

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 27日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890037

研究課題名（和文）EBV関連胃癌におけるウイルス由来マイクロRNAの発現および機能の解明

研究課題名（英文）Profiling and functional analysis of viral microRNA in EBV-associated gastric carcinoma

研究代表者

篠崎 綾 (SHINOZAKI AYA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60581824

研究成果の概要（和文）：

EBV関連胃癌におけるEBV由来マイクロRNAの発現プロファイルを定量的RT-PCR法を用いて解析した。他のEBV関連腫瘍に関する既報告と比較し、特定のマイクロRNAがEBV関連胃癌で特異的に発現が上昇していることが明らかになった。細胞株を用いた実験から、このマイクロRNAがアポトーシス促進に働く遺伝子を標的とし、その遺伝子産物の発現を抑制することで腫瘍細胞の不死化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The expression profile of viral microRNAs in EBV-associated gastric carcinoma was analysed using quantitative RT-PCR analysis. Compared with the previous reports on the expression profile of other EBV-associated tumors, some viral microRNAs were specifically upregulated in EBV-associated gastric carcinoma. In vitro analysis revealed that one of these microRNAs targets a gene that is known to facilitate apoptosis of the cells, and that it subsequently leads to the immortality of tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：EBV、マイクロRNA、胃癌、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表的なヒトの癌ウイルスであるEBVは造血器腫瘍に限らず、胃癌においても約10%の頻度で感染している。胃癌の発生におけるEBVの関与についてこれまでさまざまな観点から研究が行われ、EBVが発癌の極めて初期の段階に関与していることが示唆されているが、その全貌はいまだ明らかにはなっていない。

(2) 近年、蛋白質をコードしないsmall RNAの一種である、マイクロRNAの研究が急速に進歩を遂げており、特に発癌との関連において盛んに研究されている。筆者はこれまでの研究においてEBV関連胃癌におけるヒトのマイクロRNA (miR-200) の発現が正常粘膜および通常型胃癌と比較して有意に低下しており、これがEカドヘリンの転写抑制因子であるZEB1/ZEB2の発現を亢進させることでEカドヘリンの発現を抑制し、癌の浸潤能の獲得に関与するということが明らかにした。このことからEBVによる癌の発生において、宿主側のマイクロRNAの発現異常が重要であることが示された。

(3) さらに近年ではEBVそのものが産生するマイクロRNAの存在も明らかになりつつある。悪性リンパ腫や上咽頭癌などいくつかのEBV関連腫瘍においてその発現プロファイルや標的となる遺伝子産物、生物学的機能などが明らかにされつつある。しかし、これまで胃癌におけるEBV由来マイクロRNAの発現についてはほとんど報告されていない。そのためEBV関連胃癌におけるEBV由来のマイクロRNAの発現を検討し、どのような機序でEBV由来マイクロRNAが胃癌の発生に関与しているかを明らかにすることが求められる。

2. 研究の目的

EBV関連胃癌においてウイルス由来のマイクロRNAの発現プロファイルを明らかにし、これらが癌の発生、進展にどのように関与しているかを解明する。

3. 研究の方法

(1) ホルマリン固定、パラフィン包埋されたEBV関連胃癌の手術検体(10例)およびEBV関連胃癌モデル細胞株からマイクロRNAを含むトータルRNAを抽出し、定量的RT-PCR法を用いて既知のEBV由来マイクロRNA(40種類)の発現プロファイルを解析した。

(2) 既知の報告で明らかにされているその他のEBV関連腫瘍におけるマイクロRNAの発現プロファイルとの比較を行い、EBV関連胃癌において特に発現が上昇あるいは低下しているウイルス由来マイクロRNAを抽出した。データベースを用いて、それらのマイクロRNAについてシード配列から想定される標的遺伝子を検索した。

(3) EBV由来マイクロRNAの機能を解析するために、EBV関連胃癌のモデルとなる細胞株においてウイルス由来マイクロRNAの発現およびその標的遺伝子産物の発現を検討した。さらに細胞株で発現しているウイルス由来マイクロRNAを抑制することにより、標的となる蛋白の発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 手術検体から得られたマイクロRNAの定量的RT-PCR法により、EBV関連胃癌におけるウイルス由来マイクロRNAの発現プロファイルを明らかにした。既に報

告されている他のEBV関連腫瘍（悪性リンパ腫や上咽頭癌など）における発現プロファイルと比較し、数種類のマイクロRNAがEBV関連胃癌で特異的に発現が上昇あるいは低下しており、胃癌特有の発現プロファイルを示すことが明らかになった。また、EBV関連胃癌モデル細胞株におけるウイルス由来マイクロRNAの発現プロファイルも手術検体から得られた結果と同様の傾向を示した。手術検体における非癌部の組織およびEBVに感染していない細胞株においてはEBV由来マイクロRNAの発現はほとんど検出されなかった。

