

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861368

研究課題名(和文) H19およびmiR-675による頭頸部癌早期発見法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a method for early detection of head and neck cancer by evaluation of H19 gene.

研究代表者

岡村 純 (Okamura, Jun)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：00402305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：H19遺伝子はタンパク合成を伴わない non-coding RNAであり発癌に関する報告でH19は当初癌抑制遺伝子として報告されたが、その発癌にいたる機構や調節機構については未だに明確になっていない。今回我々はNEFH低発現細胞ではH19が高発現となっておりH19をノックダウンすることにより細胞増殖が抑制される。H19とNEFH発現には負の相関がある。NEFHはH19の発現を制御している。食道癌および頭頸部癌細胞株でH19高発現を認め、頭頸部癌細胞、食道癌細胞においてH19は癌遺伝子として機能し、NEFHは癌抑制遺伝子として機能する。以上が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：H19 is an imprinted gene and has maternal monoallelic expression. H19 was first described as a tumor suppressor, but more recent studies show that H19 expression is reactivated in human cancer. However, the role and biological significance of H19 in esophageal cancer and head and neck cancer remain unexplored. We have reported that: Increase of H19 in NEFH-deficient cells. H19 knockdown in NEFH-deficient cells decreased the cell growth. H19 may function as an oncogene in NEFH-loss mediated esophageal cancer and head and neck cancer.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 H19 NEFH

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は我が国では全がんの5%を占め、手術療法、化学療法、放射線療法など数々の治療法が開発、改良されてきたが未だにその予後は不良である。特に下咽頭癌や中咽頭癌、口腔癌の扁平上皮癌は非常に進行が早く、その発癌の機序は依然として多くは明らかになっていない。

H19 遺伝子はヒトでは 11p15.5 上に位置する母方由来の遺伝子で、父方由来の Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) とともに刷り込み遺伝子として知られており、細胞質に存在する。タンパク合成を伴わない non-coding RNA であり、多くは胎生期や生後初期の組織で発現している。通常一部の再生中の組織や分化中の組織で発現を認めるのみで、成人のほとんどの組織では発現していない。IGF2/H19 の刷り込み機構の欠損は胎生癌や Beckwith-Wiedmann Syndrome など発生に関与する病態との関連が今まで報告されてきている。

発癌に関する報告で H19 は当初癌抑制遺伝子として報告されたが最近では H19 の再活性化がヒトの乳癌、肺癌、子宮頸癌、膀胱癌で認められたとする研究報告があり、癌遺伝子として認識されている。だが、その発癌にいたる機構や調節機構については未だに明確になっていない。

近年マイクロ RNA と呼ばれる細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの non-coding RNA が注目され、他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられており数々のマイクロ RNA が報告されている。micro RNA 675 (miR-675) の塩基配列が H19 のヘアピン構造内に含まれており、RNA スプライシング機構により H19 が miR-675 を放出する可能性が報告されている (文献 1)。我々は H19 が miR-675 を介することによって癌遺伝子としての機能を発現する可能性が高いと考えた。



H19 のヘアピン構造および内在する miR675 の塩基構造 (文献 1)

NEFH(neurofilament heavy polypeptide) 遺伝子は癌抑制遺伝子として報告があり、筆者の所属していたグループにおいて食道癌細胞株に NEFH を導入することで細胞株の増殖を抑制することが報告された (文献 2)。

また、食道癌細胞株 KYSE30 の NEFH をノックダウンした stable clone (N12, N20) と control clone (C2) を樹立しマウスへのそれぞれ移植し、NEFH ノックダウンにより食道癌が増殖促進をきたすことを示唆した (図 1)。

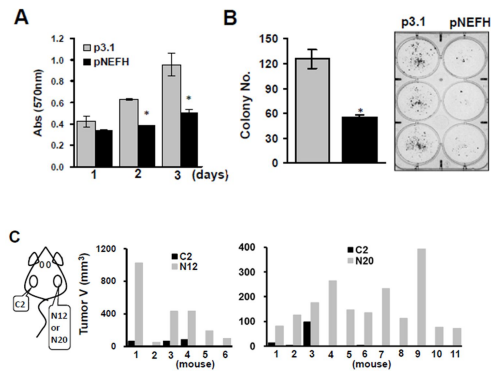


図 1: NEFH 導入により食道癌細胞株の増殖が抑制される。マウスに移植された NEFH ノックダウン細胞は増殖がコントロールに比べ有意に早い (文献 1)。

【H19 は NEFH ノックダウン食道癌細胞で高発現となっている】

我々はこの N20 および C2 より抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ NEFH がノックダウンされた細胞では H19 が著明に高発現していた (Fold-Change :49.3)。このことにより H19 と NEFH に何らかの関係があると考えた (図 2)。

Gene	Gene Title	Fold-Change
H19	H19, imprinted maternally expressed transcript	49.3027
IGF2	insulin-like growth factor 2	1.0356
NEFH	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	-5.73584

Fold-change in N20 vs. C2.

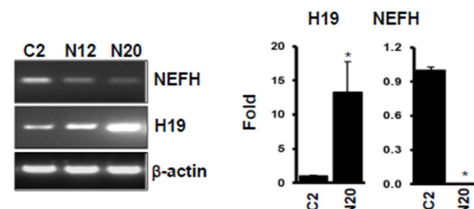


図 2 マイクロアレイ解析および validation. NEFH ノックダウン食道癌細胞では H19 が高発現となっている。

2. 研究の目的

- (1) 食道癌細胞および頭頸部癌細胞における H19 と NEFH の関係を明らかにする。
- (2) 食道癌および頭頸部癌において H19 が発現しているか、癌遺伝子として機能するかどうかを確認する。

3. 研究の方法

- (1) RT-PCR, qRT-PCR にて食道癌細胞および頭頸部癌細胞における H19 と NEFH の発現を確認しその関係を見る。
- (2) それぞれの遺伝子をノックダウンおよび遺伝子導入し機能解析を行う。細胞の増殖能を MTT アッセイにて評価する。

4. 研究成果

【食道癌および頭頸部癌細胞株でH19発現を認める】

食道癌各細胞株において RT-PCR 法をおこなったところ、11 種類の食道癌細胞株のほとんどで H19 の発現を認めた。頭頸部癌細胞では 8 種類中 3 種類で H19 発現を認めた(図 3)。

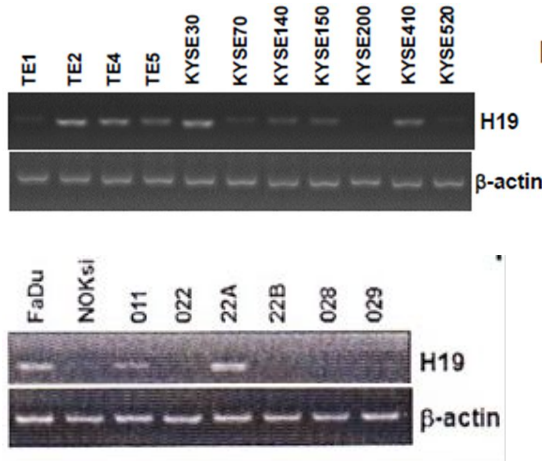


図 3 上段：食道癌細胞株 下段：頭頸部癌細胞株 における H19 の発現

【H19 と NEFH 発現には負の相関がある】

ヒト胎児腎細胞 (HEK293) では NEFH が食道癌細胞 (KYSE30) と比べ NEFH が高発現であったが H19 は低発現となっていた。非癌細胞であるヒト食道由来 Het1A 細胞においては H19 が高発現となっており、NEFH が低発現となっていた(図 4)。これらの結果より H19 と NEFH の間には負の相関があることが示唆された。

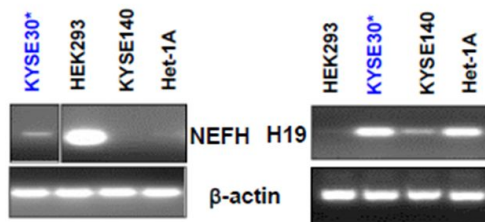


図 4 Het-1A および KYSE30 では H19 高発現、NEFH 低発現、HEK293 ではその逆の結果となった。

【NEFH は H19 の発現を制御している】

NEFH 高発現であった HEK293 細胞の NEFH をノックダウンすると H19 が高発現となった。また NEFH 低発現だった Het-1A および KYSE140 に NEFH を導入すると両細胞ともに H19 が高発現となり(図 5)。これらの結果は NEFH が H19 の発現を制御していることを支持している。

