報告がある。また、胃癌では手術後の再発群で非再発群と比べて miR-375 の発現が高かったという報告がある (Zhang X et al, Ann Oncol. 2011)。これらの癌種では、miR-375 は癌抑制遺伝子ではなく、転移を促進する機能を持っている可能性があるが、その機序は明らかにされていない。肺癌に関する miR-375 の報告としては、小細胞癌と大細胞神経内分泌癌を合わせた神経内分泌への分化を誘導するという報告がある (Nishikawa E et al, Cancer Res. 2011)。その報告では、miR-375 は ASH1 の下流にあり、YAP1 の発現を直接抑制することによって、神経内分泌への分化を誘導する機能があることが明らかにされている。しかし、肺癌の多くを占める腺癌、扁平上皮癌における miR-375 の機能は依然としてわかっていない。

当初、我々は肺癌においても、miR-375 が癌抑制遺伝子としての機能を持つ可能性が

あると考え、肺癌細胞株に miR-375 を過剰発現させ、細胞の増殖能が低下するかを調べた。しかし、報告された胃癌細胞株 (Tsukamoto Y et al, Cancer Res. 2010) と同時に比較しても、胃癌細胞株と異なり、肺癌細胞株では増殖能の低下は見られなかった。そこで、miR-375 を過剰発現させた肺癌細胞株の浸潤能を検証したところ、肺扁平上皮癌由来細胞の SK-MES-1 において、miR-375 の過剰発現で浸潤能が促進されていることを発見した。

さらに手術で得られた肺癌の臨床検体における miRNA microarray での我々の検討では、miR-375 高発現群で予後が悪かった。すなわち肺癌においては、miR-375 が癌抑制遺伝子としては機能していないことを示唆し、逆に浸潤能、転移を促進する機能を持つ可能性を後押しすると考えられる。

miR-375 の既報の標的遺伝子の多くは細胞増殖に働く遺伝子であり、miR-375 の過剰発現が浸潤能を促進する機序とは合致しないため、新たな標的遺伝子が関係する可能性を考え、TargetScan database を用いて miR-375 の標的遺伝子の候補を再抽出した。それらのうち、さらに浸潤能を抑制する機能を持つ遺伝子を抽出し、Claudin-1 (CLDN1) に注目するに至った。CLDN1 は、4つの膜貫通ドメインを持ち、Occludin などとタイトジャンクション複合体を構成する。肺癌では転移抑制遺伝子としての機能があり、低発現群で予後が悪かったという報告がある (Chao YC et al, Am J Respir Crit Care Med. 2009)。CLDN1 の3'UTRには、miR-375 が相補的に結合する配列が4箇所含まれていた。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌において、miR-375 の新たな標的遺伝子として CLDN1 を同定し、さらに CLDN1 の発現抑制を通して、細胞遊走能を抑制することを証明する。

3. 研究の方法

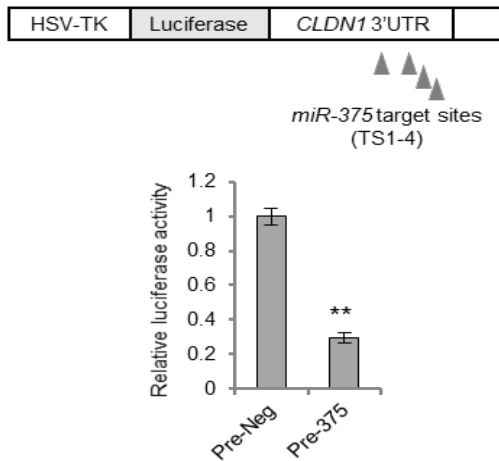
最初に、miR-375 の標的遺伝子の候補を、予測データベースや扁平上皮癌と腺癌との間で発現の異なる遺伝子に関する報告から決定した。次に、12種の肺癌細胞株を用いて、miR-375 と標的遺伝子の発現を評価し、miR-375 前駆体やインヒビターを用いて、miR-375 の過剰発現とノックダウンが肺癌細胞株に与える影響を検討した。また、miR-375 と標的遺伝子の直接の作用を確認するために、ルシフェラーゼリポーターアッセイを行った。加えて、SK-MES-1 細胞を用いて創傷治癒アッセイを行い、miR-375 の過剰発現が細胞遊走能に与える影響を評価した。最後に、63症例の非小細胞肺癌の臨床検体を用いて、miR-375 と標的遺伝子の発現、また miR-375 の発現と生存期間との関係を検討した。

4. 研究成果

miRNA の標的遺伝子データベースから、miR-375 の標的遺伝子の候補をあげ、miR-375 と逆に肺の扁平上皮癌で発現が高く、腺癌で発現が低い遺伝子として、CLDN1 を見出した。CLDN1 は、3' UTR に 4 個の miR-375 の標的配列を含むタイトジャンクション形成に関わる遺伝子である。

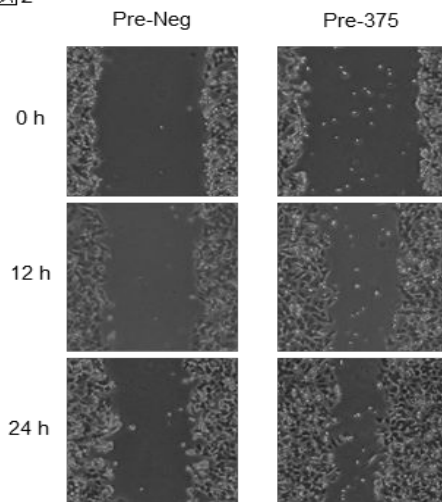
次に、6 種類の肺癌細胞株を用いて、CLDN1 のメッセンジャーRNA およびタンパク質が、miR-375 の過剰発現によって抑制され、miR-375 のノックダウンによって増加することを示した。ルシフェラーゼリポーターアッセイでは、miR-375 の過剰発現によって、CLDN1 の 3' 非翻訳領域を含むベクターのルシフェラーゼ活性が 3 分の 1 まで抑制された ($P < 0.001$, 図 1)。また、miR-375 の標的配列に 4 つの点変異を導入するとルシフェラーゼ活性が回復することを示し、抑制が配列特異的であることの裏付けとした。

図 1



SK-MES-1 細胞を用いた創傷治癒アッセイでは miR-375 の過剰発現によって細胞遊走能が促進した (図 2)。しかし、CLDN1 のノックダウンを用いた同様のアッセイでは、細胞遊走能が促進しなかったため、miR-375 が

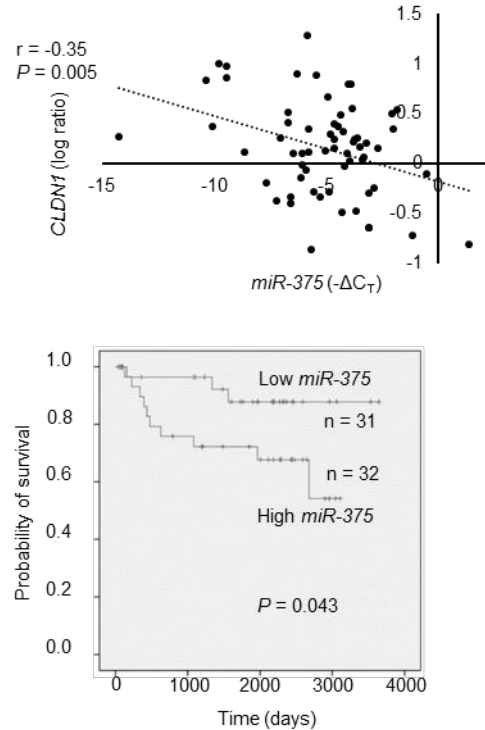
図 2



CLDN1 の発現抑制を通じて、細胞遊走能を促進することは十分に示されなかった。

非小細胞肺癌の臨床検体を用いた検討では、miR-375 と CLDN1 の発現に負の相関がみられ ($r = -0.35$, $P = 0.005$, 図 3 上) また、miR-375 高発現群で生存期間が有意に短かった ($P = 0.043$, 図 3 下)。

図 3



結論として、CLDN1 は非小細胞肺癌における miR-375 の新規標的遺伝子であることが示された。また、非小細胞肺癌症例で、miR-375 高発現群の生存期間は有意に短く、miR-375 高発現の非小細胞癌が浸潤や転移を起こしやすくなる可能性が示唆された。

本報告は、非小細胞癌における miR-375 の標的遺伝子を報告した最初の報告となった。一方で、非小細胞肺癌の予後と miR-375 の関係では、2012 年の報告があり、miR-375 低発現で予後が悪くなるとされており、本報告と逆の結果であった (Li Y et al, Int Med Res. 2012)。現在まで予後に関する追加の報告や非小細胞肺癌における miR-375 の働きに関して追加の報告はなく、2 つの研究で結果が逆となった要因ははっきりしていない。また、本報告では、miR-375 の過剰発現が細胞遊走を促進する機序として、CLDN1 の発現抑制だけでは不十分であるという結論であった。他の標的遺伝子の関与も含めたさらなる検討が必要である。しかし、細胞を用いた研究と臨床検体、症例の臨床的背景、予後を含めた検証を同時に行ったものとして、有意義な研究であり、肺癌分野での代表的である Lung Cancer 誌に掲載され、また 2014 年米国癌学会 (AACR annual meeting) で演題として採用された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yoda S, Soejima K, Hamamoto J, Yasuda H, Nakayama S, Satomi R, Terai H, Ikemura S, Sato T, Naoki K, Betsuyaku T. Claudin-1 is a novel target of miR-375 in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer, 査読有, Elsevier, 85: 366-72. 2014
DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.06.009.

〔学会発表〕(計1件)

Yoda S, Soejima K, Yasuda H, Sato T, Arai D, Ohgino K, Ishioka K, Tani T, Oashi A, Kuroda A, Nishino M, Miyawaki M, Hamamoto J, Naoki K, Betsuyaku T. Claudin-1, a novel target of miR-375 in non-small cell lung cancer. AACR annual meeting, 5195, San Diego, USA, 9th Apr 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

依田 聡 (YODA, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30468491