

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590396

研究課題名（和文） 胃がんの臨床病理学的諸性状に関連したマイクロRNAの探索とメチル化異常の解析

研究課題名（英文） Clinicopathological significance and epigenetic alterations of miRNAs in gastric cancer

研究代表者

秋山 好光（AKIYAMA YOSHIMITSU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80262187

研究成果の概要（和文）：本研究では胃がんの発症・進展および臨床病理学的諸性状に関わる miRNA を探索し、その発現異常を検討した。その結果、miR-181c と miR-212 がエピジェネティックなメカニズムで発現抑制されていることが明らかになった。特に、miR-181c の発現には CpG アイランドのメチル化が密接に関連していた。これらの miRNA を胃がん細胞内で強制発現させると細胞増殖が抑制された。一方、CDX2 転写因子の発現には miR-9 が関与しており、リンパ節転移陽性胃がんで miR-9 の発現が高い傾向が認められた。以上、胃がんに関わる新規 miRNA を複数明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The mechanism underlying the aberrant miRNA expression in gastric carcinogenesis remains unclear. Here we observed that miR-181c and miR-212 were epigenetically regulated in gastric cancers (GCs). Methylation status at the CpG island of miR-181c was strongly related to its expression levels. Over-expression of these miRNAs significantly reduced cell proliferation, suggesting a tumor suppressive function. Moreover, miR-9 expression was high in GCs with lymph node metastasis and inversely associated with CDX2 expression. Thus altered expression of these miRNAs may contribute to gastric carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：分子病理、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

マイクロRNA(以下、miRNA)は、タンパク質をコードしない約 22 塩基長の機能性低分子RNAの一つであり、発生、分化、細胞増殖などの様々な過程で時期的、組織特異的に発現している。miRNAは機能的に下流遺伝子の3'-非翻訳領域に結合し、それら遺伝子の発現を翻訳レベルまたはメッセンジャーRNAレベルで調節している。これまでの研究により、miRNAの発現異常は肺がんや大腸がんなどの多くの腫瘍で検出されており、miRNAの異常はヒトがんの発生・進展において重要と考えられている。miRNAは腫瘍において発現亢進しているものと低下しているものがあり、miRNAと標的遺伝子との関係から、前者はがん促進的な機能を持ち、後者はがん抑制的な機能を持つと推測されている。

miR-124aやmiR-34などの発現低下はDNAメチル化異常によって起こることが明らかとなり、一部のmiRNAの発現調節にはエピジェネティックな変化が関わることを示唆された。我々は、胃がん細胞に脱メチル化剤(5aza-dC:5-aza-2'-deoxycytidine)を処理した後に変化するmiRNAについてマイクロアレイにて網羅的に検討し、21個のmiRNAを同定した。これらの発現制御にはDNAメチル化異常が関与する可能性を考えており、胃がん細胞および組織を用いた解析を行っている。

胃がんは、様々な組織形態を示すため、それらの発症機構は異なる可能性がある。これまでに多くの遺伝子異常が胃がんで検出されているものの、その発症における分子レベルでのメカニズムは解っていない。SOX2やCDX2は胃がんの発症に重要な転写因子であり、メチル化異常によってそれらの発現異常が起こっているものの、メチル化がなくとも発現が弱い場合がある。これらは別のメカニズムが関与している可能性が高く、miRNAも一つの候補と考えられる。しかし、胃がんにおけるmiRNAの解析はほとんど行われておらず、胃がん発症・進展および臨床病理学的諸性状に関わるmiRNAは不明である。

2. 研究の目的

胃がんの発症機構においてmiRNAが果たす役割を解明することは重要と考えられる。本研究では、胃がん細胞株において脱メチル化剤処理後に発現変化したmiRNAおよび、既に発現異常が検出されている転写因子群に着目し、以下に示すように胃がん細胞と組織におけるmiRNAの解析を行った。

①胃がんの発症に関わるmiRNAを探索し、その発現制御機構の破綻についてエピジェネティックな面から解明する。②更に、胃がんの臨床病理学的諸性状と密接に関連するmiRNA異常を明らかにする。③今後、miRNA

研究を進展させるためには、パラフィン切片を用いた発現解析が重要であるため、パラフィン切片からのmiRNA抽出法を確立させる。

3. 研究の方法

1) 対象: 10例の胃がん培養細胞株(MKN7, MKN45, MKN74, TGBC11TKB, AGS, HSC58, GCIY, NUGC3, NUGC4, KATO-III)と3例の大腸がん培養細胞株(CoLo320DM, HCT116, HCT116-DNMT1/3b KO)を用いた。更に、16例の原発性胃がん症例とその非がん部胃粘膜上皮を対象とした。複数のがん細胞株に対し、最終濃度5 μ Mとして5aza-dCを処理し、72時間培養後に回収した。TrizolまたはmiRNeasy mini kitにてRNAおよびmiRNAを抽出した。胃がん組織からのmiRNA抽出には、TrizolまたはRecover-All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)を用いた。

