

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 1 日現在

機関番号：34417
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791263
 研究課題名（和文）HDAC制御を介した癌抑制における新規標的マイクロRNAの探索と治療への展開
 研究課題名（英文）Identification of tumor suppressive miRNAs induced by histone deacetylase inhibitor vorinostat in human breast cancer cells
 研究代表者
 上原 範久（UEHARA NORIHISA）
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30368211

研究成果の概要（和文）：

我々は、HDAC 阻害剤 vorinostat が、ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 へ Caspase-3 活性化によるアポトーシスを誘導し、その過程において p38MAPK が必須であることを報告した。近年、miRNA の発現異常が様々な癌細胞で見出され、増殖、浸潤、転移への関与が報告されている。我々は、HDAC 制御を介した癌抑制における miRNA の関与を検討するために、vorinostat 誘導 miRNA の同定とその機能解析を試みた。miRNA アレイによるスクリーニングの結果、vorinostat 処理 MDA-MB-231 細胞において、顕著な発現上昇をみる 18 種の miRNA の同定に成功した。さらに real-time PCR による解析の結果、miR-148a の顕著な発現上昇を確認した。MDA-MB-231 細胞への miR-148a の導入により、運動能・浸潤能の抑制、ならびに vorinostat への感受性の増大が確認された。以上の結果より、miR-148a が乳癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Vorinostat is a histone deacetylase inhibitor that effectively suppresses cancer-cell proliferation by inducing cell-cycle arrest and/or apoptosis. Emerging evidence suggests that aberrant expression of microRNAs (miRNAs), single-strand RNAs of 18-24 nt express endogenously, plays pivotal roles in cancer pathogenesis. The aim of the present study was to identify tumor suppressive miRNAs through comparison of miRNA expression profiles of MDA-MB-231 cells treated with/without vorinostat using PCR-based miRNA array system. We identified 18 miRNAs, which were significantly up-regulated after 24 h treatment with vorinostat. In addition, four up-regulated and three down-regulated miRNAs were also identified after 48 h treatment with vorinostat. Among these miRNAs, four of them were persistently up-regulated for up to 48 h after vorinostat treatment. These miRNAs may be useful as a molecular target for breast cancer therapy or a diagnosis marker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：HDAC inhibitor, microRNA, breast cancer

1. 研究開始当初の背景

miRNA (microRNA)は約 21 塩基の低分子 RNA であり、ゲノムから転写、プロセッシングを経て、細胞質において標的となる mRNA の 3' 非翻訳領域へ塩基対を形成し、翻訳抑制を誘導する。現在までにヒトでは約 800 種類の miRNA がデータベースに登録されているが、ヒト遺伝子の約 1/3 がその制御下にあると考えられている。正常細胞において miRNA は発生・分化・増殖・アポトーシスの制御に関与していることが知られ、近年 miRNA 発現制御の異常が癌形質の獲得 (増殖・浸潤・転移) に深く関与することが数多く報告されている。癌細胞特異的 miRNA は治療・診断マーカーとして非常に有用なターゲットであると考えられ、世界的に急速な研究の進展をみる、その発現制御および機能の詳細は未だよく知られていない。

2. 研究の目的

近年、エピジェネティクス (ヒストン修飾、DNA のメチル化を介した遺伝子配列の変化を伴わない発現変化) の制御異常が発癌の要因として広く認識されている。現在までに、エピジェネティクス制御因子の一つであるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を標的とした特異的阻害剤が癌治療薬として注目されている。我々はこれまで、HDAC 阻害剤 (vorinostat) を用い、ヒストンアセチル化修飾を介した乳癌細胞増殖抑制の分子メカニズムの解明を行ってきた。HDAC 阻害剤の抗癌活性は、ヒストンタンパク質のアセチル化修飾による転写調節を主な分子基盤とする。すなわち HDAC 阻害剤による癌抑制において、アセチル化を介したゲノムワイドなクロマチンリモデリングが、miRNA 発現調節に多大な影響を与える可能性が高い。

本研究では、HDAC 阻害剤を用いた癌抑制における新規標的 miRNA の同定とその機能解明、さらに治療・診断マーカー応用への可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) vorinostat 誘導特異的 miRNA の同定。

乳癌細胞株と材料

ヒト乳癌細胞株 (MCF-10A, MCF-7, T47D, MDA-MB-231, BT-549) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。細胞は、牛胎児血清 10% を含む DMEM 培地で 5% CO₂ 環境下 37°C にて培養した。HDAC 阻害剤 vorinostat は DMSO に溶解し 50 mM ストック溶液とした。

miRNA PCR array 解析

Vorinostat 特異的 miRNA の検索は、miRNA PCR array (QIAGEN) を用い、癌関連 miRNA 約 90

種よりスクリーニングを行った。

Real-time PCR

miRNA array により同定された vorinostat 特異的 miRNA は、特異的プライマー (QIAGEN) を用いた real-time PCR 法により、その発現を確認した。

(2) vorinostat 誘導特異的 miRNA の機能解析。

miRNA mimic の細胞への導入

ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 への miRNAmimic の導入は、RNAi Max (Invitrogen) により行い、導入 48 時間後に各解析に用いた。

浸潤能評価

MDA-MB-231 への miRNAmimic の導入後、インベーションチャンバー (BD Bioscience) へ細胞を播種し、18 時間後の浸潤細胞数の計測を行い、miRNA 導入による浸潤能を評価した。

vorinostat 感受性変化

MDA-MB-231 への miRNAmimic 導入後、96-well プレートへ 3×10^3 個の細胞播種し、MTT assay により vorinostat に対する感受性の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) vorinostat 誘導特異的 miRNA の同定。

MDA-MB-231 細胞への 5 μ M vorinostat 処理 24 時間後における、癌関連 miRNA の array 解析の結果、顕著な発現上昇 (~ 2 fold) をみる 18 種の miRNA の同定に成功した。さらに real-time PCR による詳細な発現解析の結果、vorinostat により発現上昇する miRNA として、miR-148a, -148b, 146b-5p, 199a-3p の同定に成功した (Fig. 1)。

これら、4 種の miRNA の乳癌抑制への関与を

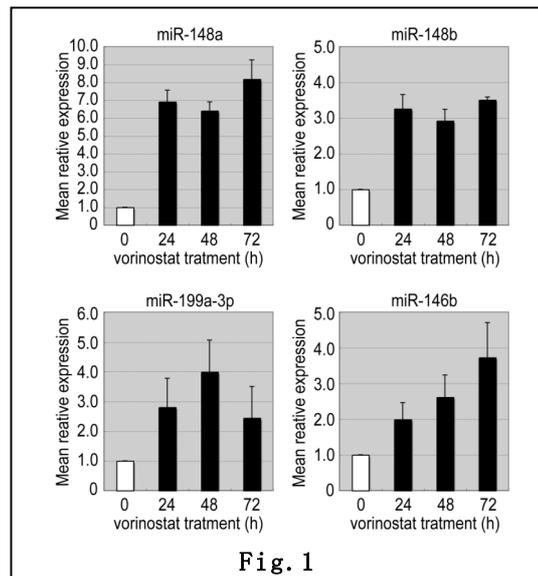


Fig. 1

検討するために、正常様乳腺上皮細胞(不死化)MCF-10Aをコントロールとし、異なるサブタイプのヒト乳癌細胞株(Luminal-type: MCF-7, T47D, KPL-1, Basal-type: MDA-MB-231, BT549, HCC38, **Table 1** 参照)における発現をreal-time PCRにより解析した。

Table 1

Cell lines	Subtype
MCF-10A	Normal-like, immortalized (ER-, PgR-)
MCF-7	Luminal type (ER+, PgR-, HER2+)
T47D	Luminal type (ER+, PgR+, HER2+)
KPL-1	Luminal type (ER+, PgR-, HER2+)
MDA-MB-231	Basal type (TNBC*)
HCC38	Basal type (TNBC)
BT549	Basal type (TNBC)

*TNBC (triple negative breast cancer; ER-, PgR-, HER2-)

興味深いことに、miR-148a が悪性度の高いBasal-typeに属する乳癌細胞株(MDA-MB-231, BT549, HCC38)において、顕著に発現抑制されていた(Fig. 2)。

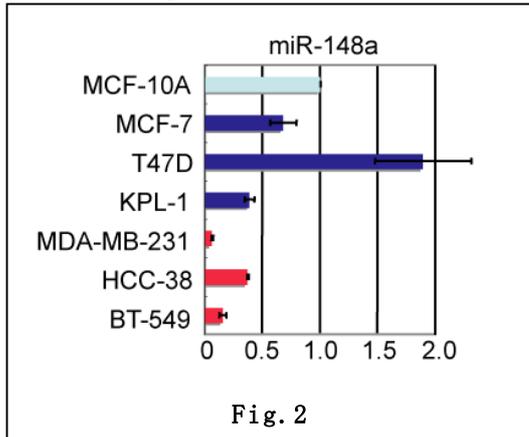


Fig. 2

(2) vorinostat 誘導特異的 miRNA の機能解析。悪性度の高い basal-type 乳癌細胞株における miR-148a 発現抑制を見たことから、miR-148a の浸潤・転移能制御への関与が示唆された。そこで、合成 miR-148a オリゴ

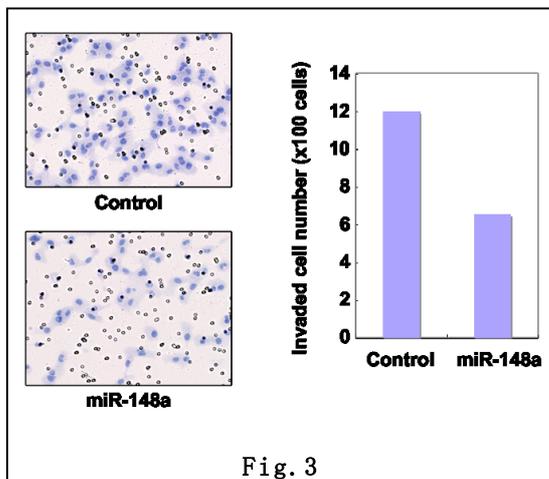


Fig. 3

(miR-148amimic) を MDA-MB-231 細胞へ導入し、浸潤能に及ぼす影響をインベンションチャンバーを用いて検討した。その結果、コントロール細胞と比較して、miR-148amimic 導入細胞において、顕著な浸潤能の抑制をみた(Fig. 3)。

さらに、miR-148a 発現による vorinostat に対する感受性変化を MTT 法により検討した。その結果、miR-148a 導入により、コントロール細胞と比較して、vorinostat に対する感受性が増強された。加えて、miR-148a 導入による細胞増殖抑制も確認された(Fig. 4)。

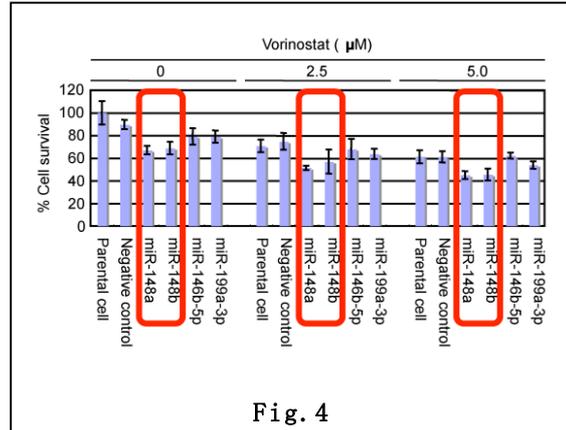


Fig. 4

我々は、HDAC 阻害剤 vorinostat の乳癌細胞抑制機序として、①p38MAPK を介した caspase-3 活性化によるアポトーシス誘導(Uehara et al. *Cancer Lett*, 2012)、②SCF ユビキチンリガーゼ複合体を構成する Skp2, Cks1 発現低下とそれに伴う細胞周期調節因子 p27 および p21 の安定化による細胞増殖抑制機序(Uehara et al. *Oncol Rep*, 2012)を明らかにした。さらに、③vorinostat 誘導乳癌細胞増殖抑制において特異的発現をみる miRNA の同定に成功し、miR-148a が乳癌抑制遺伝子としての機能を有することが示唆された。

今後、臨床検体を用いた *in situ* hybridization 法による miR-148a の発現解析をおこない、治療・診断マーカー応用への可能性を検討するとともに、動物実験により miR-148a の *in vivo* における抗腫瘍効果の検討を行う予定である。

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)

すべて査読有り

- 1) Uehara N, Yoshizawa K, Tsubura A “Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1

in human breast cancer cells”
Oncology Reports in press (2012)

- 2) Uehara N., Kanematsu S, Miki H, Yoshizawa K, Tsubura A “Requirement of p38 MAPK for a cell-death pathway triggered by vorinostat in MDA-MB-231 human breast cancer cells” *Cancer Letters* 315(2):112-121 (2012)
- 3) 上原 範久, 兼松清果, 三城弥範, 義澤克彦, 螺良愛郎 “ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 vorinostat による p38MAP キナーゼシグナルを介した乳癌細胞死誘導機序” *乳癌基礎研究*, 20:17-21 (2011)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 上原 範久 “Identification of tumor suppressive miRNAs induced by histone deacetylase inhibitor vorinostat in human breast cancer cells” 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜
- 2) 上原 範久 “Vorinostat 誘導乳癌細胞増殖抑制における Skp2、Cks1 発現制御を介した p27 の安定化” 第 70 回日本癌学会 2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場
- 3) 上原 範久 “HDAC 阻害剤 vorinostat のヒト乳癌細胞株に対する DNA 損傷応答シグナルへの影響” 第 100 回日本病理学会 2011 年 4 月 28 日、パシフィコ横浜
- 4) 上原 範久 “Vorinostat による p38 MAPK を介したアポトーシス誘導における γ H2AX の役割” 第 69 回日本癌学会 2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場
- 5) 上原 範久 “Requirement of p38 MAPK for a cell-death pathway triggered by vorinostat in MDA-MB-231 human breast cancer cells.” 第 20 回乳癌基礎研究会 2010 年 7 月 17 日、青島パームビーチホテル
- 6) 上原 範久 “ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による乳癌細胞アポトーシス誘導～p38 活性化シグナル経路の解析～” 第 99 回日本病理学会 2010 年 4 月 27 日、京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：30368211

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：