

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790327

研究課題名(和文)

マイクロRNAを標的とした胃がんに対するエピジェネティック治療

研究課題名(英文)

Epigenetic therapy for gastric cancer by targeting microRNAs

研究代表者

斎藤 義正 (SAITO YOSHIMASA)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90360114

研究成果の概要(和文)：

本研究において、胃がん細胞に DNA メチル化阻害薬やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬などを用いたエピジェネティック治療を行うことによって、がん抑制マイクロ RNA *miR-512-5p* の発現を活性化し、標的がん遺伝子 MCL1 を抑制することでアポトーシスを誘導することに成功した。さらにマイクロ RNA が消化管悪性腫瘍のみならず、機能性ディスぺプシアをはじめとする機能性消化管障害の病理にも重要な役割を果たすことを示した。本研究の成果が消化管悪性腫瘍や機能性消化管障害の新たな治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：

In the present study, epigenetic therapy using DNA methylation inhibitors and histone deacetylase inhibitors activates the tumor suppressor microRNA *miR-512-5p* in human gastric cancer cells. Activation of *miR-512-5p* by epigenetic therapy induces suppression of MCL-1, resulting in apoptosis of gastric cancer cells.

In addition, our study suggests that microRNAs play important roles in the pathogenesis of functional gastrointestinal disorders including functional dyspepsia.

The results in the present study may provide a novel therapeutic approach for gastrointestinal malignancies as well as functional gastrointestinal disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子腫瘍学、消化器病学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：マイクロ RNA、エピジェネティクス、胃がん、機能性消化管障害、*Helicobacter pylori*、機能性ディスぺプシア

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における胃がんによる死亡率は減少傾向にあるものの、依然としてがん死亡率

の第2位を占める悪性腫瘍であり、特に手術不能な進行胃がんに対しては化学療法の効果は限定的で予後も不良である。

マイクロ RNA は 21-25 塩基程度の小さな非コード RNA であり、1 つのマイクロ RNA が多くの標的遺伝子の発現を抑制している。マイクロ RNA は組織特異的、発生段階特異的に発現しており、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどに重要な役割を果たしている。

我々は、マイクロ RNA の発現がエピジェネティクス変化によって制御されていることを世界に先駆けて報告した。現在欧米を中心に DNA メチル化阻害薬やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬をがん治療に応用するエピジェネティック治療が開始されている。DNA メチル化阻害薬であるシチジン類似体の 5-Azacytidine (5-Aza-CR) が骨髄異形成症候群の治療薬として米国 FDA に承認され、臨床の現場でがん患者に投与され効果をあげている。その他、新たな DNA メチル化阻害薬である Zebularine や 4-Phenylbutyric acid をはじめとする多くのヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が現在臨床治験中である。

## 2. 研究の目的

本研究では胃がんの発生・進展において重要な役割を果たすマイクロ RNA を網羅的に探索し、エピジェネティック治療がマイクロ RNA の発現制御を介して抗腫瘍効果を示す分子機序の解明を目指す。マイクロ RNA のエピジェネティクス制御に基づく新たな胃がんの治療戦略を開発するための基盤となる研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 胃がん細胞株 AGS, MKN45, TMK1 に DNA メチル化阻害薬 (5-Aza-2'-deoxycytidine など) やヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (4-Phenylbutyric acid など) を投与し、エピジェネティック治療後の DNA メチル化やヒストン修飾の変化ならびにマイクロ RNA の発現プロファイルを網羅的に解析した。

(2) 長期間 (約 1 年間) *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) に感染させたマウスの胃ならびにコントロールマウス胃におけるマイクロ RNA の発現プロファイルを比較検討した。

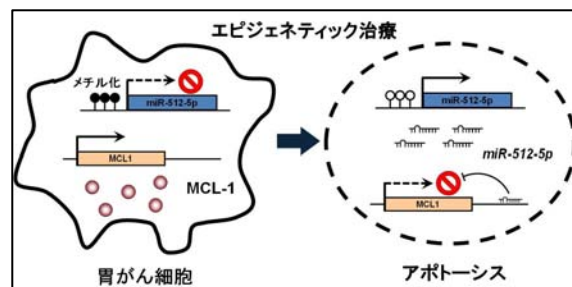
(3) 胃がん患者より、十分なインフォームド・コンセントのもとに胃がん組織および非がん胃粘膜を採取し、マイクロ RNA の発現プロファイルを網羅的に解析した。

(4) 上記の実験系にて有意な発現変化の認められたマイクロ RNA については、定量的 RT-PCR にて発現変化を確認すると同時に標的遺伝子についても検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 胃がん細胞株 AGS を DNA メチル化阻害薬およびヒストン脱アセチル化酵素阻害薬で処理し、マイクロ RNA の発現変化を網羅的に解析した。興味深いことに、エピジェネティック治療によって最も大きな発現変化を認めたマイクロ RNA の多くが染色体 19 番上の反復配列である Alu 配列近傍に位置しており、特に最も高い発現上昇を認めた *miR-512-5p* は抗アポトーシス因子である *Mcl-1* がん遺伝子を標的としており、エピジェネティック治療による *miR-512-5p* の誘導が *Mcl-1* の抑制を介してアポトーシスを引き起こすことが示された (図 1)。

図 1 胃がんに対するエピジェネティック治療の原理



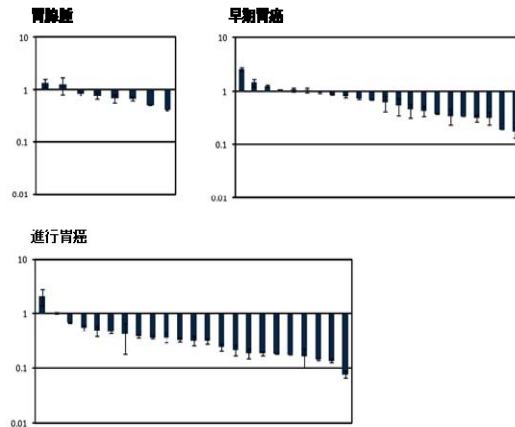
(2)長期間 *H. pylori* に感染させたマウスの胃におけるマイクロ RNA の発現プロファイルを検討したところ、*H. pylori* 感染マウスの胃において筋組織特異的マイクロ RNA である *miR-1* と *miR-133* が有意に発現低下している結果を示した。筋組織特異的マイクロ RNA の発現低下は、それらの標的遺伝子である HDAC4 や SRF の発現を活性化し、胃平滑筋の過形成を誘導した。さらに著明な胃平滑筋の過形成を認めた *H. pylori* 感染マウスにおいては胃排出能が有意に亢進していた。 *In vitro* の検討においても、myoblast である C2C12 細胞に *H. pylori* を共培養させると *miR-1* および *miR-133* の発現が有意に低下し、細胞増殖が亢進することが確認された。

以上の結果から、慢性的な *H. pylori* 感染が筋組織特異的マイクロ RNA の発現低下およびその標的遺伝子である HDCA4 や SRF の発現を亢進させ、*H. pylori* 感染マウス胃における筋層の過形成を誘導し、胃排出能を亢進させたと考えられた。

マイクロ RNA が癌のみならず、機能性ディスペプシア (FD) をはじめとする消化管機能障害にも重要な役割を果たす可能性を示した点で非常に意義があると思われる。今後のさらなる研究によって、マイクロ RNA が FD や過敏性腸症候群 (IBS) などの消化管機能障害の新たな分子マーカーや予防・治療の標的となることが期待される。

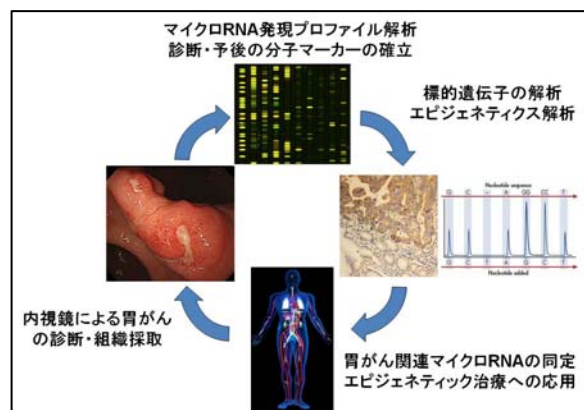
(3) 実際の胃がんの臨床検体を用いてマイクロ RNA の解析を行ったところ、胃発がん過程において、がん促進マイクロ RNA である *miR-21* の発現上昇やがん抑制マイクロ RNA である *miR-29c* の発現低下を認めた。特に *miR-29c* については図 2 に示す通り、発現低下と腫瘍の進展に相関を認めている。現在これらの標的遺伝子などを解析しているが、これらのマイクロ RNA が胃がんの新たな治療標的となる可能性がある。

図 2 胃がんにおける *miR-29c* 発現の検討 (U6 にて補正、がん部/非がん部を対数表示)



(4)マイクロ RNA は内在性の siRNA とも考えられており、国内外でがん治療薬の新たな標的として大きな注目を集めている。エピジェネティック治療により元々生体に存在するマイクロ RNA の発現を制御することから、従来の外来性 siRNA などを用いた遺伝子治療よりも安全性の点で格段に優れていると考えられる。さらに一つのマイクロ RNA が複数の標的遺伝子を抑制するため、相乗的効果が期待できる。本研究の成果が現行の化学療法でも効果の得られない難治性胃がんや機能性消化管障害に対する新たな治療戦略につながることを期待される (図 3)。

図 3 マイクロ RNA とエピジェネティクスを標的とした胃がんの診断・治療戦略



## 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4件)

1. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Suzuki S, Matsuzaki J, Hirata K, Hibi T. Dysfunctional gastric emptying with downregulation of muscle-specific microRNAs in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology*. 2011; 140(1): 189-98. (査読有)
2. Kurita S, Higuchi H, Saito Y, Nakamoto N, Takaishi H, Tada S, Saito H, Gores G, Hibi T. DNMT1 and DNMT3b silencing sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis via up-regulation of TRAIL-R2/DR5 and caspase-8. *Cancer Sci*. 2010; 101(6): 1431-9. (査読有)
3. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Nakagawa I, Matsuzaki J, Kanai Y, Hibi T. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced *microRNA-512-5p* with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene*. 2009; 28(30): 2738-44. (査読有)
4. Saito Y, Suzuki H, Hibi T. The role of microRNAs in gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol*. 2009; 44 Suppl 19:18-22. (査読無)

[学会発表] (計3件)

1. Digestive Disease Week (New Orleans, USA, 5.5.2010) Poster presentation Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Tsugawa H, Hosoe N, Hibi T. Downregulation of the tumor suppressor *microRNA-29c* plays a critical role in the progression of human gastric cancer.

2. Digestive Disease Week (New Orleans, USA, 5.2.2010) Oral presentation Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Hibi T. Overexpression of *miR-142-5p* and *miR-155* and suppression of *tumor protein 53-induced nuclear protein 1* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.

3. Digestive Disease Week (New Orleans, USA, 5.2.2010) Oral presentation Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Suzuki S, Matsuzaki J, Hirata K, Hibi T. Chronic infection with *Helicobacter pylori* induces downregulation of muscle-specific microRNAs and smooth muscle hypertrophy of the mouse stomach.

[図書] (計1件)

Suzuki H, Saito Y, Hibi T. MicroRNAs in Gastric Cancer. In *MicroRNAs in Cancer Translational Research*. William C.S. Cho (ed); Springer Science (in press).

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斎藤 義正 (SAITO YOSHIMASA)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 90360114

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし