

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790694
 研究課題名（和文） miRNA発現ベクター及びDNAマイクロアレイを用いたヒト膵癌新規治療標的の探索
 研究課題名（英文） Exploration of novel therapeutic targets of human pancreatic cancers by miRNA expressing vectors and DNA microarrays
 研究代表者
 泉谷 昌志（IZUMIYA MASASHI）
 東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
 研究者番号：90532739

研究成果の概要（和文）：難治性固形癌の代表である膵癌の新規治療標的を探索することを目的とし、マイクロRNA発現ウイルスベクターライブラリーならびにDNAマイクロアレイを組み合わせたマイクロRNA機能スクリーニング系を構築した。これを用いて、膵癌細胞株の増殖を制御するマイクロRNAのスクリーニングを行い、とくに増殖を抑制するマイクロRNAを5種同定した。これらマイクロRNAならびにその標的は、膵癌の新規治療標的として有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To explore new therapeutic targets of pancreatic cancer, which is a representative hard-to-cure solid cancer, we developed a functional screening assay using microRNA expressing virus library and custom-made microarrays. Using this functional screening assay, we explored microRNAs that control proliferation of pancreatic cancer cells and identified five microRNAs that remarkably repress cell proliferation. These microRNAs and their targets appear to be promising novel therapeutic targets of pancreatic cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆道学、膵臓学

1. 研究開始当初の背景

ヒト膵癌（膵管上皮癌）は代表的な難治性固形癌であり、その予後は著しく不良である。大きさ2cm以下の切除可能な早期小膵癌であっても5年生存率は30%台であり、他臓器の癌とは異なり、早期発見による予後改善というアプローチに限界がある。また、遠隔転移

を伴う進行膵癌の場合、もっとも奏功する塩酸ゲムシタビンを含む化学療法でも生存期間中央値（MST）は6ヶ月程度、5年生存率はきわめて低率であり、分子腫瘍学的な解析をもとにした新しい膵癌治療法が切望されている。膵癌における遺伝子異常に関しては、すでにKRAS、TP53、SMAD4の異常が高頻度で

あることが以前から報告されているが、Kinzler、Vogelsteinらにより最近報告されたヒト膵癌検体の re-sequencing の結果では、これらを含む 12 の核となる経路が同定され、一つの膵癌の増殖には同時に様々な経路が相補的に関わっていることが示唆された。これは、白血病で良く見られるように、腫瘍の生存が一つの遺伝子異常に強く依存し (oncogene addiction)、分子標的治療薬が奏功するものとは対照的である。膵癌でこれら 12 のすべての経路を治療標的とする必要があるかどうかは明らかではないが、ヒト膵癌の新たな治療戦略においては、少なくとも複数の作用点を何らかの形で同時に治療標的とする必要があると考えられる。内因性の因子としてこの目的に適するものがマイクロ RNA である。マイクロ RNA は、22~24bp 程度の短い一本鎖 RNA であり、遺伝子から転写されるもののタンパクへは翻訳されない (non-coding RNA)。3' 非翻訳領域に相補的な配列を持つ mRNA へと結合し、タンパクへの翻訳を抑制または標的 mRNA 複合体を分解することで遺伝子発現を抑制する。一つのマイクロ RNA は、数百の mRNA を標的としており、マイクロ RNA の発現変化により複数の経路が変化し、結果として細胞内の遺伝子発現は広範な変化を来す。このような特徴を持つマイクロ RNA は、様々な癌で発現異常を来すことが報告されており、我々も大腸癌の増殖を抑制しヒト大腸癌検体の約 40% で発現が低下しているマイクロ RNA として microRNA-34a を同定し報告した。膵癌においても、その増殖を促進または抑制するマイクロ RNA を同定することにより、膵癌の増殖に対してとくに重要な経路の同定が期待されるだけでなく、そのようなマイクロ RNA 自体または locked nucleic acid (LNA) 等の人工核酸を用いた治療への応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、難治性固形癌の代表である膵癌 (膵管上皮癌) の新しい治療戦略を提供するために、内因性の遺伝子発現抑制機構であるマイクロ RNA で膵癌の増殖を促進または抑制する機能を持つものを同定し、膵癌の有効で新しい治療標的を明らかにすることを目的とするものである。

3. 研究の方法

①レンチウイルスベクターライブラリーならびに合成マイクロ RNA : 現在知られているヒトマイクロ RNA は数百にものぼるため、この各々が細胞増殖に与える効果を個別に検討することは困難である。そこで、445 種類のマイクロ RNA 前駆体を発現するレンチウイルスベクターライブラリーを膵癌

細胞株に感染させ、増殖に与える効果の一つの dish 上で並行して検証する。検出方法としては、カスタム設計した DNA マイクロアレイを用いる (次項に詳述)。膵癌細胞株の増殖を有意に促進または抑制するマイクロ RNA の候補が同定されたならば、この効果がレンチウイルスの膵癌細胞株ゲノムへの組み込みを介したものではないことを確認するために、*in vivo* で合成された対応する合成マイクロ RNA を導入し、同様の効果が見られるかどうかを検証する。なお、ウイルスベクターライブラリーならびに合成マイクロ RNA は、すでに実績のある市販のものを用いる。

②細胞の増殖を制御するマイクロ RNA のカスタム設計 DNA マイクロアレイを用いた同定 : 前項で述べたウイルスベクターライブラリー膵癌細胞株へ感染させ一定時間経過後、増殖促進的なマイクロ RNA を導入された細胞は増加し、増殖抑制的なマイクロ RNA を導入された細胞は減少する。このマイクロ RNA 導入に伴う細胞数の変化を効率よく検出するために、導入したマイクロ RNA を特異的に検出するオリゴヌクレオチドプローブを設計し、これを搭載した DNA マイクロアレイをカスタム作成し、CGH (comparative genomic hybridization) の原理を用いて、検出する。具体的には、(1)ライブラリー感染直後の細胞株の DNA と一定時間経過後の細胞株の DNA を異なる色素で蛍光標識し、(2)導入したマイクロ RNA 前駆体を特異的に検出するよう設計した DNA マイクロアレイ上のプローブに競合的にハイブリダイゼーションさせ、(3)レーザースキャナーで蛍光強度の比を算出すれば、あるマイクロ RNA が導入された膵癌細胞株の増殖の変化を反映していることになる。この蛍光強度比をもとに、増殖促進または抑制効果をもつマイクロ RNA を同定する。また、実験条件の最適化のため、予備実験としてウイルス導入の効率 (multiplicity of infection) ならびに、有意な変化と判定するための域値を同定するため、同一の DNA を別々の蛍光色素でラベル化し競合的にハイブリダイゼーションを行う self vs self の実験を行う。検出用 DNA マイクロアレイは、実績のある市販のカスタム CGH マイクロアレイのプロトコルならびにプラットフォームを応用する。

4. 研究成果

①マイクロ RNA 機能スクリーニング系の構築 : マイクロ RNA 発現ウイルスライブラリーならびにこれらを検出するカスタムマイクロアレイの組み合わせにより、マイクロ RNA 機能スクリーニング系を構築した。カスタムマイクロアレイは、レンチウイルスベクターの発現するマイクロ RNA 前駆体

(400~500bp 程度)のうち、stem-loop 以外のゲノム配列に特異的なプローブを設計した。eArray ソフトウェア (Agilent) を用いて、445 の前駆体に、それぞれ 2 種類、合計 890 種類のプローブを作成した。これらをそれぞれ 16 回繰り返し搭載したカスタムマイクロアレイを作成した (8x15k フォーマット、Agilent)。本スクリーニング系では、レンチウイルスベクターにより導入したマイクロ RNA を回収するために、ウイルスベクター配列に相補的な PCR プライマーを用いた PCR を行う。PCR においては、ウイルスライブラリーを感染させた細胞より抽出したゲノム DNA から、同一の PCR プライマーを用いて同時に 445 種類の異なる PCR 産物を増幅することから、PCR の過程で鋳型 DNA 中のマイクロ RNA クローン比が保たれることが重要となる。これを検証するために、さまざまな条件下で PCR の再現性を検討した。また、再現性を向上させるために PCR 産物をプールのすなわち、ウイルスライブラリーを感染させた細胞株より抽出した同一のゲノム DNA を鋳型とし、8 本の PCR チューブで独立に PCR を施行した。これらを 4 本ずつプールし、それぞれ Cy3、Cy5 でラベル化し、カスタムマイクロアレイ上にハイブリダイゼーションし、蛍光強度比を測定した。両者の相関係数は、0.944 と良好であり、半定量的なスクリーニング系としては十分であると判断した。

②膵癌抑制的マイクロ RNA の同定：膵癌細胞株 MIA PaCa-2 の増殖を制御するマイクロ RNA の同定を、前項で構築したマイクロ RNA 機能スクリーニング系を用いて試みた。4x10⁵ の MIA PaCa-2 に MOI (multiplicity of infection) 3 でウイルスライブラリーを感染させ、継大操作を繰り返した。ライブラリーの感染は独立して 2 回試行した。感染直後の細胞 (P1) より抽出した DNA ならびに 9 回継大後の細胞 (P9) より抽出した DNA を用いて、前項の要領でスクリーニングを行った。P1 vs. P9 の蛍光強度比を各クローン別に log₁₀ 比で表示した (図 1)。なお、ライブラリーの導入ならびに継代は独立して 2 回施行し、クローン比率の変化は 2 回の独立したスクリーニングの平均値で示した。継代操作中に、著しくその割合が低下した (log₁₀ < -1) マイクロ RNA クローンとして、5 種を同定した (miR-29b; miR-34a, miR-222, miR-224, miR-532)。これらスクリーニングで同定されたものについて、レンチウイルスベクターまたは合成マイクロ RNA を MIA PaCa-2 に導入し、細胞増殖アッセイ (細胞増殖曲線または MTS アッセイ) により個別に検証し、MIA PaCa-2 の細胞増殖抑制効果を確認した。

つぎに、これらマイクロ RNA による細胞増殖抑制効果の作用機序を解明する一端とし

て、propidium iodine (PI) 染色によるフローサイトメトリー解析を施行した。前記の合成マイクロ RNA 5 種を 10nM の濃度で MIA PaCa-2 へトランスフェクションし、48 ならびに 72 時間後に細胞を回収し、メタノールによる固定ならびに PI 染色後、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。5 種の細胞増殖抑制的マイクロ RNA の何れにおいても、アポトーシスを示す sub G1 fraction の優位な増加は明らかでなかった。一方で、miR-34a、miR-224、miR-532 を導入した MIA PaCa-2 においては G1 周期での停止が、miR-222 を導入した MIA PaCa-2 においては G2 周期での停止が見られた。これらマイクロ RNA による細胞増殖抑制効果は、アポトーシスによる細胞死ではなく、細胞周期の停止によるものであることが示された。今後、これら膵癌細胞株増殖抑制的マイクロ RNA を用いた核酸医薬として応用を検討することにより膵癌新規治療の手掛かりとなることが期待される。また、その詳細な機能解析や標的分子の同定をすすめることにより、既存の分子標的治療薬の手法を用いた新規治療標的を明らかにできることが期待される。



図 1：膵癌細胞株 MIA PaCa-2 の増殖を制御するマイクロ RNA のスクリーニング (縦軸は P9 vs. P0 の log₁₀ 比、横軸は各マイクロ RNA クローン)

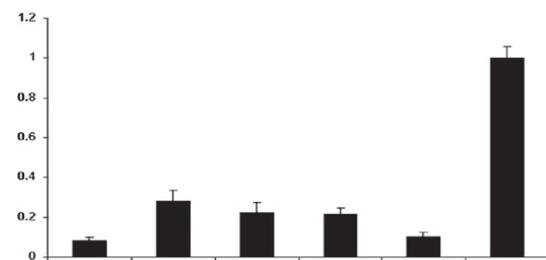


図 2：MTS アッセイによる膵癌増殖抑制的マイクロ RNA による増殖抑制効果の検証 (縦軸は相対吸光度、横軸は左から miR-29b、

miR-34a、miR-222、miR-224、miR-521、miR-control.)

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3件)

- ① Izumiya M、Okamoto K、Tsuchiya N、Nakagama H. Systematic exploration of cancer-associated microRNAs through functional screening assays、Cancer Science、査読有、(in press)、2011.
- ② Tsuchiya N、Izumiya M、Ogata-Kawata H、Okamoto K、Fujiwara Y、Nakai M、Okabe A、Schetter AJ、Bowman ED、Midorikawa Y、Sugiyama Y、Aburatani H、Harris CC、Nakagama H. Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. Cancer Research、査読有、(Epub ahead of print)、2011.
- ③ Izumiya M、Okamoto K、Tsuchiya N、Nakagama H. Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. Carcinogenesis、査読有、Vol. 31、No.8、2010、p.1354-1359.

[学会発表] (計2件)

- ① Masashi Izumiya、Naoto Tsuchiya、Koji Okamoto、Hitoshi Nakagama、Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: A new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs、The 8th AACR/JCA Joint Conference、Feb. 8、2010、Hawaii、USA.
- ② 泉谷昌志・土屋直人・岡本康司・中釜斉、マイクロRNAの機能スクリーニング: 癌細胞の増殖に重要なマイクロRNAの効率的な単離法の確立、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 癌抑制的マイクロRNAを含む腫瘍増殖抑制剤

発明者: 中釜斉・土屋直人・泉谷昌志・岡本康司

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許

番号: 特願 2009-228020

出願年月日: 2009年9月30日

国内外の別: 国内

○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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉谷 昌志 (IZUMIYA MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号: 90532739

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: