

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590350

研究課題名（和文）骨・軟骨悪性腫瘍に関わる microRNA の同定とその生物学的意義の解析

研究課題名（英文）Significance of miRNA in oncogenesis of soft part tumors.

研究代表者

佐藤 孝 (SATO TAKASHI)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20170756

研究成果の概要（和文）：近年、蛋白質をコードしないnon-coding RNAであるmiRNAが、蛋白質の翻訳抑制に働いていることが明らかとなり、post-transcriptionalな発現制御機構として注目を浴びている。miRNAは、mRNAと完全相補鎖を形成する場合にはmRNAの分解に働き、一部ミスマッチが認められる場合には翻訳抑制が起きる。miRNAは、発生や細胞分化の研究分野で精力的に解析が進んでおり、がん関連遺伝子の発現制御に関わるmiRNAも次々に特定されている。我々は、骨肉腫においてmiR-127の標的であるBCL6がそのfamilyであるNACC1の機能制御に関与している事を明らかにした。骨肉腫の発生・進展過程にはmiRNAの異常や蛋白質の翻訳後修飾によるゲノム非依存性の機構が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs whose aberrations are involved in the initiation and progression of human cancers. To seek unique miRNAs contributing to the development of osteosarcoma, we investigated the global miRNA expression profile. We focused on a commonly down-regulated miRNA, miR-127, and analyzed its relationship with the expression of its potential target, BCL6 protein. We found that 5 of 8 (63%) osteosarcoma cell lines exhibited marked down-regulation of miR-127 in comparison with the remaining cell lines and normal cultured osteoblasts. An inverse correlation between miR-127 and BCL6 protein expression was found in the osteosarcoma cell lines and primary-cultured normal osteoblasts. We demonstrated that overexpression of miR-127 induced a reduction of the BCL6 protein level, and confirmed target specificity between miR-127 and BCL6 by the luciferase reporter assay. Immunohistochemical analysis of BCL6 protein revealed that about half of the primary osteosarcomas (13/25, 52%) showed BCL6 overexpression, whereas normal osteoblasts were completely negative. The disease outcome of BCL6-positive patients was significantly worse than that of BCL6-negative patients ($p < 0.05$). These results suggest that gain of BCL6 protein expression through the repression of miR-127 expression may be partly involved in osteosarcoma development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨肉腫、軟骨肉腫、がん抑制遺伝子、がん遺伝子、miRNA

1. 研究開始当初の背景

近年, 蛋白質をコードしない non-coding RNA である miRNA が, 蛋白質の翻訳抑制に働いていることが明らかとなり, 注目を浴びている. miRNA は, mRNA と完全相補鎖を形成する場合には mRNA の分解に働き, 一部ミスマッチが認められる場合には翻訳抑制が起きる. miRNA は, 発生や細胞分化の研究分野で精力的に解析が進んでおり, がん関連遺伝子の発現制御に関わる miRNA も次々に特定されている.

がんの発生臓器, 組織型を超えて共通にみられる miRNA の異常も存在するが, むしろ, がん特異性を持って発現変動している miRNA が多い. Lu らは, 200 余りの miRNA について, 334 個のヒト悪性腫瘍を解析して, 腫瘍の組織型による発現プロファイルに違いのあることを明らかにした.

我々は, 骨・軟骨系の悪性腫瘍において特異的に発現異常の見られる miRNA の特定を目指して研究を展開した.

2. 研究の目的

骨・軟骨悪性腫瘍において microRNA (miRNA) の発現プロファイルを作成し, がん関連遺伝子の発現制御に関わる miRNA を特定する. さらに, 個々の miRNA の細胞生物学的意義を検証し, 骨・軟骨悪性腫瘍の発生・進展に関する生物学的意義を明らかにする.

3. 研究の方法

(1) 培養細胞学.

9 種類の骨肉腫培養細胞株を用いた (U2OS, G292, HOS, Hu09, MG-63, NY, Hu0-3N1, SaOS-2; Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan, and Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan; ATCC, Manassas, VA, USA). さらに 2 種類の正常 osteoblast の初代培養細胞株を用いた (HOB-c, Promo Cell GmbH, Heidelberg, Germany; and NH0st, Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA).

(2) ヒト骨肉腫原発巣の免疫染色

25 例の骨肉腫について免疫染色を行った. Ventana Medical Systems 社 (Tucson, AZ, USA) 製の自動免疫染色システムで, BCL6 蛋白の免疫染色を行った. 一次抗体は anti-BCL6 (D-8) (sc-7388, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いた.

(3) miRNA の定量

Total RNA を *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems; ABI, Foster City, CA, USA) を用いて抽出した. DNA oligonucleotide probes from the *mirVana*TM miRNA Probe Set (Ver. 1.01, ABI) を用いて miRNA microarray を行った. これとは別に TaqMan MicroRNA Assay Human Panel-Early Access Kit (including 157 miRNAs and 3 negative controls) (ABI) を用いて定量した. おのおの解析には, GenePix 4000B Array Scanner (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) および Array-Pro Analyzer Ver. 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) あるいは ABI prism 7500 を用いた.

(4) リポーターアッセイ

miRNA の標的配列の決定のために pMIR-REPORTTM vector を用いてリポーターアッセイを行った.

(5) 統計解析

生存率の解析には Kaplan-Meier survival analysis および log-rank test を用いた.

4. 研究成果

(1) 培養細胞株における miRNA の発現

Microarray と real-time PCR 法による定量結果は複数の miRNA で一致しなかった. このことは microarray の方法が oligo を用いた hybridization 法に依存するところが大きいと考えられた. そこで, 我々は real-time PCR 法による解析結果に基づいて以下の解析を行うこととした.

骨肉腫培養細胞株と正常骨芽細胞株を Real-time PCR 法で比較したところ, 18 個の miRNA に発現低下, 8 個の miRNAs で発現上昇を認めた. このうち我々の興味ある標的として, エピジェネティクスに関連する miR-127 が報告されており, この miRNA に着目して以下の解析を進めた.

(2) miR-127 の発現と BCL6 の発現の相関

半数の骨肉腫培養細胞株では, miR-127 の発現低下が認められた. miR-127 の発現が低下している細胞株では BCL6 の過剰発現が確認された.

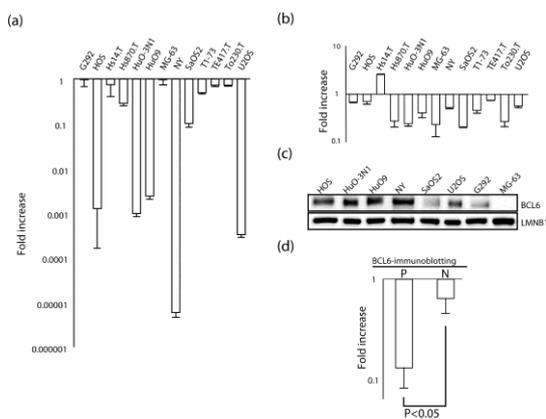


Fig. 1

(3) miR-127 の発現誘導による BCL6 の発現の変化

miR-127 の発現低下のみられる U2OS と NY に miR-127 の precursor を遺伝子導入した。結果として、BCL6 の発現低下が認められた。

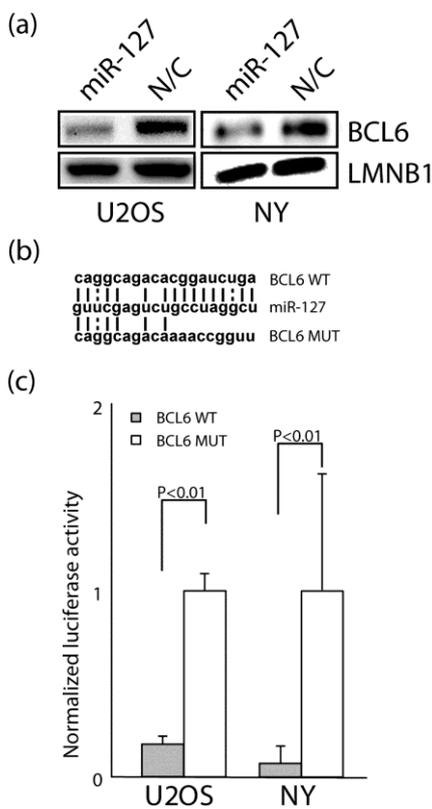


Fig. 2

またリポーターアッセイでは、シード配列を欠いた reporter では有意の発光量減少が見られた。

(4) miR-127 の発現に関するエピジェネティクス解析

miR-127 の発現が epigenetics によって制御されていることが報告されていたので、脱メチル化剤処理および HDAC inhibitor 処理を行い miR-127 の発現を検討した。miR-127 の発現は DNA のメチル化によらず、ヒストンのアセチル化による可能性が示唆された。

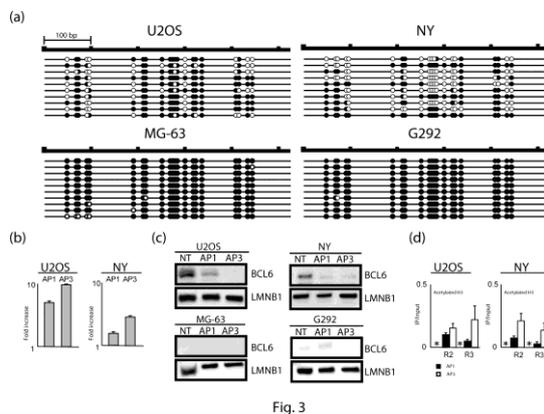


Fig. 3

(5) BCL6 の発現と骨肉腫の予後解析
骨肉腫における BCL6 の発現は約半数で過剰発現しており、骨芽細胞は陰性であった。

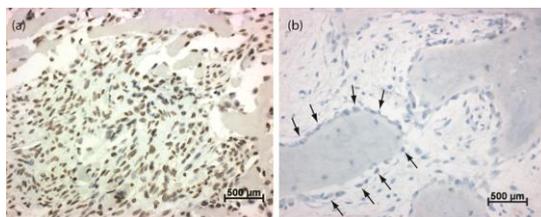


Fig. 4

また、BCL6 を過剰発現する骨肉腫は有意に予後不良であった。

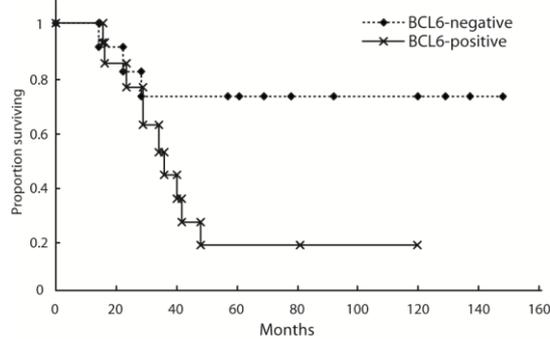


Fig. 5

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 17 件)

1. E. Sakurai, C. Maesawa. Down-regulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in melanoma cells. *Int J Oncol*, in press (2011)
2. K. Tsunoda, H. Oikawa, H. Tada, Y. Tatemichi, S. Muraoka, S. Miura, M. Shibazaki, F. Maeda, K. Takahashi, T. Akasaka, T. Masuda, C. Maesawa, Nucleus Accumbens-Associated 1 Contributes to Cortactin Deacetylation and Augments the Migration of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*, in press (2011).
3. Toshiyasu, S. Ehara, T. Yamaguchi, J. Nishida, H. Shiraishi, Dedifferentiated liposarcoma of the retroperitoneum with osteosarcomatous component: report of two cases. *Clin Imaging* 33 (2009) 70-74.
4. Y. Tatemichi, H. Oikawa, C. Maesawa, J. Ambo, M. Sato, H. Koike, T. Sata, T. Fujioka, T. Masuda, Detection of human papillomavirus in a urothelial carcinoma mimicking urethral caruncle. *Int J Urol* 17 (2010) 189-191.
5. T. Takahashi, K. Takahashi, M. Yamashina, C. Maesawa, T. Kajiura, H. Taneichi, N. Takebe, Y. Kaneko, T. Masuda, J. Satoh, Association of the TNF- α -C-857T polymorphism with resistance to the cholesterol-lowering effect of HMG-CoA reductase inhibitors in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33 (2010) 463-466.
6. H. Oikawa, K. Hayashi, C. Maesawa, T. Masuda, K. Sobue, Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316 (2010) 940-950.
7. A. Miyamoto, K. Akasaka, H. Oikawa, T. Akasaka, T. Masuda, C. Maesawa, Immunohistochemical Study of HER2 and TUBB3 Proteins in Extramammary Paget Disease. *Am J Dermatopathol* (2010).
8. K. Yamauchi, H. M. Piao, T. Nakadate, T. Shikanai, Y. Nakamura, H. Ito, T. Mouri, H. Kobayashi, C. Maesawa, T. Sawai, H. Ohtsu, H. Inoue, Enhanced goblet cell hyperplasia in HDC knockout mice with allergic airway inflammation. *Allergol Int* 58 (2009) 125-134.
9. A. D. Russa, C. Maesawa, Y. Satoh, Spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations in G1/S phase-synchronized cells. *J Electron Microsc* (Tokyo) 58 (2009) 321-329.
10. T. Satoh, E. Sakurai, H. Tada, T. Masuda, Ontogeny of reticular framework of white pulp and marginal zone in human spleen: immunohistochemical studies of fetal spleens from the 17th to 40th week of gestation. *Cell Tissue Res* 336 (2009) 287-297.
11. Y. Nagata, C. Maesawa, H. Tada, Y. Takikawa, A. Yashima-Abo, T. Masuda, Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. *Int J Mol Med* 24 (2009) 35-43.
12. Y. Minami, M. Satoh, C. Maesawa, Y. Takahashi, T. Tabuchi, T. Itoh, Nakamura, Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 39 (2009) 359-367.
13. K. Kato, C. Maesawa, T. Itabashi, K. Fujisawa, K. Otsuka, S. Kanno, H. Tada, Y. Tatemichi, K. Kotani, H. Oikawa, T. Sugai, G. Wakabayashi, T. Masuda, DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. *Int J Oncol* 35 (2009) 467-476.
14. K. Akasaka, C. Maesawa, M. Shibazaki, F. Maeda, K. Takahashi, T. Akasaka, T. Masuda, Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 129 (2009) 1516-1526.
15. S. Mitomo, C. Maesawa, S. Ogasawara, T. Iwaya, M. Shibazaki, A. Yashima-Abo, K. Kotani, H. Oikawa, E. Sakurai, N. Izutsu, K. Kato, H. Komatsu, K. Ikeda, G. Wakabayashi, T. Masuda, Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 99 (2008) 280-286.
16. N. Izutsu, C. Maesawa, M. Shibazaki, H. Oikawa, T. Shoji, T. Sugiyama, T. Masuda, Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 32 (2008) 1227-1235.

17.H. Itabashi, C. Maesawa, H. Oikawa, K. Kotani, E. Sakurai, K. Kato, H. Komatsu, H. Nitta, H. Kawamura, G. Wakabayashi, T. Masuda, 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 38 (2008) 601-613.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 孝 (SATO TAKASHI)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20170756

(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

西田 淳 (NISHIDA JUN)

岩手医科大学・医・講師

研究者番号：2019846

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：