

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790253

研究課題名（和文） 消化管癌におけるマイクロ RNA 発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular Mechanism for Regulation of microRNA Expression in Gastrointestinal Cancer

研究代表者

坂谷 貴司 (SAKATANI TAKASHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号；50431903

研究成果の概要：Epstein-Barr Virus(EBV)関連胃癌では、特異的に microRNA-200 family の発現が低下しており、転写抑制因子 ZEB1,ZEB2 を介して細胞接着に関わる E-cadherin の発現を抑制していることを見いだした。EBV 関連胃癌の細胞学的な特徴を明らかにし、発癌に深く関連する現象である細胞相互接着の低下と microRNA による制御機構についてのメカニズムを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	0	2,000,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：胃癌、Epstein-Barr ウイルス関連胃癌、microRNA、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノム配列の解読によって、タンパク質をコードしない non-coding RNA(ncRNA) が全 RNA の約 50% を占めることが報告された。ncRNA は発生・分化を含めて、さまざまな生命現象をコントロールしていると考えられている。

(2) ncRNA の一つである microRNA(miRNA) は、相補的な標的 mRNA の遺伝子発現制御を担う 21～25 塩基の小分子 RNA であり、当初 300 以上の miRNA が報告され、1 つの miRNA が複数の遺伝子発現を制御していると考えられている。

(3) miRNA の発現は時空間的に制御され、組織

や発生時期に特異的な発現様式を示し、細胞の増殖、分化やアポトーシスにも密接な関連があると考えられている。

(4) エピジェネティックな変化である DNA メチル化やヒストンのアセチル化は時空間的な遺伝子発現制御を行っており、遺伝子の発現パターンを変えて多くの種類の細胞を形成する機構として重要なものと考えられている。また、癌化に伴って、ゲノムのメチル化に異常が起き、癌抑制遺伝子の不活化などにも関わっている。

以上の点に基づき、miRNA が時空間的に制御され、組織や発生時期に特異的な発現様式を示すことや、miRNA 初期転写産物が通常の mRNA と同様に RNA ポリメラーゼによって転写

されることから、一部の miRNA 発現は DNA メチル化やヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな変化による遺伝子制御を受けている可能性が考えられる。

(5)miRNA の mutation や発現異常が種々の癌に見られることが報告されており、miRNA が癌抑制遺伝子や癌遺伝子としての機能を有していることが示唆されていた。Calin らは多数の miRNA に関して染色体上の局在を調べ、多くの miRNA が癌に密接に関連していると報告した(Calin GA. Et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(9):2999-3004)。当初の解析では、大部分の miRNA は正常組織に比べ、癌組織でその発現が低下しており、多くの miRNA は癌抑制的に機能していると考えられたが、癌組織において発現が上昇している miRNA も複数報告された。このように miRNA の機能はまだ混沌としており、個々の癌における詳細な検討はほとんど行われていないのが現状である。

(6)Epstein-Barr virus(EBV)関連胃癌は胃癌全体の 8~11%を占め、組織学的には低分化ないし中分化型腺癌の組織像を呈し、高度なリンパ球浸潤を伴うことが特徴的であり、WHO 分類においてはリンパ上皮腫様胃癌(lymphoepithelioma-like carcinoma)に相当する。

EBV 関連胃癌では癌抑制遺伝子を含むさまざまな遺伝子(p14, p16, p73, PTEN, E-cadherin)において高頻度に遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が起こる。これらのエピジェネティックな異常による遺伝子発現異常が発癌における重要な役割を果たしていると考えられている。

(7)E-cadherin は上皮細胞間の接着を維持する上で重要な役割を果たしている。E-cadherin の発現低下による上皮細胞間接着の破綻は、発生の過程における上皮間葉転換(epithelial to mesenchymal transition, EMT)や癌の浸潤・転移機構における重要なステップとしてこれまでさまざまな研究がなされてきた。EBV 関連胃癌においてもしばしば E-cadherin の発現低下が見られ、癌の発生、浸潤に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

(1)胃癌のなかでも組織学的特徴を有する EBV 関連における miRNA の役割を解析する。

(2) 癌の発生および進展のどの段階に miRNA が関与しているかを検討する。

(3)miRNA が時空間的に制御されているとい

う点に着目し、DNA メチル化などのエピジェネティックな変化による遺伝子発現調節機構との関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)microRNA array analysis : スクリーニングのため、2 種類の胃癌培養細胞株およびそれらの EBV 感染胃癌培養細胞株(下記詳述)の計 4 株を用いて、miRNA array を行う。

(2)EBER- In situ hybridization, 免疫組織化学的検討 : 手術検体 36 例(EBV 関連胃癌 18 例、EBV 胃癌陰性 18 例 : 計 36 例)から得られた組織切片において、EBER-ISH を用いて、腫瘍細胞の EBV 感染の有無を確認。それぞれの症例につき、抗 E-cadherin 抗体(clone NCH-38, Dako)を用いて免疫組織学的検討を行う。

(3)胃癌培養細胞株に対する EBV 感染 EBV 陰性の胃癌培養細胞株(MKN7, MKN74, NUGC-3)に対して、cell-to-cell contact method を用い、EBV 持続感染株(MKN7-EBV, MKN74-EBV, NUGC3-EBV)の作成を行った。

(4)microRNA 200family の発現解析

miRNA 抽出

ホルマリン固定、パラフィン包埋された胃癌手術検体から RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues(Ambion)を用いて miRNA 抽出を行う。薄切した切片から癌の部分のみ、あるいは正常粘膜のみを dissection したものを用いた。胃癌細胞株からの miRNA 抽出には mirVana miRNA Isolation Kit を用いた。

定量的 RT-PCR

手術検体、胃癌培養細胞株から得られた miRNA を用いて、miR-200a および miR-200b の発現を定量した。発現量を標準化するための内因性コントロールとして、small RNA の一つである RNU6B を同時に定量した。また、ZEB1, ZEB2 の mRNA 定量においては、TaqMan Gene Expression assays(Applied Biosystems)に含まれる設計済みプライマーを用い、GAPDH を内因性コントロールとした。miRNA, mRNA の PCR には 7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いた。

(3)E-cadherin の発現制御に関する分子生物学的検討

Western blotting

胃癌培養細胞株における E-cadherin の Western blotting には、免疫組織化学的検討に用いた抗 E-cadherin 抗体(clone NCH-38, Dako)を用いた。Lysis buffer を用いて蛋白

抽出を行い、標準的な手法によって反応、発行させ、イメージアナライザーを用いて検出した。

miRNA 前駆体分子(Pre-miR)の導入
成熟型 miRNA が切り出される前の段階である前駆体分子を化学的に合成した Pre-miR-200a, Pre-miR-200b(Pre-miR Precursor Molecules, Ambion)を MKN74-EBV に導入した。導入する際の Pre-miR 分子の最終濃度は、1. Pre-miR-200a のみ 20nM、2. Pre-miR-200b のみ 20nM、3. Pre-miR-200a 20nM と Pre-miR-200b 20nM の 3 パターンについて検討した。

脱メチル化剤処理

脱メチル化処理前日に MKN-74-EBV 細胞を 10cm dish に播き、24 時間後に 10 μ M の脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine(5-Aza; Sigma)を含む RPMI1640 培地に交換し、その後 24 時間ごとに新しい培地に交換し、72 時間後に細胞を回収した。

EBV 潜伏感染遺伝子導入

EBV 潜伏感染遺伝子をそれぞれ導入した MKN74 細胞株 (MKN74-BRAF, MKN74-EBERa, MKN74-EBNA1, MKN74-LMP2A) と empty vector を導入した MKN74-EV を作成した。

(5)統計学的解析

各症例における臨床病理学的因子と E-cadherin の免疫組織化学的検索に基づいた発現の有無との相関の解析には主に Fisher's exact test または χ^2 test を用いた。miR-200a, miR-200b 発現量、年齢および腫瘍径などの連続変数を含むデータの解析には Student's t-test、分散分析(ANOVA)、Pearson's correlation coefficient あるいは Spearman rank correlation を、病期などの順序変数を含むデータの解析には Mann-Whitney U test を用いた。

4. 研究成果

(1)microRNA array analysis により検索したところ EBV 感染細胞株において miR-200 family に属する、miR-200a, miR-200b の発現が低下していることが明らかになった。

(2)胃癌における E-cadherin および microRNA 200 family の発現と臨床病理学的因子の解析：

胃癌の組織像を Lauren 分類に従って分類したところ、EBV 関連胃癌では Diffuse type が多く、Intestinal type は少数であり、EBV 陰性胃癌における組織像と比較すると、EBV の有無による組織像の違いに統計学的な有意差を認めた。

EBV 関連胃癌手術検体では EBV 陰性胃癌に比べて、有意に miR-200a, miR-200b が減弱していた (p=0.0107, and 0.002,

respectively)。また、EBV 関連胃癌症例における非癌部組織と比較しても、有意な減弱を認めた (p=0.003, and 0.0001, respectively)。年齢、性別、腫瘍径、病期、脈管侵襲、リンパ節転移との間に相関はなかった。

E-cadherin の発現パターンおよび Lauren 分類による組織型と miR-200a, miR-200b の発現量との相関について検討した。E-cadherin の発現が減弱している症例では保たれている症例に比べて、miR-200a, miR-200b の発現が減弱する傾向を認めた (p=0.05, and 0.06, respectively)。

(3)microRNA 200 family による E-cadherin の発現制御：

胃癌細胞株における E-cadherin の発現を Western blotting により検討した。いずれの EBV 持続感染株において、元の細胞株に比べて E-cadherin 発現が低下していた。これらの細胞株について quantitative RT-PCR により miR-200a, miR-200b の発現量を定量すると、いずれの EBV 持続感染株においても元の細胞株より miR-200a の発現が有意に低下していた。また、MKN7, MKN74 の EBV 持続感染株においては miR-200b の発現も有意に低下していた。

さらに miR-200 family のターゲット遺伝子であり E-cadherin の転写抑制因子でもある ZEB1, ZEB2 の発現量を quantitative RT-PCR により調べたところ、ZEB1 に関しては MKN7, MKN74, NUGC3 の EBV 持続感染株において、ZEB2 に関しては MKN74, NUGC3 の EBV 持続感染株において、元の細胞株より有意に発現が上昇していた。

細胞形態を観察すると、MKN74 とその EBV 持続感染株において顕著な違いを認めた。MKN74 は細胞接着性が強固で、島状にコロニーを形成して増殖するのに対し、MKN74-EBV では細胞相互の接着性が失われ、個々の細胞がバラバラに増殖しており、E-cadherin の免疫組織化学的検討を行うと、MKN74 で見られる細胞膜への強い染色性が、MKN74-EBV では消失していることが確認された。

(4) miRNA 前駆体分子(Pre-miR)の導入

EBV 感染によって miR-200 family の発現が低下し、ZEB1/ZEB2 の発現が亢進し、E-cadherin の発現が低下するという現象を最もよく反映している MKN74-EBV に対して、miR-200a, miR-200b の前駆体分子である Pre-miR-200a, Pre-miR-200b を導入して、ZEB1, ZEB2, E-cadherin の発現変化を quantitative RT-PCR により調べた。Pre-miR-200a, Pre-miR-200b, およびその両方を導入した場合のいずれにおいても、Negative control を導入した場合に比べ、ZEB1 の発現が有意に低下し、E-cadherin の発現が有意に上昇した。

