

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390342
 研究課題名（和文） 乳がん診断・治療におけるマイクロRNA発現プロファイルの応用
 研究課題名（英文） Application of microRNA profiling to breast cancer diagnosis and therapy
 研究代表者
 清水 一治（SHIMIZU KAZUHARU）
 京都大学・薬学研究科・教授
 研究者番号：50456836

研究成果の概要（和文）：

本研究では臨床応用に向けた乳癌のマイクロRNAの解析を行った。HER2陽性乳癌に対するハーセプチン作用機序に関わるマイクロRNAとしてmiR-26a/30bを同定し、それらがCCNE2を標的にし、乳癌の増殖抑制に関与していることを示した。また、miR200bクラスターのエピジェネティクス制御が乳癌上皮間質形質転換に関わり、ファイブロネクチンを標的とすることで細胞遊走能を制御していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we performed microRNA profiling for future application to breast cancer diagnosis and therapy. First, we identified miR-26a/30b as microRNAs involved in molecular mechanisms of trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. Mir-26a/30b inhibited cell growth of breast cancer cells by targeting CCNE2. Secondary, we demonstrated that epigenetical regulation of miR200b cluster is associated with epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. The miR200b cluster members inhibit cell motility by targeting fibronectin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、マイクロRNA、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

1998年FireらがRNA干渉という現象を報告して以来、RNAは、単に遺伝子から蛋白質発現への情報伝達者としてだけでなく、遺伝子発現を調節する機能をもった分子として捉えられるようになり、生命科学の分野に新しい展開が起こっている。中でも、細胞に内在する小分子RNAである、マイクロRNA（microRNA）は、標的遺伝子の3'UTR領域

に結合し、蛋白質翻訳阻害や遺伝子mRNAの分解といった機序で、遺伝子発現を調節しており、発生、分化、免疫、癌の領域に関与していることが、近年の研究で明らかになってきた。

我々は、医薬工連携、産学連携の研究のもと、ナノテクノロジーを用い、遺伝子発現を網羅的に高感度に検出するマイクロアレイ技術を開発し、その臨床応用に取り組んできている。近年になり、microRNAの発現をも、包括的に検出するマイクロアレイを

開発した。その高感度microRNAマイクロアレイチップのがんの臨床への応用が、本研究の目的である。

乳がんは、がん死亡数が、全世界で5番目、女性では最も多いがんである。その治療には、主に外科療法・薬物（ホルモン、化学療法剤）療法・放射線療法が行われてきている。乳がん初期治療における薬物補助療法の治療指針が、隔年でスイスのSt. Gallenで提唱されている。最新のSt. Gallenのガイダンスでは、乳がんをホルモン受容体状況により、内分泌反応性を3段階に、HER-2発現状況を2段階に分け、計6カテゴリーに分類した。また、再発のリスクを、腋窩リンパ節転移状況、組織学的腫瘍浸潤径、グレード、年齢、HER-2・ホルモン受容体状況および腫瘍周囲の脈管侵襲に基づき3段階に分けており、これらの組み合わせで分けられた各病型に適した治療法の選択をする事が、勧められている。我々もこれまで、術前術後の各種補助薬物療法の有用性に関して検討してきた。しかし、いくら現在コンセンサスが得られている患者層別化方法であるとしても、それぞれの病型で奏功例と非奏功例が出てくるのが現実で、テーラーメイド医療の確立には、より正確な患者の層別化と治療感受性の予測が必要である。St. Gallenのガイダンスでは、分子マーカーは、薬物の反応性に直接関係のある3分子（エストロゲン受容体:ER、プロゲステロン受容体:PgR、HER-2）しか採用されていない。そこで、本研究の目標の第1は、St. Gallenのガイダンスに用いられている因子とは独立した、しかもより正確な患者の層別化と治療感受性の予測に有用な、バイオマーカーとしてのmicroRNAを同定し、それを検証することである。

また、乳がんは、比較的根治率の高いがんであるが、一方、一旦遠隔転移をすると治癒を望むことは困難な疾患であり、再発後の10年生存率は5-10%、根治したと考えられる患者は全体のわずか2-5%程度である。しかし、歴史的には、新薬の登場に従って、再発後の生存期間は時代とともに徐々に延長してきた。その中で我々も、転移・再発後乳がんの薬物療法の効果の検討を行ってきた。このように、新しいタイプの治療薬を開発することは、予後不良な転移・再発後乳がんの治療成績を向上させる可能性があり、重要である。近年の研究で、microRNAの中には、発がんやがんの悪性度に関連するものが同定されつつある。また、microRNAは比較的小分子で生体内投与も可能であり、一分子で多くの遺伝子に影響を与えられることから、microRNAは診断のツールとしてだけでなく、治療にも応用できると期待されている。そこで、本研究の目標の第2は、乳がんの悪性度に関連するmicroRNAを同定し、がんmicroRNAに対する阻害RNAやがん抑制

microRNAそのものを用いた、乳癌に対する新しいRNA薬剤の開発である。

2. 研究の目的

上記の内容を実現するために、本研究では以下の課題を研究目的とした。

課題1. 乳癌治療感受性の予測の為のハーセプチン治療効果機序に関与するマイクロRNAの同定と、その同定されたマイクロRNAの機能解析

課題2. 乳がん治療感受性に関わるとされる、上皮間質形質転換に関するマイクロRNAの同定と、その同定されたマイクロRNAの機能解析

3. 研究の方法

課題1 乳癌治療感受性の予測の為のトラスツマブ治療効果機序に関与するマイクロRNAの同定と、その同定されたマイクロRNAの機能解析

(1)乳癌細胞株のゲノムHER2遺伝子座の増幅状態の確認

ゲノムPCR法にて、乳癌細胞株10株（MCF7, T47D, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HMC-1-8, MRK-nu-1, BT474, YMB1E, Hs578T,）と正常乳管上皮細胞（HMEC）のゲノムコピー数を測定した。

(2)乳癌細胞株のHER2発現の確認

同乳癌細胞株、正常乳管上皮細胞株にて、定量的RT-PCRでHER2発現量を定量した。

(3)ハーセプチン感受性試験

96ウェルプレートに細胞数が5000 cells/wellで播種して24時間後に、ハーセプチンを0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g/ml}$ となるように含む培地に交換した。その後48時間毎に各濃度のハーセプチンを含む培地に交換し、144時間後にWST-1試薬を加え450 nmにおける吸光度を測定した。

(4) miRNAマイクロアレイ解析

乳癌細胞株4株(MCF7, MDA-MB-231, SKBR3, BT474)をTrastuzumab (4 $\mu\text{g/ml}$)を含む培地で144時間培養してRNAを回収した。対照群はTrastuzumabと同様量のPBSを加えた培地で144時間培養した細胞を用いた。これら8つのサンプルにおける866種類のmiRNAの発現は3D-Gene miRNA Oligo chip (東レ)を用いて調べた。その結果はTaqmanアッセイにより検証した。

(5)ハーセプチン作用機序に関わるマイクロRNAの同定

ハーセプチン投与によりHER2陽性細胞株(SKBR3, BT474)で発現が変化しており、HER2陰性細胞株(MCF7, MDA-MB-231)で変動のないマイクロRNAを選択した。

(6)同定したマイクロRNAの機能解析

同定したマイクロRNAの合成オリゴを乳癌細胞

細胞株にトランスフェクションを行い、細胞増殖能をWST-1、細胞周期をpropidium iodide(PI)染色とFACS Calibur (BD Biosciences)で、アポトーシスをAnnexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences)とFACS Caliburで検討した。(7)同定したマイクロRNAの標的分子の同定標的遺伝子の探索には3種類のアルゴリズム(TargetScan、PicTar、miRanda)を用いた。標的遺伝子候補の3'UTRをpGL4.13ベクターのルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入し、dual-luciferase reporter assay system (Promega)にて検討した。

課題2. 乳がん治療感受性に関わるとされる、上皮間質形質転換 (EMT) に関するマイクロRNAの同定と、その同定されたマイクロRNAの機能解析

- (1) 乳癌細胞株のEMT分類
上皮形質マーカー (E-cadherin, Desmoplakin) 及び、間質形質マーカー (Vimentin, Fibronectin) を定量的RT-PCRで行い細胞株を分類して。
- (2) ゲノムワイドDNAメチル化解析
乳癌細胞株ゲノムDNAを使用し、高速シーケンサーによるMeDIP-seq法によって行った。
- (3) マイクロRNAプロモーター領域のDNAメチル化制御の解析
DNAメチル化状態はCOBRA法を用いて定量した。また、脱メチル化処理として5-Aza-dCを用いた。マイクロRNAの発現量はTaqmanアッセイを施行。
- (4) Transwellアッセイ
EMT関連の細胞形質としての細胞遊走能をTranswell法にて評価した。
- (5) マイクロRNAトランスフェクション、マイクロRNA標的分子の同定に関しては、課題1と同様。

