

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 20 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790349

研究課題名（和文） 胃癌の癌抑制性マイクロ RNA 候補 miR-375 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of miR-375, a candidate of tumor suppressor miRNA in gastric cancer

研究代表者

塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00433053

研究成果の概要（和文）：

私たちは胃癌で異常発現する miRNA を同定するために、胃癌 22 症例を用いて miRNA の網羅的発現解析を行った。その結果、miR-375 が胃癌でもっとも発現が低下していることを発見した。miR-375 前駆体を培養胃癌細胞株へ導入したところ、アポトーシスによる細胞死が誘導されることを発見した。さらに、miR-375 がアポトーシスを誘導するメカニズムを解明するため、標的遺伝子のスクリーニングを行ったところ、癌化に関与する 2 つの遺伝子、PDK1 と 14-3-3ζ、が同定された。これらの結果から、miR-375 は癌遺伝子である PDK1 と 14-3-3ζ を抑制する癌抑制型 miRNA であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found that miRNA-375 (miR-375) was the most downregulated and that its ectopic expression in gastric carcinoma cells markedly reduced cell viability via the caspase-mediated apoptosis pathway. Interestingly, we found that expression of miR-375 inhibited expression of PDK1, which is a direct target of miR-375, followed by suppression of Akt phosphorylation. Further analysis by gene expression microarray revealed that 14-3-3zeta, a potent antiapoptotic gene, was significantly downregulated at both the mRNA and protein levels in cells transfected with miR-375. The activity of a luciferase reporter containing the miR-375 binding sequence at the 3' untranslated region (UTR) of 14-3-3zeta mRNA was repressed by the ectopic expression of miR-375, suggesting that miR-375 targets the 3' UTR of 14-3-3zeta. In addition, knockdown of either PDK1 or 14-3-3zeta in gastric carcinoma cells induced caspase activation, which was also observed in miR-375-transfected cells, suggesting that miR-375 may exert its proapoptotic function, at least in part, through the downregulation of PDK1 and 14-3-3zeta. Taken together, we propose that miR-375 is a candidate tumor suppressor miRNA in gastric carcinoma

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医学・人体病理

キーワード：マイクロ RNA、胃癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌はわが国の癌死亡率の第二位をしめる重要な疾患である。診断技術の進歩により、早期に発見される胃癌(早期胃癌)の治療成績は向上したが、悪性度が高まった胃癌(進行胃癌)の治療成績は必ずしも良好ではない。それは進行胃癌に対して外科治療以外に効果的な補助療法が確立されていないことがその要因の一つといえる。近年、癌の発症メカニズムの解明が大きく進み、(1) 癌は進行の過程でゲノム異常が蓄積されること、(2) 蓄積された異常ゲノム領域に存在する遺伝子が癌の悪性化に関わっていることが明らかとなった。したがって、胃癌における遺伝子異常を解析することによって、胃癌発症メカニズムが解明されるのみならず新たな治療標的の発見につながると考えられる。

このような考えに基づいて、私はマイクロアレイを用いて胃癌 30 例の網羅的ゲノムコピー数異常の解析 (アレイ CGH 法) と網羅的発現解析 (トランスクリプトーム) を行い、胃癌のゲノムプロファイルを明らかにするとともに、異常発現する遺伝子を報告した (Tsukamoto et al., 2008, Journal of Pathology)。一方で、蛋白質をコードしていない small RNA の一種である microRNA (miRNA) の異常発現が癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常発現を介して、癌発生や進行に関与することが注目されている。そのため、私は胃癌 22 症例と正常胃粘膜組織 5 症例における miRNA 発現をマイクロアレイ (Agilent 社 G4470A) を用いて解析したところ、胃癌組織で発現上昇する miRNA を 33 個、発現低下する miRNA を 6 個同定した。発現低下するもののうち、最も発現低下が顕著であった miR-375 について、胃癌細胞株 NUGC3, MKN74 に miR-375 前駆体オリゴ (Ambion 社) を導入したところ、48, 72 時間後にアポトーシスが誘導されることを発見した。

国内グループによる胃癌の網羅的な miRNA 発現解析は報告例が無い。国外では胃癌における miRNA プロファイルの報告は 2 報ある (Volinia et al, PNAS, 2006. Petrocca et al, Cancer Cell, 2008.)。しかし、Volinia らの解析では発現プロファイルを決定したのみで、胃癌に関与する miRNA を同定するに至っていない。また、Petrocca らは胃癌で発現上昇する miRNA のみに注目しており、発現低下する miRNA については一切解析を行っていない。よって胃癌における網羅的な miRNA 発現プロファイルに基づいて、癌抑制 miRNA の同定を試みているのは世界中でも私たちのグループだけである。

2. 研究の目的

このように、私はすでに網羅的な miRNA 発現解析と培養細胞株における機能解析を行い、胃癌における新規の癌抑制候補 miRNA として miR-375 を同定した。本研究ではこの発見をさらに発展させ、miR-375 の発現低下のメカニズムの解明とその臨床病理学的意義、発現低下によってもたらされる生物学的意義を詳細に解析して、miR-375 の発現低下が胃癌発症メカニズムにどのような関わりを持つものかを解明する。

3. 研究の方法

(1) . miR-375 発現低下の臨床病理学的意義の解析

- ① 外科的に切除された胃癌のパラフィン包埋ブロック 130 症例を選び、薄切した切片を laser-captured microdissection (LCM:Arcturus 社) 専用のスライドガラスへのせる。
- ② Cresyl violet 染色後 (Ambion 社)、癌細胞を LCM により切り取り回収する。
- ③ miRNeasy FFPE kit (キアゲン社) により、回収した細胞から RNA を回収する。
- ④ リアルタイム PCR 法により、各症例における miR-375 の発現量を解析する。
- ⑤ miR-375 の発現量と臨床病理学データとの関連性を解析する。

(2) miR-375 の発現抑制メカニズムの解明 (プロモーター解析)

- ① アレイ CGH 解析を行った胃癌症例における miR-375 の発現量をリアルタイム PCR により定量化し、ゲノムコピー数との間に相関関係があるか解析する。
- ② miR-375 の発現抑制にメチル化やヒストンアセチル化が関与するか明らかにするため、胃癌培養細胞株をメチル化及びアセチル化阻害剤で処理し、発現が上昇するか解析する。
- ③ 正常胃粘膜組織より RNA を回収し、5' RACE 法により miR-375 の転写開始点を決定する。
- ④ 胃癌細胞 5 株 (MKN45, MKN74, AZ521, NUGC3, MKN7) からゲノム DNA を抽出し、miR-375 転写開始点付近の高頻度メチル化 CpG をバイサルファイトシーケンス法により同定する。
- ⑤ 得られたシーケンスデータよりメチル化特異的 PCR (MSP) のプライマーを設計する。
- ⑥ 手術標本における高頻度メチル化 CpG の有無を MSP により解析する。
- ⑦ 胃癌細胞株、及び凍結組織標本からゲノム DNA を回収し、クロマチン免疫沈降法により、miR-375 のプロモーター領域へアセチル

化ヒストンが結合しているか、解析する。

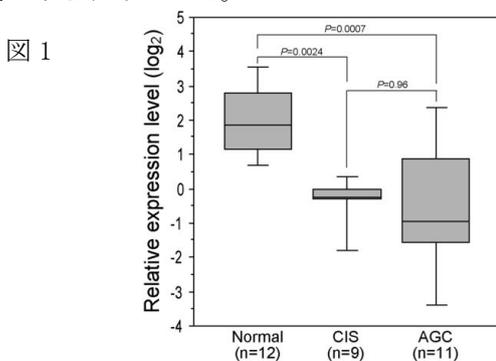
(3) . miR-375 によるアポトーシス誘導のメカニズム解明 (標的遺伝子の探索)

- ① miRNA 標的予測ソフト (Target Scan, PicTar) で miR-375 の標的候補をリストアップする。
- ② miR-375 を胃癌細胞株 3 株 (MKN74, AZ521, NUGC3) へ導入し、共通して発現変動する遺伝子を Expression microarray 法により解析し、リストアップする。
- ③ 標的予測ソフトで得られたリストと miR-375 により発現抑制された遺伝子のリストを比較し、両方のリストに含まれる遺伝子を選ぶ。
- ④ 選択された遺伝子の 3' UTR に存在する miR-375 結合配列 (Target Scan, PicTar など予測) をルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に挿入したレポータープラスミドを作製する。
- ⑤ 作製したプラスミドと miR-375 を培養細胞中で共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定する。コントロールと比較して、活性が下がった場合、選択された遺伝子は標的である。
- ⑥ さらに、これまでに行った網羅的発現解析を利用して、miR-375 標的遺伝子の胃癌組織における発現を解析する。

また、標的遺伝子を発現プラスミドで過剰発現、siRNA で発現抑制することで、miR-375 の下流のシグナル伝達を細胞生物学的に機能解析する。

4. 研究成果

第一に、様々な進行段階の胃癌における miR-375 の発現をリアルタイム PCR で解析した。その結果、miR-375 は胃癌のもっとも早期である上皮内癌 (Carcinoma in situ) の段階で既に発現が低下していることを発見した (図 1)。この結果は、miR-375 の発現低下が胃癌の進行段階ではなく、発生段階に関与することを示唆している。また、組織型、リンパ節転移の有無と miR-375 発現の間には相関がみられなかった。



第二に、miR-375 発現低下のメカニズムを解析した。miR-375 のコードされているゲノ

ム領域をゲノムブラウザ (NCBI) で解析したところ、高度メチル化領域の可能性を示す、CpG アイランドにコードされていることが分かった。そこで、miR-375 の発現低下にメチル化やアセチル化といったエピジェネティックな発現抑制が関与するか明らかにするため、脱メチル化剤・脱アセチル化阻害剤で処理した細胞の miR-375 を解析した。その結果、脱メチル化剤・脱アセチル化阻害剤それぞれ単独で処理した場合、5 倍から 8 倍の発現亢進が認められ、両方で処理した場合 20 倍以上の発現亢進が認められた (図 2)。これらの結果は、miR-375 の発現低下にメチル化や脱アセチル化が関与することを示唆する。

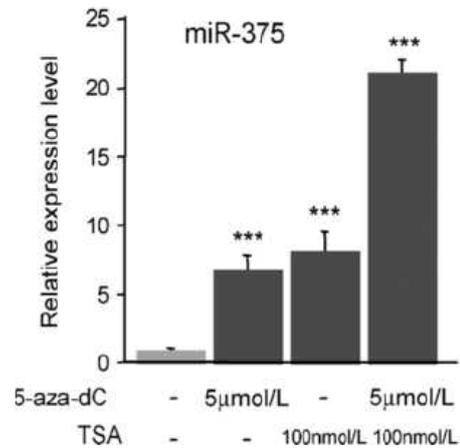
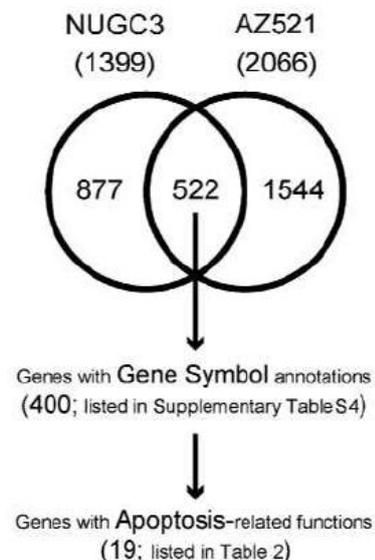


図 2

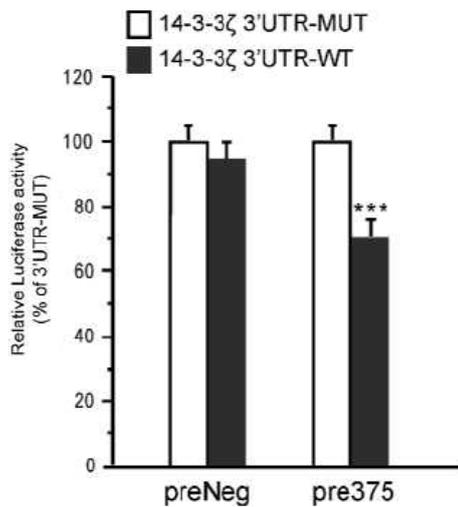
第三に、miR-375 によるアポトーシス誘導のメカニズム解明を試みた。miR-375 を胃癌細胞 2 株 (NUGC3, AZ521) へ導入し、共通して発現変動する遺伝子を Expression microarray により解析したところ、522 個の遺伝子が共通して発現変動していた。522 個の遺伝子のうち、19 個が Gene ontology でアポトーシス関連遺伝子であることがわかった (図 3)。

図 3



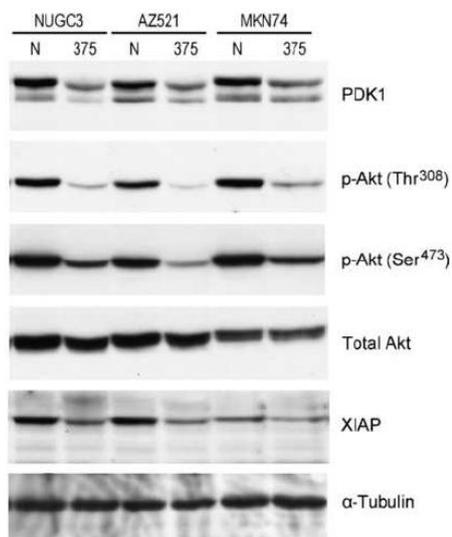
さらに、miRNA 標的予測ソフト (Target Scan) でリストアップした miR-375 標的候補遺伝子と 19 遺伝子を比較したところ、もっとも発現変動の大きかった 14-3-3ζ が miR-375 の標的候補であることがわかった。さらに、14-3-3ζ が miR-375 の直接の標的であるか 14-3-3ζ の 3' UTR をつないだレポータープラスミドを使って解析した。図 4 に示されるように、14-3-3ζ の野生型 3' UTR をつないだレポーター活性は miR-375 を導入することで低下することがわかった。この結果は miR-375 が 14-3-3ζ の発現を直接制御することを示唆している。

図 4



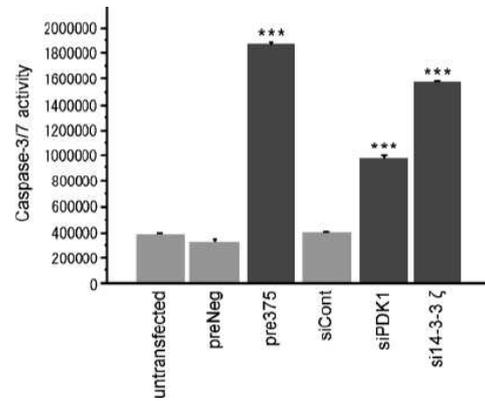
また、私は以前の報告で膵臓 β 細胞で miR-375 が PDK1 発現を制御することを知り、胃癌細胞株においても当てはまるか解析した。その結果、胃癌細胞においても miR-375 が PDK1 の発現を制御し、その下流シグナルである Akt, XIAP の活性が制御されることを発見した (図 5)。

図 5



第四に、miR-375 が制御する 14-3-3ζ、PDK1 の発現低下がアポトーシス誘導と関係するか解析した。図 6 に示されるように、意癌細胞株で siRNA を用いて 14-3-3ζ、PDK1 の発現を低下したところ、アポトーシスが誘導されることがわかった。

図 6



以上の結果を合わせて考えると、miR-375 は胃癌細胞株において、メチル化、脱アセチル化により発現が抑制されており、外部から細胞に導入されると、14-3-3ζ、PDK1 の発現を抑制することでアポトーシスを誘導し、癌抑制能を発揮することが示唆された。現在、正常胃上皮において miR-375 発現が低下すると癌化・分化に異常が認められるか解析を続けている。

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 3 件)

① Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization.

Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T, Moriyama M.

PLoS One. 2011;6(7):e22313.

② Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1α, causes centrosome amplification in renal carcinoma cells.

Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M.

J Pathol. 2011 Jun;224(2):280-8.

③ MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M. Cancer Res. 2010 Mar 15;70(6):2339-49.

[学会発表] (計1件)

①第100回 日本病理学会、パシフィコ横浜、2011年4月28日ワークショップ4、「胃癌におけるマイクロRNA発現」
塚本 善之 (招待講演)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00433053

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：