

論 文 要 旨

Regulation of MMP13 by antitumor microRNA-375 markedly inhibits cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌において、腫瘍抑制性 microRNA-375 は
MMP13 を制御し腫瘍細胞の遊走能・浸潤能を著明に抑制する。

大迫 祐作

【序論および目的】

集学的治療が進歩してきたが、食道扁平上皮癌患者の予後はいまだ不良である。最近、分子標的治療が発展してきているが、食道扁平上皮癌においてはその効果は十分に得られていない。食道癌患者の予後改善のためには、遺伝学的なアプローチによる食道癌の分子病態学的解明が必要である。

microRNA はタンパクをコードしない小分子 RNA の一種で、標的 RNA に塩基配列依存性に結合し、翻訳の抑制や分解をすることでその機能を調節している。近年、microRNA の発現異常による RNA ネットワークの破綻が、食道癌を含む様々な癌で報告されている。microRNA の発現解析を通して、腫瘍抑制性 microRNA およびその制御する癌分子経路を明らかにすることで、癌における分子病態の解明が可能である。

これまでに報告されている microRNA 発現解析によると、microRNA-375 (miR-375) の発現は扁平上皮癌では抑制されている。さらに、miR-375 の過剰発現によって、癌の悪性を抑制させることが明らかとなっている。このことから、食道扁平上皮癌において miR-375 が癌遺伝子を標的にすることで腫瘍抑制性の役割を持っていることが示唆される。miR-375 を媒介する癌の分子経路は、発癌や癌の進展に関して重要と考えられ、本研究では、食道扁平上皮癌で miR-375 の制御する新規の分子経路を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

前治療のない食道扁平上皮癌切除 25 例を対象とした。細胞実験には食道扁平上皮癌細胞株 TE-8、TE-9 を用いた。

- ① PCR 法を用いて食道扁平上皮癌臨床検体の癌部、正常上皮および食道扁平上皮癌細胞株の miR-375 発現を検討した。
- ② precursor miR-375 を核酸導入した細胞株を用いて増殖能・遊走能・浸潤能アッセイを行い、癌細胞における miR-375 の機能を検討した。
- ③ ②の機序を明らかにするため、miR-375 の標的遺伝子を検索した。miR-375 を核酸導入した細胞株の遺伝子発現解析を行い、さらに miR-375 の結合可能な配列をもつ mRNA を in silico 解析により特定した。
- ④ 特定した標的遺伝子・タンパクの臨床検体での発現を PCR 法、免疫組織化学染色を用いて検討した。
- ⑤ 特定した遺伝子が miR-375 に制御されていることを証明するため、miR-375 を核酸導入した細胞株を用いて標的遺伝子・タンパクの発現を PCR 法および western blotting で確認した。さらに、塩基配列依存性の制御を確認するため、Lusiferase reporter assay を行った。

- ⑥ si-RNA で標的遺伝子の発現を knockdown した細胞株を用いて増殖能・遊走能・浸潤能アッセイを行い、標的遺伝子の食道扁平上皮癌細胞における機能を検討した。
- ⑦ 標的遺伝子の si-RNA を核酸導入した細胞株の遺伝子発現解析を行い、miR-375 の関与する分子経路について検討した。

【結果】

- ① 正常上皮に比較して、食道扁平上皮癌および細胞株では miR-375 発現は有意に低下していた。
- ② miR-375 を核酸導入した細胞株では、細胞遊走能・浸潤能が有意に低下した。
- ③ 遺伝子発現解析と in silico 解析を併用し、miR-375 の標的遺伝子として MMP13 を特定した。
- ④ 正常上皮と比較して食道癌および細胞株では MMP13 mRNA 発現は有意に上昇していた。免疫組織化学染色では、MMP13 タンパクは正常上皮でも発現していたが、癌部で発現の上昇を確認した。
- ⑤ miR-375 を核酸導入した細胞株では MMP13 mRNA および MMP13 タンパク発現はコントロールと比較して有意に低下した。また、Luciferase reporter assay で、miR-375 の結合部位を持つ wild 群はコントロールおよび削除した群と比較し発光が低下しており、MMP13 が塩基配列依存性に miR-375 に制御されていることを確認した。
- ⑥ MMP13 発現を knockdown した細胞株では、遊走能・浸潤能が有意に低下した。
- ⑦ MMP13 を knockdown した細胞株では、CENPF、KIF14 等の発現が低下していた。CENPF、KIF14 mRNA は食道癌臨床検体で発現は有意に上昇していた。

【結論及び考察】

以前から報告されているように、本研究でも miR-375 は腫瘍組織において著明に発現が低下しており、過剰発現させることで腫瘍遊走・浸潤能を抑制する機能を持つことが示された。一方、急性骨髄性白血病や前立腺癌では、miR-375 発現が上昇しており、腫瘍促進性に機能するという報告もある。各癌腫で miR-375 の機能が異なり、制御する経路を明らかにすることが重要である。

本研究では MMP13 を標的遺伝子として特定した。MMP13 は従来 Collagenase3 と呼ばれており、細胞外基質の構成成分である tenascin C や fibronectin、I～IV型 collagen を分解する機能を持っている。MMP13 の高発現は、食道癌では脈管侵襲やリンパ節転移に関与すると報告されており、腫瘍抑制性 microRNA である miR-375 の標的遺伝子として妥当であると考えられた。

MMP13 は miR-125b や miR-143 などの他の制御を受けていることも報告されており、それらは食道癌や頭頸部扁平上皮癌では発現が低下している腫瘍抑制性 microRNA であることも判明している。これら腫瘍抑制性 microRNA の発現低下と、MMP13 の発現過剰が、腫瘍の悪性度を促進している可能性がある。

MMP13 の下流の遺伝子として CENPF や KIF14 などの染色体や有糸分裂に関与する遺伝子が挙げられた。これらの遺伝子は癌において発現が上昇しており、悪性化に関連するとされている。これらの遺伝子群の中にはすでに治療標的として臨床試験の行われているものもある。miR-375/MMP13 の媒介する遺伝子群を明らかにすることで、食道扁平上皮癌分子病態のさらなる解明が期待できる。