また、Pre-miR-200a を導入することにより ZEB2 の発現が有意に低下した。

(5)E-cadherin の発現におけるエピジェネティック異常の影響についての検討：
MKN74-EBV に 5-Aza 処理を行い、E-cadherin, ZEB1, ZEB2, miR-200a, miR-200b の発現変化を quantitative RT-PCR により検討した。E-cadherin の発現は、5-Aza のみで処理した群では、薬剤処理のない群に比べて統計学的に有意な発現の上昇を認めたが(p=0.0465)、実際の発現量は薬剤処理のない群の 1.35 倍であり、変化率はわずかであった。ZEB1, ZEB2 は発現が軽度上昇したが、統計学的な有意差はなかった。miR-200a, miR-200b についても発現が軽度上昇する程度であった。

(6)EBV 潜伏感染遺伝子導入による microRNA 発現制御機構の検討：EBV 潜伏感染遺伝子をそれぞれ導入した MKN74 細胞株(MKN74-BRAF, MKN74-EBERa, MKN74-EBNA1, MKN74-LMP2A)を用いて E-cadherin, ZEB1, ZEB2, miR-200a, miR-200b の発現変化を検討した。潜伏感染遺伝子の導入により、種々の程度に miR-200 family 発現が低下する一方、ZEB1, ZEB2 発現が上昇し、E-cadherin 発現が低下していた。

・本研究では、EBV 関連胃癌において特異的に miR-200a, miR-200b の発現が低下していること、および E-cadherin の発現が現弱していることを、胃癌手術検体の免疫組織化学的検討によって示した。さらにこの現象が胃癌培養細胞株 MKN74 とその EBV 持続感染株(MKN74-EBV)において再現され、miR-200 family による E-cadherin の発現制御が ZEB1, ZEB2 を介することを明らかにした。E-cadherin の発現の低下は上皮細胞間接着の低下をもたらす、癌の発生、浸潤・転移に関わる重要な因子であり、EBV 関連胃癌における発癌、浸潤能の獲得に寄与していると考えられる。

・EBV 関連胃癌における E-cadherin の発現制御については、E-cadherin 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が関与していると報告されている。しかしながら、同一の症例内であっても採取部位により DNA メチル化を受けている程度が異なること、また少数ではあるが DNA メチル化が必ずしも E-cadherin の発現低下につながらない症例のあることが報告されている。本研究においても、エピジェネティックな発現制御の可能性を検討するために、MKN-74EBV において脱メチル化剤を行ったが、これによる E-cadherin の発現回復の程度はわずかであ

り、Pre-miR-200 を導入した場合の E-cadherin の発現回復に及ばなかった。以上より、少なくとも本研究で用いた MKN-74-EBV における E-cadherin の発現低下の第一義的な原因は DNA メチル化ではなく、miR-200 family の低下によるものと考えられた。

EBV 関連胃癌の発癌や形質発現において EBV 潜伏感染遺伝子が協調的に働き、それらが重要な役割を果たしていることを示したことにより、EBV によるウイルスは発癌のメカニズムの一端を解明したという点で、本研究の意義は大きいと考えられる。

以上の内容を後述する国内外の学会において発表し、権威ある英文誌に掲載予定となっている。

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 1 件)

Shinozaki A*, Sakatani T(* equal contribution), Ushiku T, Hino R, Isogai M, Ishikawa S, Uozaki H, Takada K, Fukayama M. Downregulation of microRNA-200 in Epstein-Barr Virus associated Gastric Carcinoma. **Cancer Res.** (in press) 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

坂谷貴司ほか Epstein-Barr ウイルス関連胃癌におけるマイクロRNA 発現異常の解析 第99回日本病理学会総会 2010年4月27-29日 東京

Takashi Sakatani et al. Expression of the micro-RNA family; a new role for miRNAs in the morphological changes of Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma. 99th USCAP annual meeting, 2010, March 20-26, Washington D.C.

篠崎綾, 坂谷貴司ほか EBV 関連胃癌における miR-200 family の低下は ZEB1, ZEB2 を介して CDH1 の発現を抑制する 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月1-3日 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂谷 貴司 (SAKATANI TAKASHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50431903