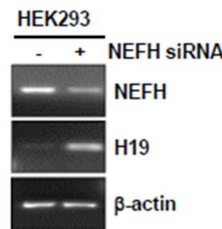


図 5 NEFH ノックダウンにより H19 高発現、NEFH 導入により H19 が低発現となった。

また頭頸部癌細胞株 FaDu や O11 においても NEFH 導入で H19 の低発現化を認めた(図 6)。

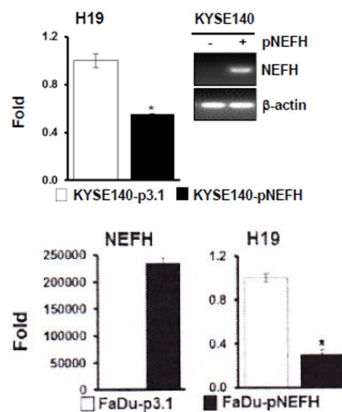


図 6

【H19 は細胞増殖を促進させる】

Het-1A 細胞および H19 ノックダウン Het-1A 細胞の細胞増殖を MTT アッセイおよび Calcein-AM アッセイにて 6 日間評価した。H19 ノックダウン細胞において有意に細胞増殖が抑制されていることを観察できた(図 7)。

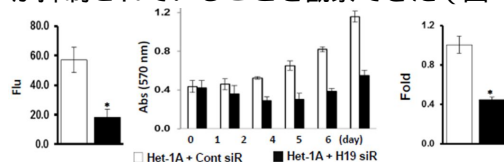


図 7

また、H19 高発現である N20 細胞をノックダウンしコロニー形成アッセイを行った。H19 のノックダウンによりコロニー形成能の低下を認めた(図 8)。

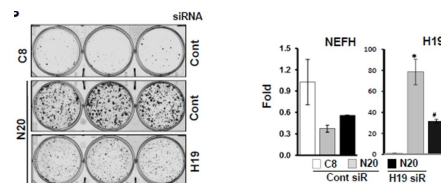


図 8

【頭頸部癌細胞、食道癌細胞において H19 は癌遺伝子として機能し、NEFH は癌抑制遺伝子として機能する】

食道癌細胞 KYSE150 および TE2 の H19 をノックダウンした場合も 12 日間の観察でコロニー形成能の有意な低下を認めた(図9)。さらに頭頸部癌細胞 FaDu に NEFH を導入したところ H19 が低発現化し(図6)、コロニー形成能も有意な低下を認めた(図9)。

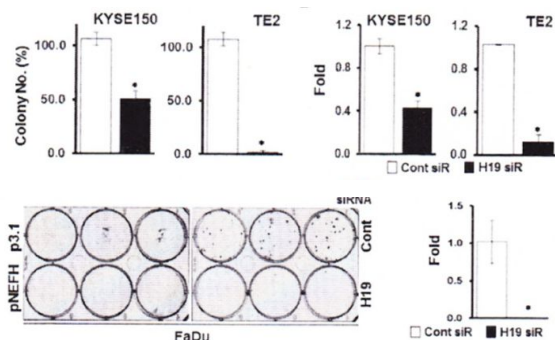


図9

以上の結果より、頭頸部癌細胞および食道癌細胞において H19 は癌遺伝子として機能し NEFH は癌抑制遺伝子として機能することが示唆された。

H19 は最初に癌抑制遺伝子をして報告されていたが近年ヒトにおいて癌遺伝子として機能すると報告されている。また H19 が食道癌において低発現となることは報告されているが頭頸部癌においての報告はなく、また、どのように発癌にかかわっているかは報告がほとんどなかった。

今回

1. NEFH 低発現細胞では H19 が高発現となっており H19 をノックダウンすることにより細胞増殖が抑制される。
2. 食道癌および頭頸部癌細胞株で H19 高発現を認める。
3. H19 と NEFH 発現には負の相関がある。
4. NEFH は H19 の発現を制御している。
5. 頭頸部癌細胞、食道癌細胞において H19 は癌遺伝子として機能し、NEFH は癌抑制遺伝子として機能する。

以上が明らかとなった。

引用文献

1. Tsang WP, Ng EK, Ng SS, et al. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2010
2. Kim MS, Chang X, LeBron C, et al. Neurofilament heavy polypeptide regulates the Akt-beta-catenin pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *PlosOne* 2010

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 純 (OKAMURA, Jun)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00402305