

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791252

研究課題名(和文) マイクロRNAによる消化器癌の未分化性獲得と新規分化誘導療法の開発研究

研究課題名(英文)

Identification and Characterization of Critical MicroRNAs in Gastrointestinal Cancer

研究代表者

富丸 慶人 (TOMIMARU YOSHITO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70528570

研究成果の概要(和文)：

消化器癌に対する現在の治療成績は十分なものではない。本研究では、マイクロRNA(miRNA)に焦点をあてて研究した。miRNAは小さなRNAとしてターゲットとなるmRNAと結合して遺伝子発現を抑制し、正常における発生・分化・増殖など様々の生命現象に関わり癌においても重要な役割を果たす。本研究ではmiRNAの消化器癌細胞に導入し効果を調べた。フローサイトメトリーによる細胞周期解析、細胞増殖能の評価、細胞形態評価、エピジェネティックな変化の程度の評価、各種未分化関連遺伝子の発現状況の解析、網羅的遺伝子発現解析によるES細胞との類似性の実施し、miRNAの重要な働きを明らかにした。今後この調査研究の目指すところが達成出来れば癌幹細胞をターゲットとした有効で安全な創薬開発が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：

Whereas accumulating experimental evidence indicates that microRNAs play important roles in various biological processes, such as embryogenesis, cell differentiation, proliferation, metabolism and apoptosis, several reports concluded that altered expression of specific microRNA genes contributes to the initiation and progression of cancer. We studied the effect of expression of microRNAs in human gastrointestinal cancers, as well as the relationship between their expression and response to chemotherapies. We found that the development of treatment strategies against human solid cancers based on the profile and certain features of microRNAs is promising.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
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・外科学一般

キーワード：(1) マイクロRNA (2) 消化器癌 (3) 癌幹細胞 (4) 分化誘導(5) 未分化性

1. 研究開始当初の背景

消化器癌に対する治療には様々なものがあるが、その治療成績は十分なものではない。癌に対する治療成績向上のためには、このような転移・再発を含めた疾病制御が必須である。本研究では、マイクロRNA (micro RNA: miRNA) に焦点をあてて研究した。miRNAは、長さ20-25塩基から成るタンパク質へ翻訳されない小さなRNAであり、ターゲットとなるmRNAと結合することによって遺伝子の発現を抑制し、正常における発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっているのみならず、癌においても重要な役割を果たす。最近、一群のmiRNAがヒトの皮膚癌において、未分化性の獲得を誘導したという報告があることから (Lin SL et al. RNA 2008)、miRNAは消化器癌においても未分化性の誘導・治療応用を実現できる可能性が示唆される。本研究では上記のmiRNAを消化器癌に導入することで、消化器癌における未分化性の獲得を目的とし、幾つかのmiRNAを導入することで未分化性の獲得や細胞の形質変化を誘導できるか否かを、試験管内の遺伝子導入後に以下の如く追跡調査した。フローサイトメトリーによる細胞周期解析、細胞増殖能の評価、細胞形態評価、エピジェネティックな変化の程度の評価、実際に未分化性の誘導・維持を行うとされている各種遺伝子 (c-myc, sox2, oct3/4, klf4, lin28, Nanogなど) の発現状況の解析、網羅的遺伝子発現解析によるES細胞との類似性の実施した。今後、この方法で未分化性を誘導する方法が完成出来れば、創薬を通じた医学応用に向けて、癌治療で注目されている癌幹細胞をターゲットとした治療方法等の開発が進むと期待される。

2. 研究の目的

現在行われている消化器癌に対する治療は多種多様であるが、その治療成績は十分なものではない。癌に対する治療成績の向上には、治療後の転移・再発などを含めた癌の制御が重要である。本研究では、マイクロRNA (micro RNA: miRNA) に注目した。miRNAは、20-25塩基から構成される蛋白質へ翻訳されない小さなRNAであり、標的となるmRNAと結合することにより、遺伝子発現を抑制する。このmiRNAは、正常細胞における発生・分化・増殖など多種の生命現象に関わっているのみならず、

