

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591714

研究課題名（和文） 食道扁平上皮癌における SnoN と miRNA に関する分子生物学的解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of SnoN and microRNA in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

宮下 正夫 (MIYASHITA MASAO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229847

研究成果の概要（和文）：

食道癌においてSnoNの標的miRNAを検討した。食道癌細胞株にてsiRNAでSnoN発現を抑制し、miRNAアレイ解析で発現が変化したmiRNAを3種（miR-720, miR-1274A, miR-1274B）同定、これらの標的遺伝子としてp63, ADAM9を抽出した。また、SnoNの強制発現にてmiRNA発現がSnoN発現と正に相関するが、増殖効果に関してはさらに検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

The target miRNAs for SnoN were investigated in esophageal cancer. Using human esophageal cancer cell lines, SnoN expression was inhibited using siRNA, and altered miRNAs were identified as miR-720, miR-1274A, miR-1274B with p63 and ADAM9 as the possible relevant genes. The induction of SnoN expression was positively correlated to miRNA expression. However, the effect of SnoN expression on cell growth is still unclear and needs further investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：食道外科学

1. 研究開始当初の背景

近年、20数塩基ほどのRNAからなる低分子RNAが注目を集めているのは周知の事実である。低分子RNAのうち、mRNAの翻

訳抑制機能をもつmiRNAがヒト器官の発生、分化やがんの発生、増殖に関与している。我々の研究グループは、がんをはじめとした消化器疾患における低分子

RNAをもちいて分子生物学的研究を進めてきた。また、我々の研究グループは、食道扁平上皮がん3q26領域の遺伝子増幅に着目し、この領域にSnaN遺伝子が関与していることを見出した。この蛋白発現が食道扁平上皮がんの進行、予後に影響を及ぼしていることを報告した(Ann Surg Oncol 15:2965-75, 2008)。SnoNはSmadを解してTGF- β シグナルを抑制し細胞のアポトーシスに影響を与えることが知られている。異型性を伴う

Barrett食道上皮においてSnoN蛋白がBarrett食道がんの発生や増殖に関与することが報告されている。

一方、miR-410、miR-579、miR-330、miR-664、miR-412がSnoNの発現を調節することが示唆されていることから、食道がんの増殖におけるSnoNならびにそのシグナル伝達系においてmiRNAの関与が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究において、分子生物学的側面から食道がんに関連のあるSnoNの新たなターゲットとなるmiRNAを検索し、その機能を明らかにすることを目的としている。すなわち、SnoNが食道がん細胞株におけるmiRNAの動態にどのような影響を与えるかを解析すると共に、そのターゲットとなるmiRNAを同定し、がん細胞の増殖、抑制実験によりその機能を明らかにすることでSnoNが関与する転写後調節機構を明らかにすることを目的とする。この研究は、食道がんのみならず、他臓器のがんに対する新たな分子ターゲット治療につながる可能性を秘めた基盤研究となる。

3. 研究の方法

食道扁平上皮がん細胞株とSnoNをknock downさせた食道扁平上皮がん細胞株それぞれからtRNAを抽出してそれぞれのmiRNA profilingを行った。また、得られたprofilingからSnoN knock downによって変動したmiRNAを拾い上げて、細胞株を利用したそれらのmiRNA抑制過剰発現実験を行った。

miRNAクローニング

(1) 18-26塩基長のRNAの分離

RNAを電気泳動し、24-32baseよりゲルを切り出してRNAを溶出する。

(2) 3'リンカー結合

(5' /5Phos/rCrUrGrUAGGCACCATCAATdi-deoxyC-3')

(1)にて得られたRNAにT4 RNA ligaseを用いて3'リンカーを結合する。その後電気泳動し、41-49baseよりゲルを切り出し、(A)と同様に溶出する。

(3) 5'リンカー結合

(5' -ATCGTrArGrGrCrArCrCrUrGrArArA-3')

(2)にて得られたmiRNA - 3' linker 結合産物にT4 RNA ligaseを用いて5'リンカーを結合する。その後電気泳動し、58-64baseよりゲルを切り出し、(1)と同様に溶出する。

(4) 逆転写

逆転写キット(ABI: Archive kit)にて下記特異的逆転写プライマーを用いてcDNA合成を行う。

(5) 1st PCR

(4)にて得られたcDNAを鋳型として、PCRを行い電気泳動し、60base前後のバンドを切り出す。その後(1)と同様にゲルからPCR産物を溶出する。

(6) 2nd PCR

(5)にて得られた1st PCR産物を鋳型とし、(5)と同様にPCR反応を行う。

(7) concatenation

(6)で得られたPCR産物を制限酵素処理しDNA ligase反応(16°C、30分)を行う。その後電気泳動し、1000bp以上より結合産物をゲル精製する。

(8) TA クローニング

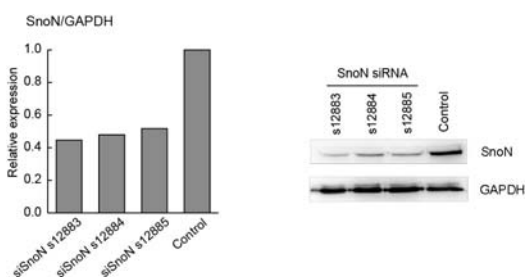
(7)で得られたゲル精製産物に対して、ExTaq DNA polymerase hot start version 16 μ l系にて3'末端dATP付加しTOPO TA cloning kit for sequenceに上記産物を組み込み、competent E. coliを形質転換する。コロニーよりRolling Cycle Amplification (RCA)法によりシーケンスを行う。

上記方法にてSnoN遺伝子knock down前後のmiRNA profilingを作成し、有意に変動するmiRNAを拾い上げる。今年度は特にこれまで得られた結果を繰り返し確認するとともに新たな細胞株を用いて同様の作業を行う。その後、有意に変動する特定のmiRNAを抑制・過剰発現させることでそれらのmiRNAの網羅的機能解析を行う。また、これまで得られた食道がん患者の悪性度に関連するとして拾い上げたmiR21、miR205、miR143、miR145についても合わせ検討する。

4. 研究成果

実験計画に従い、食道癌における転写補助因子SnoNの関与を研究するために以下の実験を遂行し実績を得た。

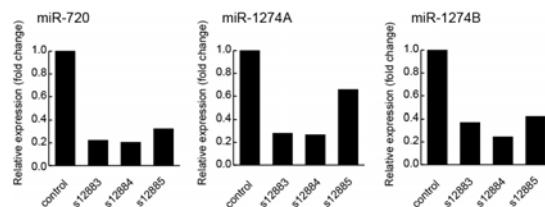
(1)食道扁平上皮癌の細胞株 (TE-1, TE-8)を用いてRNA干渉 (siRNA) によるSnoNの抑制実験を行った。その結果として、SnoNの約70%の発現抑制をRNA, タンパクレベルで確認



した

(左下図：左 MessengerRNAレベルでの抑制を確認した。右：蛋白レベルでの抑制を確認した。)

(2)発現抑制したRNAを抽出しTaqMan Array Human microRNA A+B Cards set v3.0でmicroRNAアレイ解析を行った。SnoNの抑制により有意に発現値が変動したmicroRNAを3種 (miR-720, miR-1274A, miR-1274B) 同定した。(下図：snoNをSiRNA (s12883-12885)にて抑制するとターゲットとなる各miRNAの発現も有意に低下する。)



(3)これらのmicroRNAがターゲットとする遺伝子を探索した。探索方法としてTargetscanによるコンピューター予測や過去の論文で証明されているターゲットタンパクを抽出した。これらによりp63, ADAM9を抽出した。

(4)細胞株においてSnoNの強制発現を行い、RNAおよびタンパクレベルでmiRNAの発現値がSnoNの発現と正に相関することも確認した。さらに、SnoNをノックダウンし食道癌細胞株にて増殖能を検討したところ、SnoNが増殖を抑制していることが示唆された。

SnoNの関与するmiRNAを同定し、そのターゲットの抽出まで達成した。現在、ターゲットタンパクの機能解析を進めていく段階である。今後、同定されたターゲットタンパクの詳細な機能解析を行い、SnoNがmiRNAを介して関与する調節機構を詳細に研究する予定である。

研究者番号：00328824

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)

1. Akagi I, Miyashita M, Ishibashi O,
Mishima T, Makino H, Nomura T, Hagiwara N,
Uchida E, Takizawa T.
Relationship between altered expression
levels of MIR21, MIR143, and MIR205 and
clinicopathologic features of esophageal
squamous cell carcinoma.
Dis Esophagus 2011, 24(7): 523-530
doi: 10.1111/j.1442-2050.2011.01177.x.

[学会発表] (計1件)

1. 萩原信敏、宮下正夫、他8名、
食道扁平上皮癌における MIR21, MIR143,
MIR145, MIR205 の発現の意義。
第110回 日本外科学会。
2010年4月8日, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 正夫 (MIYASHITA MASAO)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：70229847

(2) 研究分担者

瀧澤 俊広 (TAKIZAWA TOSHIHIRO)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90271220

石橋 宰 (ISHIBASHI OSAMU)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：70293214

牧野 浩司 (MAKINO KOUJI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30267207

野村 務 (NOMURA TSUTOMU)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60287737

萩原 信敏 (HAGIWARA NOBUTOSHI)
日本医科大学・医学部・助教

(3) 連携研究者

赤城 一郎 (AKAGI ICHIRO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：90552662