

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791449

研究課題名(和文)食道癌におけるPIK3CA/AktとマイクロRNAに関する分子生物学的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of PIK3CA-Akt pathway and miRNAs

研究代表者

赤城 一郎 (AKAGI, ICHIRO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90552662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PI3K-AKT pathwayに関わる遺伝子・miRNAの網羅的解析を施行した。食道癌細胞株においてmiR-141、miR-200b,cおよびmiR-205の高発現を確認した。これらの標的候補としてDNA damage-inducible transcript 4 protein (DDIT4)とPH Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Protein Phosphatase 2 (PHLPP2)を見出した。miR-141の強制発現によるPHLPP2の発現低下が観察され、miR-141がPHLPP2の発現を抑制する事で癌細胞の増殖を促すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on PI3K-AKT pathway and investigated comprehensively mRNA and miRNA expression in normal and tumorous human esophageal squamous cell lines. Using integrated statistical analyses, we identified miR-141, miR-200b, miR-200c, and miR-205 as highly up-regulated onco-miRs in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). According to the computational program TargetScan and our microarray-based comprehensive gene expression analysis, we detected DNA damage-inducible transcript 4 protein (DDIT4) as a target of miR-200b and miR-200c and which was downregulated in ESCC. Also, we detected PH Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Protein Phosphatase 2 (PHLPP2) as a target for miR-141 and which was downregulated in ESCC. As expected, the transfection of miR-141 mimic resulted in significant decrease of the expression of PHLPP2 in esophageal epithelial cell line. These results suggest that miR-141 is a negative regulator of PHLPP2 and promotes cell proliferation in ESCC.

研究分野：食道外科

キーワード：PI3K Akt miR-141 miR-200 DDIT4 PHLPP2

1. 研究開始当初の背景

消化管癌は悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、この克服は現代社会の課題である。特に食道癌においては外科治療・放射線化学療法による集学的治療が行われているが死亡数は多い。食道癌のシグナル伝達経路の中で重要なものの一つとしてPI3K/Akt pathwayが挙げられる。これはPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)がシグナル下流のAktを活性化することで、さまざまな蛋白質に作用し発癌、アポトーシス、細胞増殖、蛋白合成、代謝などに影響を与える経路である。我々はこの経路にいち早く着目し、食道扁平上皮癌患者のリンパ節転移陽性群においてPI3K蛋白の発現率が高いことを報告した (Akagi I et al. Int J Oncol, 2009)。さらに、食道癌細胞株においてAktをknockdownすることで、そのシグナル下流に位置しp53を分解する作用があると言われているMurine double minute 2 (MDM2)の発現が抑制されることを報告した (Takahashi K et al. Exp Mol Pathol, 2009)。

一方転写後翻訳制御の新たな機能を担うmicro-RNA(miRNA)も癌において重要な役割を担うことが明らかになってきている。

2. 研究の目的

本研究の目的は PI3K/Akt pathway に関わるすべての遺伝子・miRNA を網羅的に把握し機能解析を行い、食道癌の分子メカニズムを明らかにすることである。この研究は食道癌のみならず、すべての癌に対する新たな分子標的治療に繋がる可能性を秘めた基盤研究となる。

3. 研究の方法

(1) 細胞

正常食道扁平上皮細胞株 (Het-1A) は、BEBM (ロンザ) に BEGM kit (ロンザ) 中から GA-1000 以外の添加物を加えた培地を用いて 0.01 mg/ml fibronectin, 0.03 mg/ml bovine

collagen type 1 および 0.01 mg/ml bovine serum albumin によりコートしたディッシュ上で培養した。TE-1, TE-5 および TE-8 は 10% の fetal bovine serum (FBS) を含む RPMI1640 を用いて培養した。

(2) miRNA アレイおよび遺伝子発現アレイ
miRNA アレイは miRCURY LNA miRNA Array (Exiqon) を用いた。遺伝子発現アレイは Agilent Expression Array 解析 (タカラバイオ) を用いた。いずれも解析についてはタカラバイオの受託解析サービスを利用した。

(3) miRNA トランスフェクション

Het-1A に Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (ライフテクノロジー) を用いて, mirVana miRNA mimics (ライフテクノロジー) を導入した。

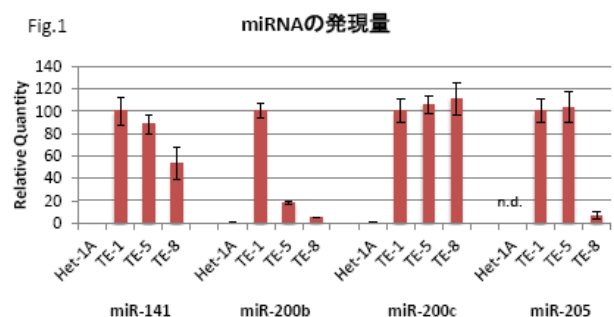
(4) RT-PCR

RT-PCR は KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて添付のプロトコルに従い行った。cDNA はそれぞれの細胞から total RNA を RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いて添付のプロトコルに従い抽出した。cDNA は PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ) を用いた逆転写により作製した。

4. 研究成果

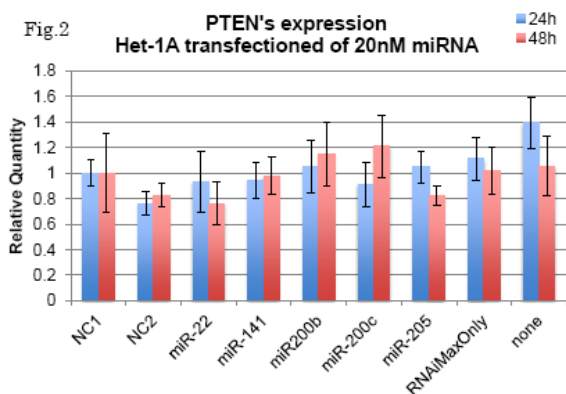
(1) 食道上皮癌細胞株において miR-141、miR-200b、miR-200c および miR-205 は高発現していた。

miRNA アレイの結果と RT-PCR の結果が一致するか、TaqMan プローブを用いた RT-PCR によって定量した。(Fig.1)



(2) Het-1a に対する miRNA の強制発現では PTEN の発現に顕著な影響を与えなかった。

TargetScan のデータベースより、上記の miRNA の全てが癌抑制遺伝子である PTEN を標的とする可能性が示唆されたため、これらの miRNA が PTEN を直接の標的とするか、Het-1a に対する miRNA の強制発現による PTEN 発現の変動を RT-PCR により解析した(Fig.2)。PTEN は Het-1a に比べて 3 種の癌細胞株において発現量が半分程度まで低下していることを RT-PCR によって確認している。

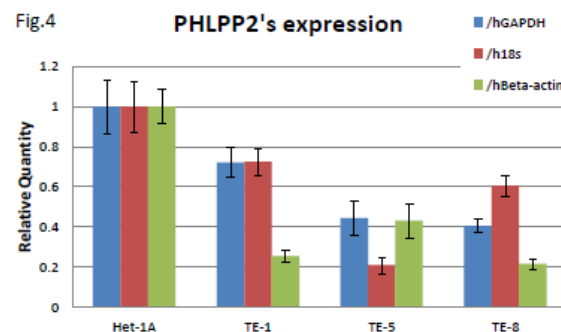
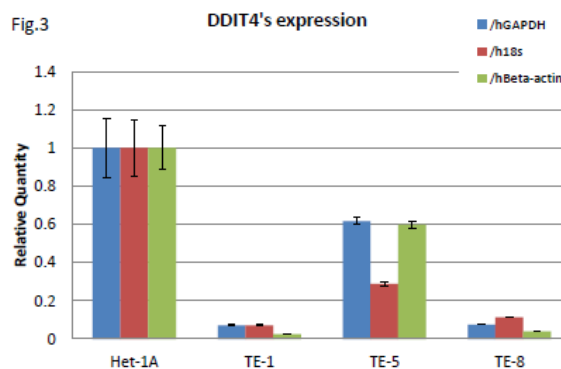


NC = negative control. NC1 の発現量を 1 とした。NC1 および NC2 は無関係な配列の miRNA mimic を強制発現させた。miR-22 は PTEN を標的とすることが知られており、ポジティブコントロールとして用いた。RNAiMaxOnly はトランスフェクション試薬のみ、none は試薬を用いずに PTEN 発現の定量を行った。補正には GAPDH を用いた。

ネガティブコントロールと比較して miRNA 強制発現によって Het-1a における PTEN の発現量の変化は乏しく、ポジティブコントロールとして用いた miR-22 の強制発現によっても PTEN 発現量の変化は小さいことから、Het-1a に対する miRNA トランスフェクションは起こりと考えられた。トランスフェクション条件を変更する事によって改善される可能性を考え、いくつかの条件で試行してみたものの改善は見られなかったため、これらの miRNA と PTEN の関係の調査を打ち切り、新規の標的探しを行うこととした。

(3) DDIT4 および PHLPP2 は癌細胞株で発現が低下していた。

miRNA の新規の標的探索のため Agilent Expression Array 解析 (タカラバイオ) を利用して Het-1a および 3 種の癌細胞株で網羅的に遺伝子発現の比較解析を行った。3 種の癌細胞株の全てで発現が低下している遺伝子のうち PI3K/Akt pathway と関連があり、TargetScan データベースにおいていずれかの miRNA の標的となる可能性を持つものを選抜した結果、miR-200b および miR-200c の標的候補として DNA damage-inducible transcript 4 protein (DDIT4) を、miR-141 の標的候補として PH Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Protein Phosphatase 2 (PHLPP2) を見出した。DDIT4 は低酸素条件において誘導される遺伝子であり、細胞の省エネルギー化に関与している。PHLPP2 は癌抑制遺伝子の一つとして知られるが、DDIT4 は癌との関連を示唆した報告はされていない。DDIT4 および PHLPP2 が Het-1a および 3 種の癌細胞株において発現に差が見られるか RT-PCR により確認した。(Fig.3-4)

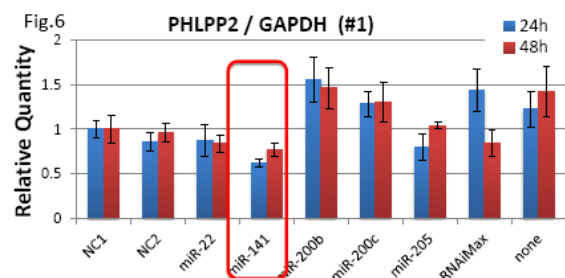
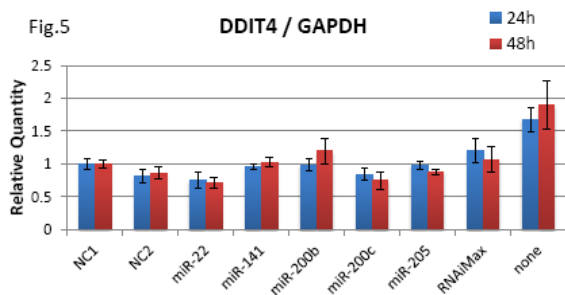


それぞれ Het-1a における発現量を 1 とした。

それぞれの細胞株において補正用のハウスキーピング遺伝子の発現量にバラツキが生じたため GAPDH、18s、Beta-actin の3種を補正に用いた。DDIT4 および PHLPP2 のどちらも癌細胞株において発現が低下していることが確認された。

(4) Het-1a において PHLPP2 は miR-141 の強制発現によって発現が抑制された。

miRNA 強制発現による DDIT4 および PHLPP2 発現への影響を評価するため、Het-1a に miRNA を強制発現させ標的候補遺伝子の発現量を RT-PCR により定量した。(Fig.5-7)



NC1 の発現量を 1 とした。

Het-1a に対する miR-141 の強制発現により PHLPP2 の発現低下が観察された。この結果が miR-200b および miR-200c の強制発現による DDIT4 の発現抑制と比べて大きいことから、今後は PHLPP2 発現と miR-141 発現との関係に研究対象を絞って詳細に調査することとした。Fig.6 の結果を確認するために同様の実験を再度行った (Fig.7)。

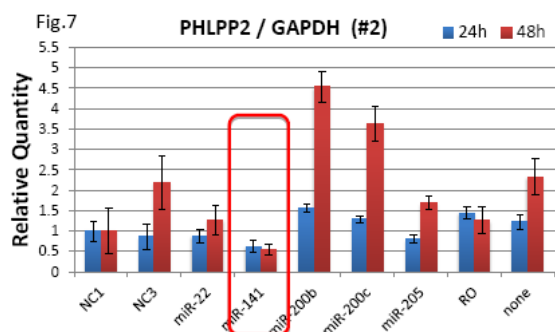


Fig.6 の結果と同様に miR-141 の強制発現によって PHLPP2 の発現は抑制された。これらにより miR-141 が PHLPP2 の発現を抑制する事で癌細胞の増殖を促しアポトーシスを抑制することが示唆された。

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 1 件)

1. Akagi I, Ishibashi O, Matsutani T, Hagiwara N, Matsuda A, Nomura T, Makino H, Yoshida H, Miyashita M, Uchida E. Comprehensive Analysis of MicroRNA and mRNA Expression in Normal and Tumorous Human Esophageal Cell lines Using Microarray Datasets. Datasets Papers in Science, 2014, Article ID 376541, 3 pages.

[学会発表](計 1 件)

1. 赤城一郎、松谷毅、石橋宰、牧野浩司、吉田寛、野村務、萩原信敏、丸山弘、横山正、平方敦史、上田純志、篠塚恵理子、宮下正夫、内田英二
食道扁平上皮癌における PI3K-Akt-mTOR 経路の網羅的解析
第 115 回 日本外科学会 名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤城 一郎 (AKAGI ICHIRO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：90552662

(2)連携研究者

石橋 宰 (ISHIBASHI OSAMU)
大阪府立大学・生命環境学研究科・准教授
研究者番号：70293214