

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591558

研究課題名（和文） 消化器癌薬剤耐性獲得に関する microRNA の関与

研究課題名（英文） Effects of miRNA alterations on the chemosensitivity against anticancer agents in gastrointestinal tract tumors

研究代表者

池田 健一郎 (IKEDA KENICHIRO)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20254758

研究成果の概要（和文）：進行・再発の消化器癌に対して，CDDP+5-FUを中心とした化学療法に，Paclitaxelの併用療法が試みられている．しかし，その奏功率は依然として低く，背景には腫瘍細胞の持つ薬剤耐性機構がある．近年，ゲノムのジャンク配列と思われ，注意の払われていなかったnon-codingが注目を浴びている．特に，miRNAは，複数のmRNAの3' -非翻訳領域に結合し，mRNAの分解あるいは蛋白質の翻訳抑制に働いている．本研究では，消化器癌において薬剤耐性遺伝子の発現制御に関わるmicroRNA (miRNA) を定量的に解析し，薬剤耐性獲得機構との関連を検討した．type III  $\beta$ -tubulinプロモーター領域との結合に必要なdsRNA特定には至らなかったが，type III  $\beta$ -tubulinの発現には，intron 1領域のhypermethylationならびにヒストンの脱アセチル化強く関与している所見が得られた．また， ABCB1の過剰発現には hsa-miR-451, hsa-miR-498のmiRNAの発現低下が関連していた．消化器癌の薬剤体制機構にはmiRNAの発現異常が関与している可能性が示唆され，新たな治療戦略の立脚につながると考えられた．

研究成果の概要（英文）： To investigate the relationship of miRNA alterations and chemosensitivity, we investigated hsa-miR-451 and hsa-miR-498 expression in gastrointestinal tract tumors. Further, we examined also methylation and acetylation statuses of TUBB3 promoter region. Demethylation and hyperacetylation at the promoter well correlated with overexpression of TUBB3 protein expression. Down-regulation of hsa-miR-451 and hsa-miR-498 induced ABCG2 overexpression. These results suggested that alterations of miRNA expression may contribute to chemosensitivity for anticancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：消化器癌，化学療法，REST，TUBB3，miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

進行・再発の消化器癌に対して、CDDP+5-FUを中心とした化学療法に、Paclitaxelの併用療法が試みられている。しかし、その奏功率は依然として低く、背景には腫瘍細胞の持つ薬剤耐性機構がある。

腫瘍細胞が薬剤耐性を獲得する主要な機構として、P-glycoprotein (ABCB1, MDR1)の過剰発現がある。ABCB1を過剰発現している腫瘍細胞では、CDDPなどの薬剤排出機構が高まり、自然耐性を獲得することになる。一方、Paclitaxelは細胞分裂時の微小管と重合し、細胞分裂を阻害する作用がある。一部の腫瘍では、type III  $\beta$ -tubulin (neuronal tubulin)を過剰発現させ、微小管の安定性を増すことでPaclitaxelの殺細胞効果を回避している。近年、ゲノムのジャンク配列と思われ、注意の払われていなかった non-coding が注目を浴びている。特に、miRNAは、複数の mRNA の 3' -非翻訳領域に結合し、mRNAの分解あるいは蛋白質の翻訳抑制に働いている。

薬剤排出能に関与する ABCB1 過剰発現株では親株に比較して、ABCB1 の 3' -非翻訳領域に結合する 2 種類の miRNA (hsa-miR-451, hsa-miR-498)の発現が低下している可能性がある。また、type III  $\beta$ -tubulin の発現は、がん抑制遺伝子 REST (RE-1 silencing factor)によって制御され、そのプロモーター領域と REST 蛋白質の結合には、dsRNAが必要である。薬剤耐性機構に関する non-coding RNA の関与を明らかにすれば、新たながん治療戦略を描くことが可能になる。本研究では miRNA を中心に消化器癌での薬剤耐性機構への関与を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、消化器癌において薬剤耐性遺伝子の発現制御に関わる microRNA (miRNA)を定量的に解析し、薬剤耐性獲得機構との関連を検討する。

## 3. 研究の方法

対象は消化器癌培養細胞株 44 株 (食道癌

10 株, 胃癌 8 株, 大腸癌 12 株, 肝癌 5 株, 胆道癌 6 株, 膵癌 3 株) を対象として解析を行った。

miRNA の定量は、Real-time PCR 法を応用した、TaqMan MicroRNA Assay (ABI) による定量を行った。Primer/probe set を ABI より購入し、ABI pris7500 で解析した。解析結果は  $\Delta\Delta Ct$  法で計算した。ABCB1, MDR1, type III  $\beta$ -tubulin, REST の発現は real-time PCR 法および western blot 法で評価した。必要に応じて Ambion 社製の reporter assay 法を用いて mRNA の 3' -非翻訳領域との結合についても評価した。

## 4. 研究成果

RESTとtype III  $\beta$ -tubulinプロモーター領域との結合に必要なdsRNA特定には至らなかった。しかし、type III  $\beta$ -tubulinの発現には、intron 1領域のhypermethylationならびにヒストンの脱アセチル化強く関与している所見が得られた(図1, 2)。また、REST, type III  $\beta$ -tubulinの発現自体を抑制するmiRNAの発現異常は確認されなかった。

ABCB1 の 過 剰 発 現 に は hsa-miR-451, hsa-miR-498 の miRNA の 発 現 低 下 が 関 連 して いた (図 3)。

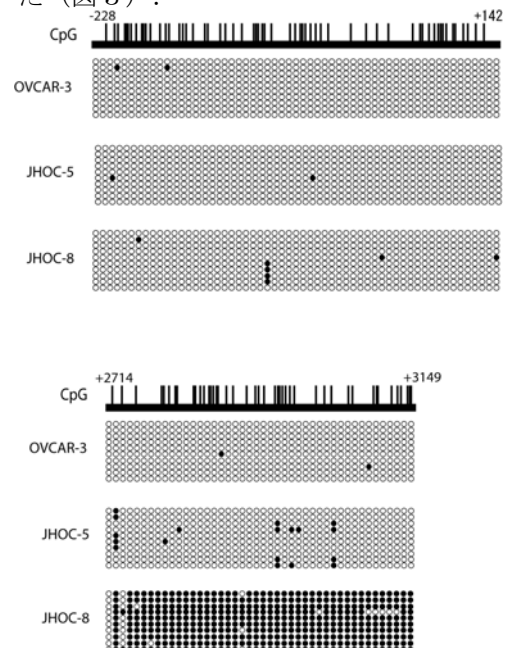


図1 type III  $\beta$ -tubulin のプロモーター領域のメチル化状態

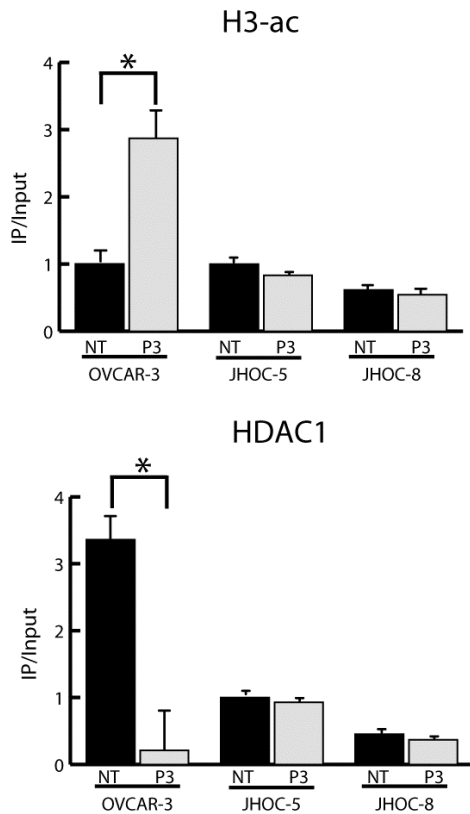


図2 type III  $\beta$ -tubulin のプロモーター領域のアセチル化状態の評価

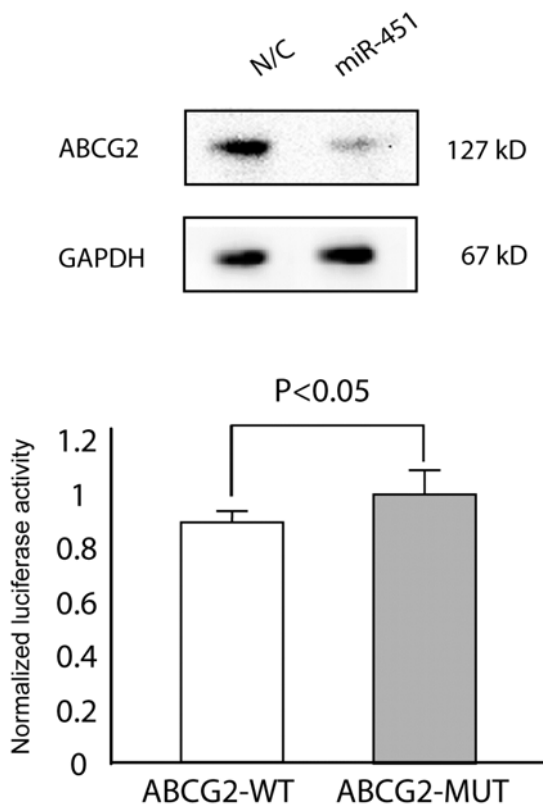


図3 ABCG2 遺伝子の miRNA に発現制御

## 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19件)

1. Tatemichi Y, Oikawa H, Maesawa C, Ambo J, Sato M, Koike H, Sata T, Fujioka T, Masuda T. Detection of human papillomavirus in a urothelial carcinoma mimicking urethral caruncle. *Int J Urol* 2010;17:189-91.
2. Takahashi T, Takahashi K, Yamashina M, Maesawa C, Kajiwara T, Taneichi H, Takebe N, Kaneko Y, Masuda T, Satoh J. Association of the TNF- $\alpha$ -C-857T polymorphism with resistance to the cholesterol-lowering effect of HMG-CoA reductase inhibitors in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2010;33:463-6.
3. Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 2010;316:940-50.
4. Obuchi T, Sasaki A, Nitta H, Koeda K, Ikeda K, Wakabayashi G. Minimally invasive surgical enucleation for esophageal leiomyoma: report of seven cases. *Dis Esophagus* 2010;23:E1-4.
5. Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T, Shikanai T, Nakamura Y, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Maesawa C, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H. Enhanced

- goblet cell hyperplasia in HDC knockout mice with allergic airway inflammation. *Allergol Int* 2009;**58**:125-34.
6. Sugitachi A, Kimura Y, Itabashi T, Noda H, Ishida K, Nishizuka S, Otsuka K, Kashiwaba M, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Sasaki A, **Ikeda K**, Takamori Y, Wakabayashi G. [A novel formulation of cisplatin (CDDP)]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:2294-6.
  7. Russa AD, **Maesawa C**, Satoh Y. Spontaneous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in G1/S phase-synchronized cells. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2009;**58**:321-9.
  8. Obuchi T, Sasaki A, Shimooki O, Minakawa Y, Abe T, Nitta H, Otsuka K, Koeda K, **Ikeda K**, Wakabayashi G. [Local recurrence after surgical resection of pancreatic cancer effectively treated with combined chemoradiotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2009;**36**:991-4.
  9. Nagata Y, **Maesawa C**, Tada H, Takikawa Y, Yashima-Abo A, Masuda T. Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. *Int J Mol Med* 2009;**24**:35-43.
  10. Minami Y, Satoh M, **Maesawa C**, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2009;**39**:359-67.
  11. Kato K, **Maesawa C**, Itabashi T, Fujisawa K, Otsuka K, Kanno S, Tada H, Tatemichi Y, Kotani K, Oikawa H, Sugai T, Wakabayashi G, Masuda T. DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2009;**35**:467-76.
  12. Akasaka K, **Maesawa C**, Shibasaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;**129**:1516-26.
  13. Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T, Shikanai T, Nakamura Y, Niisato M, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, **Maesawa C**, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H. Progress in allergy signal research on mast cells: the role of histamine in goblet cell hyperplasia in allergic airway inflammation - a study using the Hdc knockout mouse. *J Pharmacol Sci* 2008;**106**:354-60.
  14. Sugitachi A, Otsuka K, Itabashi T, Chiba T, Kimura Y, Sasaki A, **Ikeda K**, Uesugi N, Takamori Y, Kurozumi S, Mori T, Wakabayashi G. [Chitin/cisplatin--an adhesive anticancer drug]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008;**35**:2021-3.
  15. Sasaki A, Nakajima J, **Ikeda K**,

- Otsuka K, Koeda K, Wakabayashi G. Endoscopic thyroidectomy by the breast approach: a single institution's 9-year experience. *World J Surg* 2008;**32**:381-5.
16. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Kotani K, Oikawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2008;**99**:280-6.
17. Izutsu N, Maesawa C, Shibazaki M, Oikawa H, Shoji T, Sugiyama T, Masuda T. Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 2008;**32**:1227-35.
18. Itabashi H, Maesawa C, Oikawa H, Kotani K, Sakurai E, Kato K, Komatsu H, Nitta H, Kawamura H, Wakabayashi G, Masuda T. Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatol Res* 2008;**38**:601-13.
19. Chiba T, Sato K, Kudara N, Shinozaki H, Ikeda K, Endo M, Orii S, Suzuki K. Upper gastrointestinal disorders

induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology* 2008;**16**:16-20.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 健一郎 (IKEDA KENICHIRO)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20254758

### (2) 研究分担者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10326647