4. 研究成果

課題1

- (1) 乳癌細胞株におけるHER2発現量とTrastuzumab感受性の評価
HER2のゲノムのコピー数と発現量には正の相関があり、HER2過剰発現細胞株2種類(SKBR3とBT474)とHER2低発現細胞株2種類(MCF7とMDAMB231)を選択した。これら4株を用いてTrastuzumab感受性試験を行った。その結果HER2過剰発現細胞株でのみTrastuzumabによる細胞増殖抑制がみられた。
- (2) HER2過剰発現細胞株でのみTrastuzumab処置で変動するmiRNAの同定
マイクロRNAマイクロアレイ法にて、HER2過剰発現細胞株でのみTrastuzumab処置によって発現量が増加するmiRNAを58種類同定した。定量性の高い定量RT-PCR法を用いて17種類のマイクロRNA発現について検証

すると、HER2陽性細胞でトラスツズマブ投与によりmiR-26aとmiR-30bが有意に発現上昇することが判明した。

(3)miR-26a/30bの細胞増殖抑制作用の検討
両HER2過剰発現細胞株においてmiR-26aとmiR-30bの一過性過剰導入により細胞増殖が抑制された。SKBR3ではmiR-26aとmiR-30bの過剰導入により、コントロール群に対して細胞数がそれぞれ50%前後に減少していた。一方でBT474ではともに20%以上の細胞数の減少が見られた。

(4)miR-26a/-30bの細胞周期への影響の検討
BT474ではmiR-26a/-30bの一過性の過剰導入により、G1期の増加とS期の減少(G1 Arrest)が起こっていた。一方、SKBR3ではmiR-26aによりG1 Arrestが起こっており、miR-30bでもG1期が増加する傾向が見られた。

(5)miR-26a/-30bのアポトーシスへの影響の検討
miR-26aの過剰導入により、初期アポトーシス細胞の割合が30%以上増加した。一方でmiR-30bの過剰導入によるアポトーシスへの影響は、僅かな増加にとどまった。

(6)miR-30bの標的遺伝子の同定
標的遺伝子予測アルゴリズムにより探索を行ったところ、細胞周期に関わる遺伝子CCNE2 (cyclin E2)、CCNA1 (cyclin A1)、CDC7 (cell division cycle 7 homolog)を見出した。これらの遺伝子の3'UTRを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、cyclin E2の3'UTRを組み込んだベクターではmiR-30bによってルシフェラーゼの発現が30%近く抑制されたが、他の遺伝子では顕著な抑制は見られなかった。

(7)まとめ1

トラスツズマブはHER2陽性細胞においてmiR-26a/-30b発現を更新させ、細胞周期のG1 arrestやアポトーシス誘導することで増殖抑制を引き起こしていると考えられる。また、miR-30bの標的分子としてCCNE2を同定した。

課題2

(1)乳癌細胞株のEMT分類とマイクロRNA発現

MDA-MB-231、Hs578T、HMC-1-8の3株が間質細胞形質を持ち、その他の細胞株は上皮細胞形質を持っていた。課題1で得られたマイクロRNA発現プロファイルをクラスター解析すると、この上皮細胞形質と間質細胞形質が大きく別のクラスターを形成することが判明し、このEMTに関連するマイクロRNAのリストを得た。

(2)ゲノムワイドDNAメチル化とマイクロRNAの統合解析

MeDIP-seq法データとマイクロRNAプロファイルから、DNAメチル化とマイクロ

RNA発現が負の相関しているものを抽出したところ、(1)でも上位にランクしたmiR-200b/a/429クラスターがその上位にランクしたことを見出した。

(3)miR200bクラスターのエピジェネティクス制御に関して。

miR200bクラスター上流のCpGアイランドのメチル化状態とmiR200bクラスター発現は負の相関をしており、メチル化状態のMB-231細胞を脱メチル化処置をするとその発現が回復した。

(4)miR200bの細胞遊走能制御

間質形質細胞株2株(MB-231, Hs578T)の細胞遊走は、上皮形質細胞株2株(MCF7, T47D)に比べて亢進していた。前者2株にmiR200b, 429を一過性に導入することでその遊走能が約40%抑制された。

(5)miR200bクラスターの標的分子の同定と機能解析

課題1と同様のアルゴリズムで、細胞遊走能に関連する因子としてファイブロネクチンを同定した。その3'UTRを導入したレポーターベクターを用いたところ、miR200b/429はファイブロネクチンを標的にしていることが判明した。また、ファイブロネクチン発現をsiRNAで抑制した場合、細胞遊走能が減衰した。

(6)まとめ2

乳がん細胞において、EMTはマイクロRNA発現を特徴付ける強力な因子であり、EMT関連マイクロRNAにはエピジェネティクス制御されているマイクロRNAを多く認めた。その中でmiR200bクラスターは、ファイブロネクチンを標的にすることで細胞遊走能を制御していることが判明した。

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6件)

1. 佐藤史顕、戸井雅和
microRNA発現解析技術の最近の進歩
血管医学、2011年8月号、in press. (査読なし)
2. Imanaka Y, Tsuchiya S, Sato F, Shimada Y, Shimizu K, Tsujimoto G. MicroRNA-141 confers resistance to cisplatin-induced apoptosis by targeting YAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma. J Hum Genet. 2011;56:270-6. (査読あり)
3. 佐藤史顕
TOPICS「がんにおけるマイクロRNAとエピジェネティクスの相互制御回路」
週刊「医学の歩み」、235巻8号、p884-5, 2010 (査読なし)
4. Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. Genome-wide analysis of

aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. BMC Genomics. 2010;11:137. (査読あり)

5. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. PLoS One. 2009;4:e5540. (査読あり)
6. 佐藤史顕、清水一治、辻本豪三。特集・がん化学療法個別化の現状と展望、トランスクリプトーム解析に基づくがん化学療法の最適化とゲノム創薬。医薬ジャーナル、2008、Vol. 44、No. 12、104-108 (査読なし)

〔学会発表〕 (計11件)

1. 3/29/2011, 日本薬学会 (静岡、東西日本大震災のため誌上開催)
乳癌におけるmiR-200b/a/429 clusterのEpigenetics発現調節と上皮間葉形質転換への関与
伊藤考晃、佐藤史顕、清水一治、辻本豪三
2. 3/29/2011, 日本薬学会 (静岡、東西日本大震災のため誌上開催)
Trastuzumabによる細胞増殖抑制に関与するmicroRNAの同定及び機能解析
市川雄大、佐藤史顕、寺澤和哉、清水一治、辻本豪三
3. 12/10/2010日本分子生物学会、日本生化学会合同大会 (神戸)
4P-1187, Bioinformatic identification of tissue specific microRNA targets by mRNA expression profile.
Fujiwara T, Tsuchiya S, Sato F, Shimada Y, Tsujimoto G, Shimizu K
4. 2009/12 日本分子生物学会 (横浜)
miR-X Contributes to Cisplatin Resistance of Esophageal Cancer cells.
今中由花子、土屋創健、佐藤史顕、嶋田裕、清水一治、辻本豪三
5. 11/28/2009
日本薬物動態学会第24回年会 (京都)
Symposium 4, " Key-technology in ADMETox
Next-generation High-throughput Sequencer and DNA Microarray as ADME Research Tools
Fumiaki Sato, Kazuharu Shimizu
6. 9/25/2009
日本人類遺伝学会第54回大会 (品川)
Education Program 2, 「ゲノム薬理学と個別化医療」
EP2-2 「発現プロファイルによるがんの個別化医療」
佐藤史顕、清水一治、辻本豪三
7. 2009/09/23 日本人類遺伝学会第54回大会

- (品川)、
#PA118、乳癌におけるエピジェネティクス調節されるマイクロRNAのゲノムワイド探索
佐藤史頭、類家慶直、伊藤考晃、辻本豪三、清水一治
8. 9/5/2009第41回日本臨床分子形態学会総会(神戸)
シンポジウム11「がんの診断と治療：分子生物学の貢献」
演題S11-4「癌におけるマイクロRNA発現のエピジェネティック制御」
佐藤史頭
9. 5/23/2009 日本エピジェネティクス研究会(東京)
#P-83 乳がんにおけるエピジェネティクス調節を受けるマイクロRNAの探索
佐藤史頭、類家慶直、辻本豪三、清水一治
10. 2009年4月
アメリカ癌学会第100大会、Denver
Sato E, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G, Shimizu K.
Repeatability and comparability of microRNA microarray.
11. 12/12/2008 日本分子生物学会(神戸)、Late-Breaking Abstract,
#4P-1510 Reproducibility and Quantitivity of microRNA microarray
Fumiaki Sato, Soken Tsuchiya, Kazuya Terasawa, Gozoh Tsujimoto, Kazuharu Shimizu

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 一治 (KAZUHARU SHIMIZU)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号：5 0 4 5 6 8 3 6

(2) 研究分担者

戸井 雅和 (TOI MASAKAZU)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：1 0 2 0 7 5 1 6
辻本 豪三 (TSUJIMOTO GOZOH)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号：8 0 1 7 2 0 1 3
佐藤 史頭 (SATO FUMIKAI)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：2 0 4 6 7 4 2 6
上野 貴之 (TAKAYUKI UENO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：4 0 4 5 2 3 6 2
土屋 創健 (TSUCHIYA SOKEN)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号：8 0 4 2 3 0 0 2