癌においても重要な役割を果たすことが知られている。近年、ある種のmiRNAが、ヒトの皮膚癌細胞において、未分化性の獲得を誘導したという報告があることから (Lin SL et al. RNA 2008)、miRNAは、消化器癌においても、未分化性の誘導・治療応用を実現できる可能性が示唆される。本研究では、このようなmiRNAを、実際に消化器癌に導入することにより、未分化性の獲得を誘導できるか否かを、多面的に評価する。また、この方法によって、未分化性の誘導が可能となれば、癌治療で注目されている癌幹細胞を標的とした治療方法の開発が進むことが期待される。

3. 研究の方法

(1) miRNAを導入した癌細胞の性質の評価した。性質の評価に必要な解析として、(2) フローサイトメトリーによる細胞周期解析、(3) 細胞増殖能の評価、(4) 細胞形態の評価、(5) エピジェネティックな変化の程度の評価、(6) 未分化性の誘導・維持を行うとされている各種遺伝子 (c-myc, sox2, oct3/4, klf4, lin28, Nanogなど) の発現状況の解析、(7) 癌細胞としての癌の悪性度の評価 (浸潤能、遊走能など)、(8) 網羅的遺伝子発現解析によるES細胞との類似性の評価を実施した。これらを総合して研究成果として統合した。

4. 研究成果

ヒト肝癌細胞株として PLC/PRF/5, HepG2 を用い、化学療法の薬剤としては、インターフェロン- α (IFN- α)、5-フルオロウラシル (5-FU) を用いた。遺伝子導入は、オリゴヌクレオチドとして pre-miR-21, anti-miR-21, siPTEN, siPDCD4 (Ambion Inc., AustinTX, USA) を用いて、導入試薬としては siPORTTM NeoFXTM (Ambion Inc.) を用いて行った。遺伝子導入によって miRNA-21 の発現を増強させ、IFN- α 、5-FU に対する耐性を MTT アッセイにて評価したところ、PLC/PRF/5, HepG2 において IFN- α 、5-FU に対する耐性の増強が確認された (IFN- α : 5-5000IU/ml, 5-FU : 0.05-50 μ g/ml)。このような耐性の増強は 2 剤併用治療においても確認された (IFN- α : 5-50IU/ml かつ 5-FU : 0.05-5 μ g/ml)。またこれらの薬剤により誘導されるアポトーシ

スの量を Annexin V アッセイにて評価したところ、アポトーシス量は有意に減少しており、耐性の増強と一致した結果であった。次に、逆にこれらの癌細胞株において、遺伝子導入によって miRNA-21 の発現を減弱させると IFN- α 、5-FU に対する耐性が有意に減弱した (IFN- α : 5-5000IU/ml, 5-FU : 0.05-50 μ g/ml)。2 剤併用治療でも同様に耐性が有意に減弱した (IFN- α : 5-50IU/ml かつ 5-FU : 0.05-5 μ g/ml)。また、これらの薬剤により誘導されるアポトーシスの量は有意に増加していた。miRNA-21 が直接の標的としている PTEN や PDCD4 の発現を western blot 法にて評価すると、miRNA-21 の発現を増強させた癌細胞株ではこれらの蛋白の発現が低下していた。また miRNA-21 の標的である TIMP3 や RECK は、MMP を抑制することが報告されているが、遺伝子導入にて miRNA-21 の発現を増強させた癌細胞株において MMP (MMP-2, MMP-9, MMP-11) の発現を qRT-PCR にて評価すると、有意な発現の上昇が認められた。また miRNA-21 を抑制することによるアポトーシスの増加は、siRNA を用いた遺伝子導入にて PTEN や PDCD4 を抑制した状態では、認められなかった。これらのことから、薬剤耐性の変化の原因として、PTEN や PDCD4 が関与している可能性が示唆された。次に、これまでに教室において高度進行肝細胞癌に対して減量肝切除術を施行した後に遺残腫瘍に対して IFN- α 、5-FU の治療を行った 30 症例を対象として、miRNA-21 の発現と治療効果との関連を検討した。この 30 例では、IFN- α 、5-FU による治療効果が既に明らかであるため (responder 10 例, non-responder 20 例)、まず切除標本における miRNA-21 の発現を評価し、その発現レベルと治療効果との関連について調べたところ、miRNA-21 の発現が低い群では発現が高い群と比較して、より良好な治療効果を認めた (p=0.0201)。また治療後の累積生存期間を用いて治療後の予後との関連についても評価したところ、miRNA-21 の発現が低い群では、高い群と比較して、治療後の予後がより良好であった。これらの結果から、肝細胞癌において、miRNA-21 の発現と IFN- α 、5-FU による治療効果には有意な相関があることが示唆された。また、肝細胞癌部における PTEN や PDCD4 の発現レベルを免疫組織化学染色 (抗 PTEN 抗体 : Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA, 抗 PDCD4 抗体 : Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) にて評価し、IFN- α 、5-FU の治療効果との関連についても評価したが、有意な相関は認められなかった。この知見によって、

miRNA-21 の発現を低下させることが出来る薬剤が開発されれば、これらの薬剤に対する感受性を低下させることで、肝細胞癌に対する治療をより有効なものにすることが出来る可能性が示唆された。今後は、このような miRNA 導入による方法で未分化性を誘導する方法が確立されれば、創薬を通じた医学応用に向けて、癌治療で注目される癌幹細胞を標的とした新規の治療方法の開発が進むと期待される。

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 6 件)

- 1) Tomimaru Y (1 番目 13 人中), Nagano H. Insulin-like growth factor-binding protein 7 alters the sensitivity to interferon-based anticancer therapy in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*. 102(10):1483-1490, 2010.
- 2) Tomimaru Y, (1 番目 12 人中), Mori M. MicroRNA-21 induces resistance to the anti-tumor effect of interferon- α /5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*. 103(10):1617-1626, 2010.
- 3) Tomimaru Y (1 番目 14 人中), Mori M. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma of the liver infiltrating inferior vena cava. *World J Gastroenterol*. 15(33):4204-4208, 2009.
- 4) Tomimaru Y (1 番目 11 人中), Monden M. Comparison of postoperative morphological changes in remnant pancreas between pancreaticojejunostomy and pancreaticogastrostomy after pancreaticoduodenectomy. *Pancreas*. 38(2):203-207, 2009.
- 5) Hoshino H, Tomimaru Y (4 番目 10 人中), Ishii H. Epithelial-mesenchymal transition with expression of SNAIL-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 390(3):1061-1065, 2009.
- 6) 富丸慶人 (1 番目 8 人中), 石井秀始. 【次世代のパーソナライズド・セラピーに向けて】大腸癌の癌幹細胞 大腸癌 *Frontier*. 2(1):54-57, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 富丸慶人, 他. マイクロRNA-21 は肝細胞癌に対するIFN・5-FUに対する治療抵抗性を引き起こす. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月. 大阪.
- 2) 富丸慶人, 他. 肝癌細胞株におけるIFN- α /5-FU併用化学療法の耐性関連遺伝子の検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会. 2010 年 4 月. 名古屋.
- 3) 富丸慶人, 他. 高度進行肝細胞癌に対するインターフェロン併用化学療法の治療効果予測. 第 71 回日本臨床外科学会総会. 2009 年 11 月. 京都.
- 4) 富丸慶人, 他. 肝細胞癌切除後のフォローアップと再発後治療の重要性. 第 21 回日本肝胆膵外科学会. 2009 年 6 月. 名古屋.
- 5) 富丸慶人, 他. 肝切除前インターフェロン治療のC型肝炎関連肝細胞癌術後治療成績に及ぼす影響. 第 95 回日本消化器病学会総会. 2009 年 5 月. 札幌.
- 6) 富丸慶人, 他. 肝静脈・下大静脈内腫瘍栓を伴う肝細胞癌に対する外科的治療成績についての検討. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009 年 4 月. 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富丸 慶人 (TOMIMARU YOSHITO)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70528570