(2) EBV関連胃癌において特に発現が高かったマイクロRNAに関して、そのシード配列から予測される標的遺伝子をデータベース上で検索したところ、多数の遺伝子が候補として挙げられた。これらの遺伝子には細胞増殖、運動能、浸潤能、アポトーシスなど、癌の発生や進展に密接に関連するものが多く見られた。その中でもアポトーシス制御に関連する遺伝子である、BCL-2ファミリーに属する数種類の遺伝子に着目し、これらの遺伝子産物であるアポトーシス促進蛋白の発現についてEBV関連胃癌モデル細胞株を用いて、ウエスタンブロットおよびメッセンジャーRNAの定量的RT-PCR法を用いて発現を検討したところ、EBVに感染している胃癌細胞株では未感染の胃癌細胞株に比較して、アポトーシス促進蛋白の発現が低下していることが明らかになった。さらにこの蛋白を標的とするウイルス由来マイクロRNAについて、そのインヒビターをEBV関連胃癌モデル細胞株に導入することにより、このアポトーシス促進蛋白の発現が回復することを証明した。以上の結果から、EBV由来のマイクロRNAが宿主の蛋白発現を抑制することにより、アポトーシス抵

抗性を獲得し、腫瘍細胞の不死化に関与していることが示唆された。なお、本研究の成果については現在投稿準備中である。

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)

- ① Sun M, Uozaki H, Hino R, Kunita A, Shinozaki A, Ushiku T, Hibiya T, Takeshita K, Isogai M, Takada K, Fukayama M.
SOX9 expression and its methylation status in gastric cancer.
Virchows Arch. 2012 Mar;460(3):271-279.
DOI: 10.1007/s00428-012-1201-7
(査読あり)
- ② Uozaki H, Barua RR, Minhua S, Ushiku T, Hino R, Shinozaki A, Sakatani T, Fukayama M.
Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein-Barr virus status in gastric cancer.
Int J Clin Exp Pathol. 2011 Mar;4(3):230-240.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071656/?tool=pubmed>
(査読あり)
- ③ Morikawa T, Hino R, Uozaki H, Maeda D, Ushiku T, Shinozaki A, Sakatani T, Fukayama M.
Expression of ribonucleotide reductase M2 subunit in gastric cancer and effects of RRM2 inhibition in vitro.
Hum Pathol. 2010 Dec;41(12):1742-1748.
DOI:10.1016/j.humpath.2010.06.001
(査読あり)

〔学会発表〕（計6件）

- ① 日比谷 孝志、坂谷 貴司、篠崎 綾、孫 敏華、日野 るみ、牛久 哲男、磯貝 まや、石川 俊平、宇於崎 宏、深山 正久
EB ウイルス関連胃癌における microRNA-141 の発現と、発現制御機構としてのメチル化の関係
第8回EBウイルス研究会
2011年7月8日
大阪大学（大阪府）
- ② 篠崎 綾
MicroRNA の病理学
第100回日本病理学会総会
2011年4月28日
パシフィコ横浜（神奈川県）
- ③ 孫 敏華、宇於崎 宏、日野 るみ、篠崎 綾、日比谷 孝志、牛久 哲男、深山 正久
胃癌における SOX2 と SOX9 蛋白質の消失進行ステージと EBV 感染との関連
第100回日本病理学会総会
2011年4月27-29日
パシフィコ横浜（神奈川県）
- ④ 日比谷 孝志、坂谷 貴司、篠崎 綾、孫 敏華、日野 るみ、牛久 哲男、磯貝 まや、石川 俊平、宇於崎 宏、深山 正久
EB ウイルス関連胃癌における microRNA-21 と Programmed cell death 4 発現の検討
第100回日本病理学会総会
2011年4月27-29日
パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑤ 孫 敏華、宇於崎 宏、日野 るみ、篠崎 綾、牛久 哲男、深山 正久
胃癌における SOX9 の発現低下は進行度及びEBV 感染と相関する
第69回日本癌学会学術総会
2010年9月22-24日
大阪国際会議場（大阪府）
- ⑥ 日比谷 孝志、坂谷 貴司、篠崎 綾、孫 敏華、日野 るみ、牛久 哲男、宇於崎 宏、磯貝 まや、深山 正久
胃癌における Programmed cell death 4 発現と microRNA-21 発現の検討
第69回日本癌学会学術総会
2010年9月22-24日
大阪国際会議場（大阪府）

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠崎 綾 (SHINOZAKI AYA)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60581824

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし