

原文（日本語）

考察

miR-373は、さまざまなタイプの腫瘍内で異常に発現する。miR-373は発癌遺伝子または癌抑制遺伝子として機能し、腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移に影響する可能性がある。先行研究によると、miR-373は乳癌ではアップレギュレートされ、CD44発現のダウンレギュレーションにより腫瘍細胞の浸潤や転移を促す。ヒト線維肉腫細胞株のHT1080の場合、過剰発現したmiR-373は、ラパマイシン標的タンパク質（mechanistic target of rapamycin：mTOR）およびサーチュイン遺伝子1（sirtuin 1：SIRT1）のmRNAの3'非翻訳領域を直接標的とする可能性がある。その結果としてmTORとSIRT1はダウンレギュレートされ、それによりRas/Raf/MEK/Erkシグナル伝達経路と転写因子の核内因子κB（nuclear factor kappa B：NF-κB）が活性化される。これは、MMP-9発現量の増加と、腫瘍細胞の増殖および遊走の能力強化をもたらす。Zhang et al.の研究では、miR-373は胃癌例でアップレギュレートされ、腫瘍壊死因子α誘導タンパク質1（tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1：TNFAIP1）のダウンレギュレーションを通して胃癌細胞の増殖を促進することが明らかになった。しかしながら、miR 373と肺癌との関係は研究が十分に行われていないため、依然として不明である。

本研究では、非小細胞肺癌（non-small-cell lung carcinoma：NSCLC）では隣接する正常組織よりもmiR-373の発現量が高いことが判明した。また、NSCLCの組織検体の臨床病理学的特性とmiR-373-3p発現との関係の分析を通して、リンパ節転移を伴うNSCLC組織はリンパ節転移を伴わないNSCLC組織よりmiR-373-3pの発現量が有意に高いことが明らかになった。さらに、miR-373-3p発現量は、T1-T2 NSCLC組織に比べT3-T4 NSCLC組織で高かった。したがって我々は、miR-373-3pがNSCLC細胞の増殖および転移において制御をする役割を果たしている可能性があると推測した。すべてのタイプのNSCLCの中でもとりわけ肺腺癌は発症率が最も高いことから、本研究では主にmiR-373-3pと肺腺癌の浸潤および転移との関係性を調べた。その結果、miR-373-3pの発現量は、5種類のヒト肺腺癌細胞株において、健康なヒトの気管支上皮細胞よりも有意に高かった。特に、相対的な発現量はH1299細胞で最も高く、A549細胞で最も低かった。肺腺癌細胞の浸潤および転移能力に対するmiR-373-3pの影響を調べるため、我々が機能獲得および機能喪失の研究を実施したところ、miR-373-3pの過剰発現によりH1299細胞の浸潤および転移能力が向上することが分かった。そしてそれとは対照的に、miR-373-3pの抑制によりA549細胞の浸潤および転移能力が抑制されることが明らかになった。上記の結果は、miR-373-3pが肺腺癌細胞の浸潤および転移能力を強化することを示す。Seol et al.[9]のmiR-373と肺癌との関係性に関する研究では、pre-miR-373の過剰発現は肺癌細胞の浸潤能力を阻害することが明らかになった。この研究の結果と我々の所見との差異は、Seol et al.がmiR-373前駆体を使用したことに起因している可能性がある。細胞の侵入時には、pre-miRNAはRNase III型酵素であるダイサーによって切断され、miRNA-5pおよびmiRNA-3pを生成するが、これはその後に生体影響をもたらす。miR-373が腫瘍のタイプにより異なる役割を果たすということも受け、この事実はmiRNA-5pとmiRNA-3pの生体への影響に差異が存在するか否かという興味深い問題を提起している。たとえば、miR-373は乳癌細胞[6]、ヒト線維肉腫細胞[7]、子宮頸癌細胞[10]の転移能力を高めるが、前立腺癌細胞[11]や卵巣癌細胞[12]の転移については阻害する。したがって、肺癌でのmiR-373のサブタイプの役割を解明するには、さらに研究を行う必要がある。

腫瘍の浸潤と転移の発生には複数の機序が関与している。複数の研究により、マトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase：MMP）が腫瘍の転移において担う主な役割が明らかにされている。MMPは基底膜を分解し細胞外マトリックス（extracellular matrix：ECM）に隠されたポリペプチド抗原を露出させ、これにより浸潤の開始が促される。また、MMPは原発腫瘍部位から循環器系への可溶性の腫瘍細胞の放出を可能にし、遠隔器官内に転移性微小環境を形成し、腫瘍細胞クローンの発現を促す[13]。MMPは、腫瘍内のインテグリンやその他の細胞接着分子を直接変更することで、トランスフォーミング増殖因子β（transforming growth factor beta：TGF-β）のような主要なサイトカインを活性化し、上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition：EMT）を誘導するが、これは細胞移動の増加に起因する広範囲にわたる表現型の変化を伴い、腫瘍の転移の必須過程となる[13]。MMPファミリーの一つであるMMP-9は、腫瘍細胞の成長、増殖、浸潤、転移において欠くことのできない重要な役割を担っている[14]。Peng et al. [15]は、MMP-9の発現量の高さは、NSCLC患者の予後不良と密接に関連していることを明らかにした。MMP-9がリンパ節転移率の上昇、遠隔転移率の上昇、無再発生存率の低下と関連していることは、多くの研究[16-18] が示している。膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1（membrane-type matrix metalloproteinase 1：MT1-MMP）としても知られるMMP-14は、膜型マトリックスメタロプロテアーゼファミリーで初めて発見されたメンバーである。これは、浸潤[19]、増殖[20]、細胞外マトリックスの再生[21]といった正常組織と腫瘍組織の生物学的挙動において極めて重要な役割を果たす。ある先行研究[22]は、MMP-14がNSCLC組織において有意に高発現であることを示した。Wang et al. [23]も、MMP-14の発現量が高いNSCLC患者の生存期間は、MMP-14の発現量が少ないNSCLC患者より短いことを明らかにした。したがって、MMP-14の発現量の高さは予後不良の指標として利用できる可能性がある。

我々は、miR-373-3pが肺腺癌細胞の浸潤と転移能力を強化する機序を確定するため、miR-373-3pとさまざまなMMPとの関係を検討した。その結果、MMP-9タンパク質およびMMP-14タンパク質の発現はmiR-373-3pの過剰発現を示す細胞でアップレギュレートされ、miR-373-3p発現が阻害された場合にはMMP-9タンパク質およびMMP-14タンパク質の発現はダウンレギュレートされたことが示された。これらの結果から、miR-373-3pは、MMP-9タンパク質およびMMP-14タンパク質の発現のアップレギュレーションを通して腫瘍細胞の浸潤および転移能力に影響を与える可能性があることが示唆される。本研究では、miR-373-3pは発現量を増加させ、肺腺癌の発癌遺伝子として機能することが明らかになった。miR-373-3pは、MMP-9およびMMP-14タンパク質発現のアップレギュレーションを通して、肺腺癌細胞の浸潤および転移能力を強化する可能性がある。これは、浸潤および転移が肺腺癌細胞に生じる機序の一つであり、miR-373-3pが肺腺癌細胞の浸潤および転移能力を阻害する際のターゲットとして利用できること、また肺腺癌の浸潤と転移の臨床的な回復に向けた新たなアプローチを示すことを示唆している。

翻訳＋英文校正済み原稿

Discussion

MicroRNA-373 (miR-373) is abnormally expressed in many types of tumors. It may function as an oncogene or a tumor suppressor gene and influence the proliferation, invasion, and metastasis of tumor cells. Previous studies have reported that miR-373 is upregulated in breast cancer and that it promotes tumor cell invasion and metastasis by downregulating CD44 expression. In HT1080 human fibrosarcoma cells, overexpressed miR-373 may directly target the 3' untranslated regions of the mRNAs of mechanistic target of rapamycin (mTOR) and sirtuin 1 (SIRT1). Consequently, mTOR and SIRT1 are downregulated, thereby activating the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and the transcription factor nuclear factor kappa B. This results in an increase in matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression and an enhancement in the growth and migratory abilities of tumor cells. Zhang et al. have shown that miR-373 is upregulated in gastric cancer and that it promotes the proliferation of gastric cancer cells by downregulating the tumor necrosis factor alpha-induced protein 1. However, the relationship between miR 373 and lung cancer remains unclear owing to a lack of relevant research. In the present study, miR-373-3p expression was found to be higher in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) tissues than in adjacent normal tissues. By analyzing the relationships between clinicopathological characteristics and miR-373-3p expression in NSCLC tissue specimens, we found that NSCLC tissues with lymph node metastases had significantly higher miR-373-3p expression than NSCLC tissues without lymph node metastases. In addition, miR-373-3p expression was higher in T3-T4 NSCLC tissues than in T1-T2 NSCLC tissues. Therefore, we deduced that miR-373-3p may play a regulatory role in the proliferation and metastasis of NSCLC cells. As lung adenocarcinoma has the highest incidence rate among all types of NSCLC, the present study investigated the relationship of miR-373-3p with the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells. Our results showed that miR-373-3p expression was significantly higher in five different human lung adenocarcinoma cell lines than in normal human bronchial epithelial cells. In particular, the relative expression level was the highest in H1299 cells and the lowest in A549 cells. To investigate the influence of miR-373-3p on the invasive and metastatic abilities of lung adenocarcinoma cells, we conducted gain- and loss-of-function studies and found that miR-373-3p overexpression enhanced the invasive and metastatic abilities of H1299 cells; in contrast, the inhibition of miR-373-3p reduced the invasive and metastatic abilities of A549 cells. The above results indicate that miR-373-3p can increase the invasive and metastatic abilities of lung adenocarcinoma cells. A study conducted by Seol et al. [9] on the relationship between miR-373 and lung cancer found that the overexpression of pre-miR-373 inhibited the invasive ability of lung cancer cells. The difference between this result and our findings may be attributed to the fact that the miR-373 precursor was used by Seol et al. Upon cellular entry, pre-miRNAs are cleaved by the RNase III enzyme Dicer to generate miRNA-5p and miRNA-3p, which subsequently exert biological effects. This raises the intriguing question of whether differences exist in the biological effects of miRNA-5p and miRNA-3p, as miR-373 also plays different roles in different types of tumors. For instance, miR-373 enhances the metastatic abilities of breast cancer cells [6], human fibrosarcoma cells [7], and cervical cancer cells [10] but inhibits the metastasis of prostate cancer cells [11] and ovarian cancer cells [12]. Therefore, further research is required to elucidate the roles of the miR-373 subtypes in lung cancer.

Multiple mechanisms underlie tumor invasion and metastasis. Studies have found that MMPs play a key role in tumor metastasis. MMPs degrade basement membranes and expose concealed polypeptide antigens in the extracellular matrix, which promotes the onset of invasion. In addition, MMPs enable the release of soluble factors from tumor cells at the primary tumor site into the circulatory system, forming metastatic microenvironments in distant organs and facilitating the development of tumor cell clones [13]. MMPs can also directly modify integrin and other cell adhesion molecules in tumors, thereby activating key cytokines such as transforming growth factor beta and inducing epithelial-mesenchymal transition, which involves widespread phenotypic changes caused by increased cell migration and serves as an essential process in tumor metastasis [13]. MMP-9, a member of the MMP family, plays an indispensable role in the growth, proliferation, invasion, and metastasis of tumor cells [14]. Peng et al. [15] found that high MMP-9 expression was closely linked with a poor prognosis in NSCLC patients. A number of studies [16-18] have indicated that MMP-9 is associated with increased lymph node metastasis rate, increased distant metastasis rate, and reduced relapse-free survival rate. MMP-14, also known as membrane type 1-MMP, was the first member of the membrane-type MMP family to be discovered. It is also vital to the biological behaviors of normal and tumor tissues, including invasion [19], proliferation [20], and extracellular matrix remodeling [21]. Previous research [22] has shown that MMP-14 is significantly highly expressed in NSCLC tissues. Wang et al. [23] also found that the survival duration of NSCLC patients with high MMP-14 expression levels was shorter than that of NSCLC patients with low MMP-14 expression levels. Therefore, high MMP-14 expression may serve as an indicator of poor prognosis.

To determine the mechanisms by which miR-373-3p enhances the invasive and metastatic abilities of lung adenocarcinoma cells, we investigated the relationships between miR-373-3p and various MMPs. Our results indicated that MMP-9 and MMP-14 expression was upregulated in cells with miR-373-3p overexpression; when miR-373-3p expression was inhibited, MMP-9 and MMP-14 expression was downregulated. In summary, these results suggest that miR-373-3p influences the invasive and metastatic abilities of tumor cells through the upregulation of MMP-9 and MMP-14 expression. In the present study, we found that miR-373-3p showed increased expression and functioned as an oncogene in lung adenocarcinoma cells. miR-373-3p may enhance the invasive and metastatic abilities of lung adenocarcinoma cells through the upregulation of MMP-9 and MMP-14 expression. This constitutes one of the mechanisms by which invasion and metastasis occurs in lung adenocarcinoma cells, suggesting that miR-373-3p serves as a target for therapeutic approaches aimed at inhibiting or clinically reversing invasion and metastasis in lung adenocarcinoma.