

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19390195
 研究課題名（和文） 消化器癌におけるエピジェネティック異常とマイクロRNAの
 関わりの検討
 研究課題名（英文） Analysis of the relationship between epigenetic disorder and micro
 RNA in gastroenterological cancer
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：横須賀 収（YOKOSUKA OSAMU）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：90182691

研究成果の概要：

脱メチル化剤を培養細胞に投与し、発現が回復するマイクロRNAをエピジェネティックな因子による発現制御を受けるマイクロRNA候補とし、解析を行った。対象とした培養細胞は、食道癌由来、肝細胞癌由来、大腸癌由来の培養細胞。hsa-mir-26b, 517a, 372, 373, 519, 520gに注目し、細胞増殖能を変化させることを明らかにした。一部のマイクロRNAにおいて、プロモーター領域の異常メチル化を明らかにし、異常メチル化により発現が制御され、癌細胞の増殖に関与することが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
20年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：マイクロRNA エピジェネティクス 異常メチル化 マイクロアレイ 発現解析
 細胞増殖能 培養細胞 トランスフェクション

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異や、欠失、増幅といった遺伝子配列そのものに変化をきたすジェネティックな異常だけではなく、エピジェネティックな異常による遺伝子発現制御も注目されている。特に、プロモーター領域の異常メチル化、ヒストンの脱アセチル化によるクロマチン構造の変化によって遺伝子配列に変化をもたらすことなく、発癌や癌の進展に大きな役割を果たすエピジェネティックな異常も注目を集めている。これまで我々は、食道癌、胃癌、肝細胞癌、大腸癌由来の培養細胞を用いて、異常メチル化によって発現が低下し、また発癌に対する寄与について検討を行ってきた。またタンパク質をコードしない小さなRNA分子であるマイクロRNAは、発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっていると考えられ、注目を集めている。マイクロRNAをコードする遺伝子は、ゲノム上に少なくとも数百存在している。それらの遺伝子からは、まず、数百から数千ヌクレオチドの長さの初期マイクロRNAが転写され、その後処理され、約60~70ヌクレオチドのヘアピン型前駆体マイクロRNAとなる。さらにDicerと呼ばれるリボヌクレアーゼによって、19~24ヌクレオチドの成熟したマイクロRNAとなる。その作用機序は、マイクロRNAと部分的に相補的なメッセンジャーRNAとの不完全なハイブリダイゼーションと、それに伴う未知の翻訳抑制作用であると考えられている。そのため、一種類のマイクロRNAが、タンパク質をコードする複数のメッセンジャーRNAの翻訳を制御するという極めてユニークな発現調節機構に携わっていると考えられている。一方で、これらマイクロRNA自体の発現調節機構については、不明な点も多いが、エピジェネティックな異常により発現が制御されている可能性が報告され始め、やはり、発癌、発生に重要な役割を果たすことが予想された。

2. 研究の目的

エピジェネティックな異常により発現が制御されたマイクロRNAを検出し、その機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 消化器癌由来の培養細胞株(肝細胞癌由来3種、食道癌由来2種、大腸癌由来2種)を対象とした。それぞれの培養細胞に対して、脱メチル化剤(5-aza-2'-deoxycytidine、以下DAC)を、1 μ Mもしくは5 μ Mの濃度で96時間投与した。その前後で発現上昇を認めるマイクロRNAを、異常メチル化によって発現が制御されている候補遺伝子とした。発現上昇を認めたマイクロRNAの検出方法として、約300個のマイクロRNAがス

ポットされたマイクロアレイを用いた。この手法は、これまで、蛋白をコードする遺伝子については、広く応用され、様々な異常メチル化に制御される遺伝子が発見、報告されている。マイクロアレイの結果はリアルタイムPCRにて確認した。

(2) 発現上昇が確認されたマイクロRNAについては、マイクロRNA moleculeを培養細胞にトランスフェクションすることにより、細胞増殖能が変化するかについてMTSアッセイにて検討した。

(3) 細胞増殖能を変化させることが確認されたマイクロRNAについては、その転写開始点(TSS)を、5'race法にて同定した。5'race法は、蛋白をコードするmRNAだけでなく、蛋白をコードしないマイクロRNAのmRNAにおいても5'末端にキャップ構造があることに着目している。TSSの上流にCpGアイランドが存在するかについては、web上で公開されている方法にて検討した(<http://www.cpgislands.com/>)。CpGアイランドの異常メチル化については、Methylation Specific PCR(MSP)法にて解析した。

(4) プロモーター領域に異常メチル化を認めたマイクロRNAについては、そのターゲット遺伝子(マイクロRNAによって発現が制御されている可能性が高い遺伝子、web上で公開されている<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>)の中で、抑制効果が高いことが予想されている上位10個の遺伝子について検討した。特にこれまで、癌との関連が報告されている遺伝子について着目した。これら遺伝子の発現量について、DAC処理後、またマイクロRNA moleculeをトランスフェクションした後の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) DAC処理後のマイクロRNAの発現量の変化: マイクロアレイ解析により、各培養細胞にて発現が上昇したマイクロRNAの一部を示す。食道癌由来2種、大腸癌由来2種、肝細胞癌由来3種の培養細胞を用いて、マイクロアレイの結果を比較検討を行った。大腸癌由来培養細胞は、投与したDACの濃度が5 μ Mと他の検討と異なるため、

miRNA	HT-29				DLD-1			
	Microarray(Ratio)		Real-time PCR(Ratio)		Microarray(Ratio)		Real-time PCR(Ratio)	
	1 μ M	5 μ M	1 μ M	5 μ M	1 μ M	5 μ M	1 μ M	5 μ M
miR-917b	1.6	3.6	530.4	800.8	14.4	10.7	137.3	1118.2
miR-917a	1.2	3.6	530.3	1785.7	11.7	8.1	985.8	3236.1
miR-10a	2	2.4	0.1	0.1	5.4	6.1	151.9	28.1
miR-20a	1.2	2.4	0.5	0.2	4.2	5.7	75.5	83.5
miR-20b	1.9	3.2	0.8	1.1	8.2	5.4	1331.8	3229.9
miR-21a	0.9	2.2	0.2	0.1	6.5	4.9	0.2	0.1
miR-182	1.3	2.1	0.6	0.5	5.1	4.1	30.8	166.1
miR-919d	1.1	2.1	46.1	277.6	6	4.3	172.1	184
miR-920g	1	2	236.8	874.1	8.1	4.3	0.4	0.4
miR-913-3p	1.1	2	11	2	3.4	3.4	0.1	0.2

表1 The expression of miRNAs after DAC treatment was analyzed by Microarray and quantitative RT-PCR.

miRNA	LoVo	WiDr	HCT-116	Colo-201
	Real-time PCR(Ratio)			
	DAC			
miR-517b	1159.7	974.4	1461.3	79.4
miR-517a	30.7	698.3	1094.1	266.1
miR-372	124.3	7.4	286.4	147.9
miR-373	118.1	6.6	562.3	269.4
miR-519d	309.2	51.3	184.8	41.2
miR-520g	561.8	1832	1018.2	13.4

表2 The expression levels of miRNAs after DAC treatment

比較検討は行わなかった。食道癌由来の培養細胞であるTE-1とTE-10では、それぞれ1.5倍以上の発現上昇を認めたマイクロRNAは、それぞれ13個、6個認めた。しかし、両者に共通して発現上昇したマイクロRNAは認めなかった。一方で、肝細胞癌由来

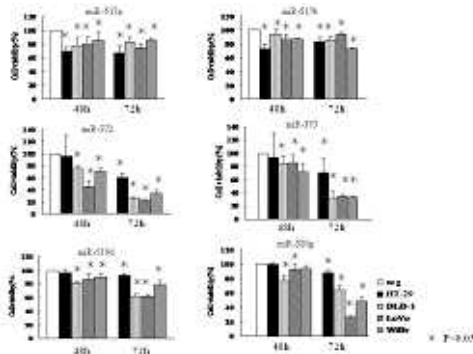


図1 The effect of transient transfection with the miRNAs (miR-517a, miR-517b, miR-372, miR-373, miR-519d and miR-520g) on HT-29, DLD-1, LoVo, WiDr on the cell proliferation rate evaluated by MTS assay

の培養細胞 (Alexander, Huh7, HLE) では、それぞれ4、3、16個のマイクロRNAが発現上昇を認めた。この中には、培養細胞間で共通して発現情報を認めたマイクロRNAが、3個認められた (hsa-mir-21, 524, 525)。特に hsa-mir-21 は、腫瘍抑制遺伝子である phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) との関連が報告されており、その発現機構の解明は有用なものになると思われる。これらの検討から、培養細胞ごとに、DAC処理後のマイクロRNAの発現パターンが異なることがわかり、各培養細胞の特異性を示している。残念ながら各培養細胞間の共通性については、明確な結果は得られなかった。

(2) リアルタイムPCR法にて、その一部のマイクロRNAの発現変化を確認した。

(3) 大腸癌由来培養細胞株における結果を示す (表1、表2)。上記検討によりDAC処理により発現上昇した6種類のマイクロRNA (hsa-mir-517a, hsa-mir-517b, hsa-mir-372, hsa-mir-373, hsa-mir-519d, hsa-mir-520g) の molecule をおなじく大腸癌由来培養細胞株にトランスフェクションし、細胞増殖能を検討したところ、図1に示すように、それぞれ、有意に細胞増殖抑制能を示した。

(4) 上記6種類のマイクロRNAのゲノム上流域を検索し、CpGアイランドの存在するマイクロRNA 5種 (hsa-mir-517a, hsa-mir-372, hsa-mir-373, hsa-mir-519d, hsa-mir-520g) の TSS を同定の上、上流域のCpGアイランドの異常メチル化をMS

Gene	Transfection of miRNA	Ratio of Gene expression	
		HT-29	DLD-1
RAB22A	372	0.259	0.007
	373	0.578	0.006
OXR1	372	0.127	0.001
	373	0.551	0.006
EIF5A2	519d	0.283	0.004
	519d	0.076	0.028
KLHL2	520g	0.058	0.054

表3 The Change of Expression Levels in the Target Genes of miRNAs

Pにて明らかにした。同時に、DAC処理によって、異常メチル化が解除されることも明らかにした (図2)。

(5) 上記5種類のマイクロRNAのターゲット遺伝子内で、既に癌組織で発現量が高いと報告されている遺伝子について、検討した。結果として、マイクロRNA molecule のトランスフェクションによって、各遺伝子の発現量は低下した (表3)。以上より、異常メチル化によって、発現が抑制されたマイクロRNAを明らかにした。マイクロRNAは癌促進に働く遺伝子の発現をコントロールすることにより、発癌のメカニズムの一端を

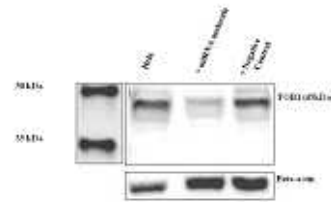


図4 The Reduction of FCB1 after hsa-mir-20b transfection

担っていると考えられる。

(6) 同様にして、食道癌由来培養細胞でDAC処理によって発現上昇がみられたマイクロRNAのうち、hsa-mir-26bに着目して検討した。hsa-mir-26b molecule をトランスフェクションすることにより、MTSアッセイによる検討では、細胞増殖能の増加を認めた。ゲノム上流域の異常メチル化を、バイサルファイト処理後 direct sequence 法にて検討したところ、異常メチル化が確認された。大腸癌由来培養細胞を用いた検討と同じく、web上で公開された hsa-mir-26b のターゲット遺伝子上位10個のうち、上位10個の遺伝子の mRNA 発現量が、molecule の強制発現により抑制されるかを検討した。結果

として、癌抑制遺伝子として報告のある transducer of ERBB2, 1 (T O B 1) の mRNA 発現量の低下を確認した。また、ウエスタンブロッティング法にて、蛋白レベルの低下も確認した(図4)。以上より、hsa-mir-26b は、異常メチル化によって、食道癌由来培養細胞において、発現が制御されており、T O B 1 の発現増加を引き起こし、細胞増殖能に影響を与えているものと推察された。

(7) 蛋白をコードしないマイクロRNA が、非常に多機能であることがわかり、最近、代表的な癌抑制遺伝子である p 5 3 と密接な関連があることが明らかになった。これらの報告は、マイクロRNA は、癌の発生や進展に重要な役割を果たすことを示しており、マイクロRNA の動態の把握は、癌研究において、必須のものである。本研究では、マイクロRNA の制御方法として、従来報告されているジェネティックな因子のみならず、エピジェネティックな因子、特にプロモーター領域の異常メチル化も重要であることを明らかにした。また、それぞれのマイクロRNA の機能については、DAC 処理で発現変化がみられるマイクロRNA に着目したことにより、発癌との関連が深いマイクロRNA を選び出すことができたと考えている。マイクロRNA は、そのサイズが小さいことなどから、通常の mRNA と比較して、安定しており、RT-PCR による発現量の差異の検討が容易とされている。また、マイクロRNA を用いた遺伝子導入も、通常の蛋白をコードする遺伝子と比べて容易であり、臨床応用の可能性が高い。本研究では、当初予定していた臨床検体を用いた検討については、学内の倫理委員会に現在申請中であり、数か月以内に許可される予定である。大幅に予定が遅れた原因として、マイクロRNA が発現する

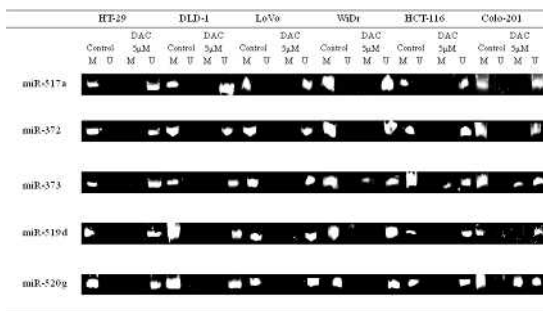


図2 The results of Methylation-Specific PCR (MSP)

際の、transcription starting site(TSS)が明らかになっておらず、その確認が予想以上に困難であった。その原因として、ゲノムから最初に読みだされるRNAが微量で不安定なため、TSSの決定が困難になったと予

想される。今後、マイクロRNAの発現量を調整するメカニズムの解明には、TSSを含めたデータベースの構築が必要と思われる、しかしながら、本格的な研究が開始されて間もないこともあり、今後の世界レベルでの情報集積に期待したい。少数例ではあるが、市販されている大腸癌の臨床検体(匿名化され、遺伝子研究が許可されている)を用いた前検討では、今回の培養細胞を用いた検討と合致する結果が得られており、今後多数の臨床検体を用いた検討によって、臨床の現場に役立つ結果を提供できる可能性が高いと思われる。

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5件)

- (1) 太和田勝之、横須賀收 他5名、Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in liver metastases from pancreatic carcinoma as a predictor of chemotherapeutic effect and prognosis. Clin Cancer Res. 14(22) 7438-43 2008. 査読有
- (2) 千葉哲博、横須賀收 他9名 The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 68(19) 7742-9 2008. 査読有
- (3) 新井誠人、今関文夫、横須賀收 他6名 Analysis of the methylation status of genes up-regulated by the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 20(2) 405-12 2008. 査読有
- (4) 多田素久、今関文夫、横須賀收 他10 Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 14(12):3768-76 2008. 査読有
- (5) 千葉哲博、横須賀收 他11名 Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. Gastroenterology. 133(3):937-50 2007. 査読有

[学会発表](計2件)

- (1) 田中健史、新井誠人、今関文夫、横須賀收、大腸癌由来培養細胞において脱メチル化剤投与により発現上昇したマイクロRNAの解析、第67回日本癌学会学術総会、2008.10.28、名古屋

- (2) 新井誠人、今関文夫、横須賀收、肝癌細胞株におけるエピジェネティック異常とマイクロRNAの関わりへの検討、第43回日本肝臓学会総会、2007.5.31、東京

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横須賀 收 (YOKOSUKA OSAMU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90182691

(2) 研究分担者

今関 文夫 (IMAZAKI FUMIO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40223325

(3) 連携研究者

深井 健一 (FUKAI KENICHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60361432

新井 誠人 (ARAI MAKOTO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30396684