2) miRNAマイクロアレイ解析: 5aza-dC処理前後のKATO-III細胞からmiRNAを抽出し、miRNAマイクロアレイ(Ambion: mirVana miRNA Bioarrays V2)を行った。

3) cDNA合成とRT-PCR: 1~2 μ gのRNAを用いてSperScript-IIIでcDNA合成を行い、RT-PCRを行った。miRNAについては、Applied Biosystems社のTaqMan Universal PCR Master Mix, TaqMan Reverse Transcription kitおよびTaqMan miRNA assaysを用いてcDNA合成後、リアルタイムRT-PCRを行った。

4) メチル化解析: DNA1 μ gを用いて、Sodium Bisulfite処理を行った。次に、メチル化特異的PCRにより、メチル化の有無を判定した。

5) miRNA導入実験: 合成miRNA前駆体またはmiRNAアンタゴニストを胃がん細胞へ導入した。対照はPre-miR Negative Controlを用いた。miRNA導入後、WST-8法にて細胞増殖能を測定した。

6) レポーター解析: miRNAと推定標的遺伝子との結合について、標的遺伝子の3'-非翻訳領域をPCRで増幅し、pGL4.13(luc2/SV40)レポーターベクターに組み込み、miRNAとのco-transfectionによりレポーター活性を測定した。

7) miRNA標的遺伝子の探索: 合成miRNA前駆体をがん細胞に導入後、発現変化した遺伝子についてcDNAマイクロアレイ(Agilent: Whole Human Genome oligo DNA arrays)で網羅的に調べた。その後、通常のRT-PCRまたはリアルタイムPCR、Western blot法により標的遺伝子の発現変化を検証した。

8) 免疫組織化学染色: 胃がん組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、本研究で解析している遺伝子(CDX2, MeCP2など)のタンパク質発現を免疫組織化学染色法で調べた。

4. 研究成果

1) メチル化によって発現制御される miRNA の検出:

KATO-III 胃がん細胞について 5-aza-dC 処理を行い、miRNA マイクロアレイを行った結果、21 個の成熟型 miRNA の発現は未処理と比べて 2 倍以上亢進していた。このうち、発現変化が 3 倍以上と大きかった 5 つの miRNA を選んで RT-PCR で発現を調べた。次にコンピュータ解析で

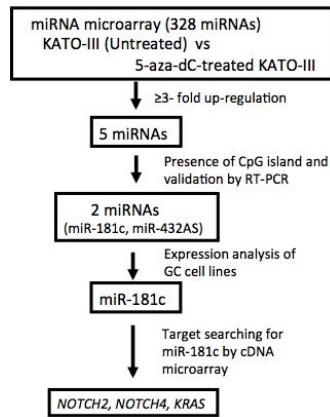


図1 実験の流れ

miRNA 配列上流に CpG アイランドが存在していた miRNA を探索したところ、2 つの miRNA (miR-432AS と miR-181c) が候補として残った。胃がん細胞株と大腸がん細胞株の脱メチル化剤処理を行って検討し、miR-181c が最終候補となった(図1)。miR-181c は複数のがん細胞株で脱メチル化剤処理によって発現回復するばかりでなく、メチル化転移酵素である DNMT1 と DNMT3B をノックアウトした HCT116 細胞(DKO)でも発現が認められたが、ヒストン脱アセチル化阻害剤処理では変化がなかった。miR-181c の転写開始部位上流には CpG アイランドが存在していることが、RACE 解析とコンピュータ解析によって明らかになったため、その部分でメチル化特異的 PCR(MSP)を行った。その結果、miR-181c のメチル化と発現が一致していた(図2)。

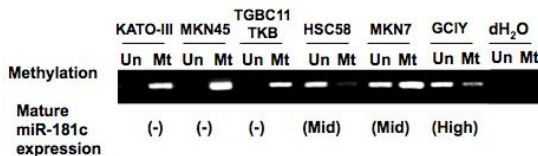


図2 胃がん細胞での miR-181c のメチル化と発現

miR-181c の発現は成熟 (mature) 型だけでなく、その前駆体 (precursor) レベルでも脱メチル化剤処理で発現回復していた(図3)。胃がん組織 16 例について miR-181c の発現を検討した結果、9 例は非がん部胃粘膜上皮よりも発現が低く、4 例でメチル化も検出された。従って、この miRNA の発現は DNA メチル化異常によって、precursor (または primary) レベルで発現が調節されていることが明らかになった。

miR-181c の機能的役割を明らかにする目的で、合成前駆体 miR-181c の胃がん細胞株への導入実験を行った。導入後、KATO-III と MKN45 では細胞増殖の抑制が起こった。また、

cDNA マイクロアレイにより、発現変化した miR-181c 標的遺伝子の探索を行った結果、がん遺伝子 KRAS、NOTCH2 および NOTCH4 の発現が低下した。更に、レポーター解析により、miR-181c が直接、KRAS と NOTCH4 の 3'-非翻訳領域に結合することが明らかになった。以上より、miR-181c はがん抑制的な機能を持つことが示唆された。

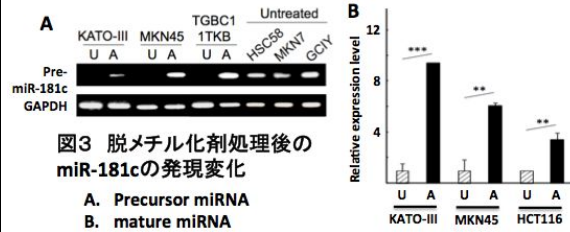


図3 脱メチル化剤処理後の miR-181c の発現変化

また、miRNA マイクロアレイの選択基準を弱くした場合、21 個の miRNA に加えて多くの miRNA の発現が回復していることが明らかになった。それら miRNA の標的遺伝子のデータベース解析したところ、一部の標的遺伝子は共通であった。そこで、複数の miRNA を胃がん細胞へ導入したところ、相乗、相加的に標的遺伝子の発現が減少した。この結果より、メチル化によって発現低下している複数の miRNA は相乗または相加的にも共通の遺伝子発現を制御している可能性が推測された。現在、複数の臨床検体を用いてそれらのメチル化を解析中である。

2) 胃がんにおける miR-212 の発現低下:

分化型および未分化型の胃がん細胞株 3 例 (MKN7, MKN74, NUGC4) を用いた miRNA マイクロアレイの結果、miR-212 の発現が共通して正常胃粘膜上皮よりも低かった。これらの細胞株に脱メチル化剤処理を行った場合、miR-212 の発現が亢進したが、MSP 解析では発現に一致したメチル化異常が認められなかった。今後、miR-212 発現におけるエピジェネティックな発現調節機構について更に明らかにする必要がある。

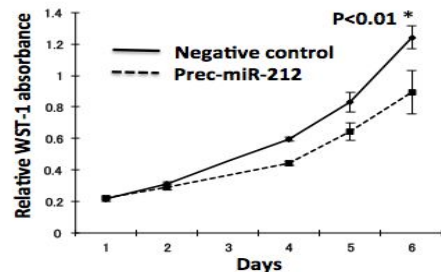


図4 miR-212 の細胞増殖抑制効果

合成 miR-212 前駆体を胃がん細胞に導入した結果、細胞増殖が抑制された(図4)。更に miR-212 標的遺伝子のデータベース検索、レポーター解析および免疫組織化学染色の結果、MeCP2 が miR-212 の直接の標的遺伝子で

あることが明らかになった。

3) 転写因子 CDX2 の発現を制御する miRNA :

胃がんの組織型は分化型と未分化型の2つに大別されており、分化型胃がんの発生には腸上皮化生が関与している。CDX2 転写因子は腸上皮化生や分化型胃がんで強く発現していることが報告されているが、胃がんの中には CDX2 発現が低下している症例が存在している。我々は以前、胃がんにおける CDX2 発現低下にはメチル化異常が関与していることが報告した。しかし、一部の胃がんでは CDX2 のメチル化は陰性であるが、タンパク質発現も弱い症例が存在していることが明らかになった。我々は、CDX2 の 3'-非翻訳領域について miRNA のデータベース検索を行った結果、miR-9

が候補となった。胃がん細胞株と原発胃がん組織において miR-9 と CDX2 発現の比較を行ったところ、CDX2 タンパク質発現とは逆相関が

認められた(図5)。また、miR-9 の発現はリンパ節転移陽性胃がんで高い傾向が示唆された。

合成 miR-9 前駆体を胃がん細胞へ導入した結果、CDX2 はタンパク質レベルで発現低下した。一方、miR-9 アンタゴニストを miR-9 発現陽性胃がん細胞へ導入すると、CDX2 発現および CDX2 標的遺伝子(p21, TFF3, MUC2)発現が増加し、更に細胞増殖抑制が認められた。一方、miR-9 は乳がんなどでメチル化異常によって発現低下していることが報告されており、本研究でも症例数は少ないが一部の胃がんにおいて miR-9 のメチル化が検出された。我々の胃がんにおける検討により、miR-9 は発現亢進と低下している場合があり、両者は機能的にも異なる可能性が示唆された。

4) パラフィン切片からの miRNA 抽出と発現解析 :

本研究中に通常の病理診断で用いるホルマリン固定パラフィン包埋切片を利用して miRNA 抽出を試みた。10 μ m の切片を脱パラフィン後、Trizol 法と市販のキットを用いて miRNA を抽出した。我々の結果では、Recover-All Total Nucleic Acid Isolation Kit を用いたところ、比較的良好な量と質の miRNA が得られた(文献 1、2 で発表)。

以上、本研究により胃がんに関与する新規 miRNA を複数単離することができた。特に、miR-181c はメチル化との関連性が強く、今後

胃がん症例数を増やしたメチル化解析が必要である。

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 11 件)

① Rotkrue P, Akiyama Y, Hashimoto Y, Otsubo T, Yuasa Y: MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. International Journal of Cancer, 129, p2611-2620, 2011.

② Otsubo T, Akiyama Y, Hashimoto Y, Shimada S, Goto K, Yuasa Y: MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. PLoS One, 6:e16617, 2011.

③ Hashimoto Y, Akiyama Y, Otsubo T, Shimada S, Yuasa Y: Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. Carcinogenesis, 31, p777-784, 2010.

④ Wada R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Fukamachi H, Yuasa Y: miR-212 is down-regulated and suppresses the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancers. International Journal of Cancer, 127, p1106-1114, 2010.

⑤ Wen XZ, Akiyama Y, Pan KF, Liu ZJ, Lu ZM, Zhou J, Gu LK, Dong CX, Zhu BD, Ji JF, You WC, Deng DJ: Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas. World Journal of Gastroenterology, 16, p1201-1208, 2010.

⑥ Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Takizawa T, Kojima K, Kawano T, Sugihara K, Imai K, Nakachi K: DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. International Journal of Cancer, 124, p2677-2682, 2009.

⑦ Hellebrekers DMEI, Lentjes, MHFM, van den Bosch SM, Wouters AD, Daenen K, Melotte V, Smits KM, Partouns-Hendriks IEJM, Akiyama Y, Yuasa Y, Sanduleanu S, Khalid-de Bakker C, Jonkers D, Weijenberg MP, Louwagie J, van Criekinge W, Carvalho B, Meijer GA, Baylin SB, Herman JG, de Bruïne AP, van Engeland M: GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. Clinical Cancer Research, 15, p3990-3997, 2009.

⑧ 秋山好光, 湯浅保仁: マイクロ RNA 発現異常とがん. Medical Science Digest, 38, p12-15, 2012.

⑨ 秋山好光. miRNA を利用した癌診断. 医学

のあゆみ, 238, p560-565, 2011.

⑩ 秋山好光. microRNA 発現プロファイルの胃癌診断への応用. 胃がん Perspective, 4, p12-19, 2011.

⑪ 秋山好光、橋本裕、湯浅保仁: microRNA を利用した癌診断. 遺伝子医学 MOOK15, p152-156, 2009.

〔学会発表〕(計 20 件)

代表的な 20 件を選んだ。

① 秋山好光、鈴木裕介、橋本裕、甲田祐樹、芝紀代子、湯浅保仁. 胃がん細胞における転写因子 GATA4 および GATA5 の miRNA 発現調節への関与. 第 70 回日本癌学会総会, 2011 年 10 月 3~5 日, 名古屋.

② 橋本裕、秋山好光、湯浅保仁. 胃がん細胞において脱メチル化剤処理により発現増加する複数の miRNA とその共通の標的遺伝子の検出. 第 70 回日本癌学会総会, 2011 年 10 月 3~5 日, 名古屋.

③ 甲田祐樹、秋山好光、橋本裕、大坪武史、芝紀代子、湯浅保仁. 胃癌における histone H3K4 methyltransferase SET7 の変化と機能の解析. 第 70 回日本癌学会総会, 2011 年 10 月 3~5 日, 名古屋.

④ 秋山好光、鈴木裕介、橋本裕、甲田祐樹、芝紀代子、湯浅保仁. 転写因子 GATA4/5 による miRNA の発現解析. 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011 年 5 月 19~20 日, 熊本.

⑤ Akiyama Y, Nagasaki H, Yuasa Y. Epigenetic alterations of GATA4 and GATA5 transcription factors in gastric cancers. NRF A3 Foresight Program - IGCC2011, 2011 年 4 月 20~23 日, Seoul, Korea.

⑥ Pichayanoot R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Otsubo T, Yuasa Y. Mir-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. NRF A3 Foresight Program - IGCC2011, 2011 年 4 月 20~23 日, Seoul, Korea.

⑦ Hashimoto Y, Akiyama Y, Otsubo T, Yuasa Y. Up-regulation of miRNAs by treatment with the chromatin-modifying drugs and identification of common target genes in gastric cancer cells. NRF A3 Foresight Program - IGCC2011, 2011 年 4 月 20~23 日, Seoul, Korea.

⑧ Akiyama Y, Nagasaki H, Yuasa Y. Target gene analysis of GATA4 and GATA5 transcription factors in gastric cancer cells. The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing, 2011 年 2 月 14~15 日, 東京.

⑨ Akiyama Y, Nagasaki H, Yuasa Y. Hypermethylation of GATA4 and GATA5 transcription factor genes and loss of their functions in gastric cancers. The

Second International Cancer Epigenetics Symposium, October 15-17, 2010, Beijing, China.

⑩ 秋山好光、長崎弘美、湯浅保仁. 胃がん細胞における転写因子 GATA4 と GATA5 転写因子の標的遺伝子の解析. 第 69 回日本癌学会総会, 2010 年 9 月 22~24 日, 大阪.

⑪ 橋本裕、秋山好光、大坪武史、湯浅保仁. 胃がんにおける miRNA クラスターの発現とメチル化の解析. 第 69 回日本癌学会総会, 2010 年 9 月 22~24 日, 大阪.

⑫ 大坪武史、秋山好光、橋本裕、湯浅保仁. マイクロ RNA-126 は SOX2 発現を抑制し胃がん発症に関わる. 第 69 回日本癌学会総会, 2010 年 9 月 22~24 日, 大阪.

⑬ Akiyama Y, Nagasaki H, Yuasa Y. Target gene analysis of GATA4/5 transcription factors in gastric cancers. The 5th Asian Epigenomics Meeting & A3 Symposium 2010, June 20-22, 2010, Jeju, Korea.

⑭ Pichayanoot R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Yuasa Y. Epigenetic inactivation of the miR-9 genes in gastric carcinogenesis through CDX2 deregulation. The 5th Asian Epigenomics Meeting & A3 Symposium 2010, June 20-22, 2010, Jeju, Korea.

⑮ 秋山好光、長崎弘美、湯浅保仁. The target gene analyses of GATA4/5 transcription factors in gastric cancer. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2010 年 5 月 28~29 日, 鳥取.

⑯ Akiyama Y, Nagasaki H, Kawamoto A, Herman JG, Baylin SB, Yuasa Y. Methylation of GATA4 and GATA5 transcription factor genes in gastric cancers. 101st AACR Annual Meeting, April 17-21, 2010, Washington DC.

⑰ Otsubo T, Akiyama Y, Hashimoto Y, Yuasa Y. MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression in gastric cancer cells. 101st AACR Annual Meeting, April 17-21, 2010, Washington DC.

⑱ 秋山好光、長崎弘美、湯浅保仁. 胃がん発症における GATA4 と GATA5 転写因子の役割. 第 68 回日本癌学会総会, 2009 年 10 月 1~3 日, 横浜.

⑲ 橋本裕、秋山好光、大坪武史、島田周、湯浅保仁. CpG アイランドメチル化による miRNA-181c の胃がんにおけるエピジェネティックな発現低下. 第 68 回日本癌学会総会, 2009 年 10 月 1~3 日, 横浜.

⑳ 秋山好光、長崎弘美、湯浅保仁. 胃がんにおける転写関連遺伝子 GATA4/5 のメチル化異常と機能解析. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2009 年 5 月 22~23 日, 東京.

〔図書〕(計 2 件)

① 秋山好光. エピジェネティクスと電気泳動. 改訂版-そこが知りたい電気泳動. 大

藤道衛 編集、羊土社、p68-70、2011.

②湯浅保仁、秋山好光. 胃がん. がん生物学
イラストレイテッド. 渋谷正史、湯浅保仁
編集、羊土社、p368-375、2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

本研究の成果の一部は、当教室ホームページ
に掲載した。

<http://www.tmd.ac.jp/grad/monc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山好光 (AKIYAMA YOSHIMITSU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師

研究者番号：80262187

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし