

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2009～2010
課題番号：	21791312
研究課題名(和文)	消化器腫瘍におけるmicroRNAの発現異常と発癌への関与についての検討
研究課題名(英文)	Carcinogenesis related to inappropriate expression of microRNAs in digestive organ tumor
研究代表者	
	高城 武嗣 (Takagi Takeshi)
	大阪医科大学・医学部・非常勤医師
	研究者番号： 80531897

研究成果の概要(和文)：

胃癌由来細胞株 NUGC-3 と大腸癌由来細胞株 DLD-1 の 5-FU 耐性株を作成し、miR-143,-145,-34a を transfection したところ、細胞増殖抑制効果があった。また、これらを transfection した後に 5-FU を投与すると、耐性株の 5-FU 感受性が増加した。DLD-1 耐性株において、5-FU の投与で PI3K/Akt 系が活性化され、miR34a の発現が持続的に抑制されていた。また、Sirt1 は miR34a の標的遺伝子の一つであるが、siR-Sirt1 を投与すると耐性株の 5-FU 耐性が解除された。消化器癌の薬剤耐性のメカニズムを探り、microRNA によって抗癌剤薬剤耐性の解除を行い、抗癌剤感受性の向上につなげ、臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Down-regulation of specific microRNAs (miRNAs) occurs in human tumors, which suggests a function for miRNAs in tumor suppression. Here, we show that the expression levels of miRNAs (miRs)-143, -145 and -34a were decreased in most of human gastric cancers. The transfection experiments of human gastric NUGC-3 cells with miR-145 exhibited a greater growth inhibitory effect than that with miR-143. In NUGC-3 cells, the supra-additive effect on growth inhibition was shown by the combination treatment which are the exposure of 5-FU and transfection with miRs-143, -145, or 34a. Taken together, these findings suggest that miRs-143, -145 and 34a play as anti-oncomirs common to gastrointestinal tumors. On the other hand, miR-34a was one of the down-regulated microRNAs in human colon cancer DLD-1 cells. After the exposure at 30 mM of 5-FU, which enhanced PI3K/Akt signaling markedly in 5-FU resistant cells in comparison with original cells, the expression level of miR-34a was considerably down-regulated. Sirt1, which was one of the target genes for miR-34a and related to drug resistance, was strikingly up-regulated in 5-FU resistant cells. The enforced expression of miR-34a in 5-FU resistant cells enhanced sensitivity to 5-FU through down-regulation of Sirt1. The silencing Sirt1 by using siRNA for Sirt1 canceled the resistance to 5-FU in 5-FU resistant cells. These findings suggested that miR-34a regulates at least in part the sensitivity to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃十二指腸外科学

1. 研究開始当初の背景

microRNAは大きさが18から25ヌクレオチドの小さなRNAで、70-80%シーケンスが相補的に合致するmRNAと結合し、翻訳を抑制することが明らかになった。miR-143,-145,-34aは胃癌で高率に低下して発癌に関与し、miR-7,-21は高率に上昇し新たな腫瘍マーカーとなる可能性が示された。この結果が種々の消化器腫瘍に当てはまるか否かを検討し、microRNAの臨床応用への道を探りたいと考えた。

厚生労働省の統計によると、平成19年度も日本人の死因の一位は悪性新生物であった。中でも胃癌は人口10万人対死亡率が平成7年度は男性52.6人、女性28.5人、平成19年度は男性53.9人、女性27.0人と、胃癌死亡数増加に一定の歯止めがかかったものの、減少ははかれぬまま平成19年度は依然癌死因の男性2位、女性3位となっている。また胃癌ではピロリ菌の除菌や食生活の改善程度しか予防策はないが、胃癌死亡数の減少に寄与するのは難しい。さらに進行胃癌の根治治療は現在も極めて困難であり、出来るだけ早期に胃癌を発見し治療を行う事が重要である。

ところが胃の精密検査（上部消化管造影検査や上部消化管内視鏡検査）は被験者に多大な負担になること、早期発見は内視鏡や超音波、核医学分野など術者の画像診断技術や診断能力等、医師の技能や機器の性能に左右されやすいこと、病理診断の際も病理医の間で癌であるのか否かの判断が分かれる場合がみられる事などの理由で、胃癌対策が極めて重要であるにも関わらず問題が山積している状況である。我々はこのような問題に対して、遺伝学的知見が胃癌の克服に導く有効なツールであると考えている。

microRNA（以下miRNAと略す）は大きさが18から25ヌクレオチドの小さなRNAで、蛋白をコードしないRNAである。miRNAは*C. elegans*, *Drosophila*, plants, mouseそしてヒトに至るまで生物の種を超えて見いだされており、ヒトにおいては500を超えるmicroRNA(miRNA)が同定されている。miRNAは1993年にLee等によって初めて報告されたが、この報告でmiRNAのLin-4が*C. elegans*の幼生の第1期から第2期の移行に不可欠であり、その働きとして、標的となるmessenger RNA（以下mRNAと略す）の3'末端非翻訳領域に結合して翻訳を抑制することを明らかにした。その後研究がすすみ、動物においてmiRNAはヘアピン構造をとる

部分的に2本鎖の75ヌクレオチド以下の大きさのpri-miRNAがDrosha、RNase III Dicerと順に切断されてmatureなmiRNAとなり、RISCと結合して約70-80%シーケンスが相補的に合致するmRNAと結合し、3'末端非翻訳領域に結合して翻訳を抑制することを明らかになった。

興味深いことに、miRNAは癌との間にも密接な関係が報告されている。例えば慢性リンパ性白血病でしばしば異常が認められる13q14領域にヒトのmiRNAのmiR-15aとmiR-16が標的になっており、13q14領域のLOHを有する慢性リンパ性白血病患者でmiR-15aとmiR-16の発現の低下が認められたことが報告されている。また肺癌症例においてヒトmiRNAのlet-7の発現が低下しており、肺癌の細胞株にlet-7を過剰発現させると増殖が78.6%に抑制されることが報告されている。さらに乳癌においてmiR-125b、miR-145、miR-21、miR-155、胃癌大腸癌においてmiR-143やmiR-145の関与が指摘されている。

我々は胃癌43例とヒト胃癌細胞株5系統を用いて、miR-143,-145,-7,-21,-34aの発現を検討した。

real time PCR、Western blot、PT-PCR、transfection等を行った。その結果、real time PCR法にて胃癌組織では胃非腫瘍部と比較してmiR-143は69.8%、miR-145は62.8%、miR-34aは46.5%低下していた。これら3種のmiR全て低下は44.2%であった。細胞株ではmiR-143,-145は100%、miR-34aは80%低下していた。miR-21は胃癌組織で39.5%、細胞株で100%上昇していた。

MKN-45、KATOIIIはmiR-143の導入で細胞増殖が抑制され、細胞増殖関連MAP kinaseであるERK5の発現が低下した。また、miR-145をMKN-45に導入すると細胞増殖が抑制され、細胞増殖因子レセプターIRS-1と細胞骨格ACTBの発現が低下した。

また、miR-143とmiR-145を併用は単独よりも細胞増殖抑制効果が高まり、miR-143およびmiR-145の導入は5FUの感受性を上昇させることも確認した。

miR-143,-145,-34aは胃癌でも高率に低下して発癌に関与し、消化管腫瘍共通のanti-oncomirとして働いている可能性が示唆された。以前より我々が胃腸症例でmiR-143の標的遺伝子として指摘しているERK5が胃癌でも標的であると確認され、さらにmiR-145の標的としてIRS-1、ACTBが考えられた。miR-143およびmiR-145は

RNA 医薬への応用が期待され、miR-7,21 は新たな腫瘍マーカーとなる可能性が示された。(Oncology 2009)

我々は以上の背景から胃癌における miRNA の機能を明らかにすることにより発癌のメカニズムに迫ることを今回の研究目的とした。また miRNA の発現異常が腫瘍の早期診断や病態の進行度そして薬物治療の効果判定等に有用なマーカーとして応用できるのではないかと考えている。さらに胃癌細胞株の中で発現が低下している miRNA にその miRNA の precursor を過剰発現させると増殖が抑制されたことから、治療へも応用できるのではないかと考えた。

最終的にはこれらの得られた結果が種々の消化器腫瘍に当てはまるか否かを検討し、miRNA を実際の臨床の場へ腫瘍の早期診断マーカーや遺伝子治療のツールとして応用につなげる道を探りたいと考えた。

2. 研究の目的

本計画は胃癌を中心とした消化器癌の各種 miRNA の発現を詳細に検討することで miRNA の機能や標的遺伝子について解析し臨床応用への道を探るのが目的である。

3. 研究の方法

消化器癌の各種 miRNA の発現を培養細胞株 (NUGC-3、DLD-1) を用いて詳細に検討することで miRNA の機能や標的遺伝子について解析する。

(1) 5-FU 耐性株の作成

胃癌由来細胞株 NUGC-3 および大腸癌由来細胞株 DLD-1 について 5-FU 耐性株を作成した。

(2) 5-FU 耐性と各 miRNA 発現量の検討

NUGC-3 と DLD-1 の親株および 5-FU 耐性株から total RNA を TRIzol を使用して抽出した。RT-PCR を用いて、今回 target とした miRNA (miR143,145,34a) の発現量を測定した。

(3) miRNA の標的 mRNA (遺伝子) の検討

Differential hybridization 法で同定した miRNA を中心に、その前駆となる Precursor miRNA を NUGC-3 細胞株に導入し、細胞増殖や形態変化について検討した。発現が抑制されたタンパクを同定するため、transfection 後の細胞株よりタンパクを抽出し、保存した。

(4) 大腸癌細胞株 DLD-1 での検討

4. 研究成果

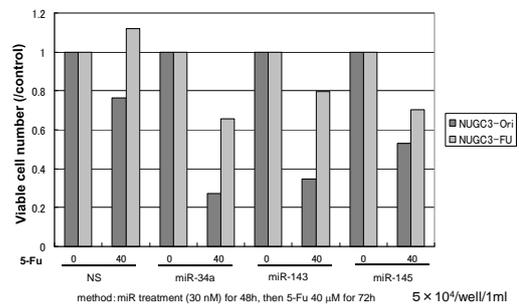
(1) NUGC-3、DLD-1 の 5-FU 耐性株を作成した。

(2) RT-PCR を用いて、今回 target とした miRNA (miR143,145,34a) の発現量を測定した。親株、耐性株ともに正常胃粘膜組織に比して低発現であった。胃癌の臨床検体 43 例中では miR-143 は 30cases 70.0%、miR145 は 27cases 62.8%、miR34a は 20cases 46.5%の低下率であり、胃癌において低下している miRNA であることも確認された。

(3) Precursor miRNA を NUGC-3 細胞株に導入したところ、miR143, 34a では、親株、耐性株ともに濃度依存性に細胞増殖が抑制された。miR145 でも両方とも濃度依存性に細胞増殖が抑制されたが、耐性株のほうがやや効果が低かった。

胃癌細胞株 NUGC-3 の 5-FU 耐性株と親株に miR143, miR145, miR34a を transfection すると 5-FU の感受性が双方ともに上昇した。(Fig.1)

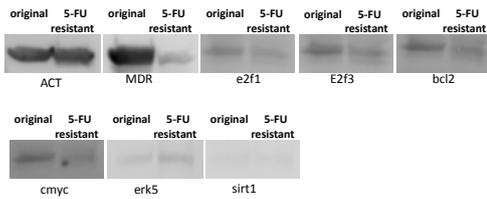
Mir-34a, -143 and -145 sensitize the effect of 5-FU on cell growth inhibition in original or 5-FU-resistant human gastric NUGC-3 cells



(Fig.1)

これらの miRNA は 5-FU 耐性の獲得について関与している可能性が示唆された。NUGC-3 の 5-FU 耐性株と親株のタンパクを抽出し、miR143, miR145, miR34a が関与していると考えられる癌関連遺伝子 (MDR, e2f1, e2f3, bcl2, cmc, erk5, sirt1) について Western blot を行ったところ、耐性株において erk5 の高発現が認められた。NUGC-3 では 5-FU 耐性に erk5 が関与している可能性が示唆された。(Fig.2)

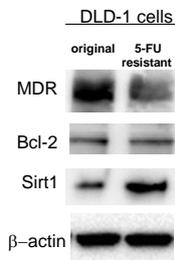
Characterization of 5-FU resistant NUGC-3 cells



(Fig.2)

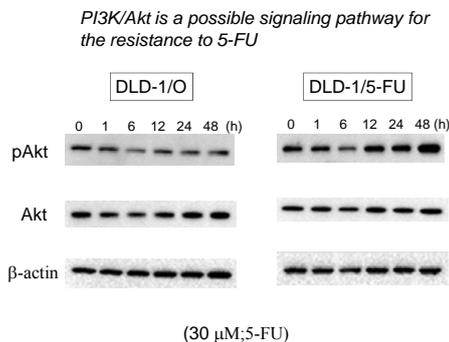
(4) 大腸癌細胞株 DLD-1 で miR34a の target の一つである Sirt1 が高発現していた。(Fig.3)

Characterization of 5-FU resistant DLD-1 cells



(Fig. 3)

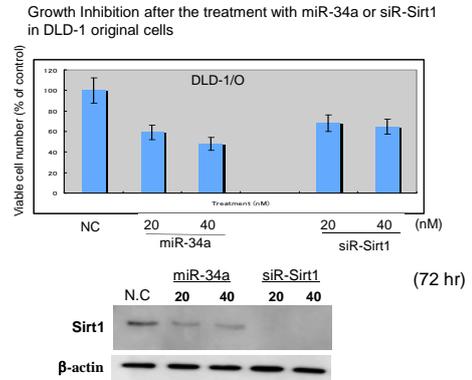
また、DLD-1 で、miR34a は親株耐性株ともに低下しているが、5-FU の投与にて親株の miR34a は上昇したが、耐性株は miR34a の低下が持続した。耐性株で PI3K/Akt の活性化も著明であった。(Fig.4)



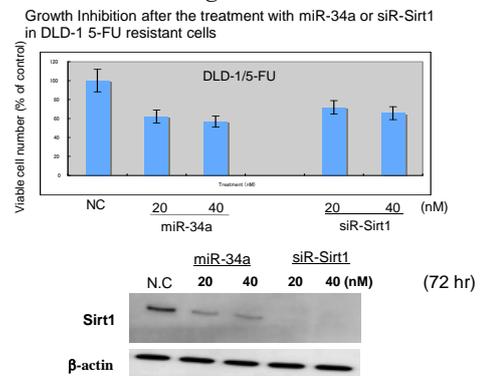
(Fig.4)

miR34a の標的遺伝子の一つである Sirt1 は耐性株で高発現しており、

miR34a, siR-Sirt1 を耐性株に導入すると、どちらも 5-FU の感受性が向上し、Sirt1 が薬剤耐性に関与している可能性が示唆され、miR34a が Sirt1 を標的として 5-FU 耐性を制御している可能性が考えられた。(Fig.5) (Fig.6)

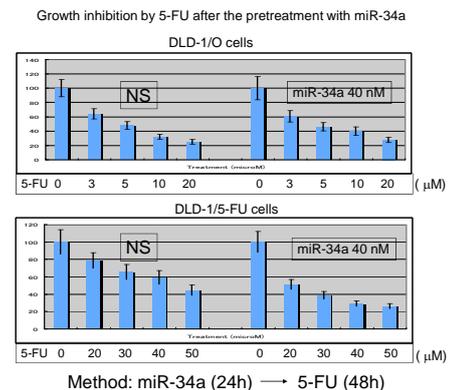


(Fig.5)

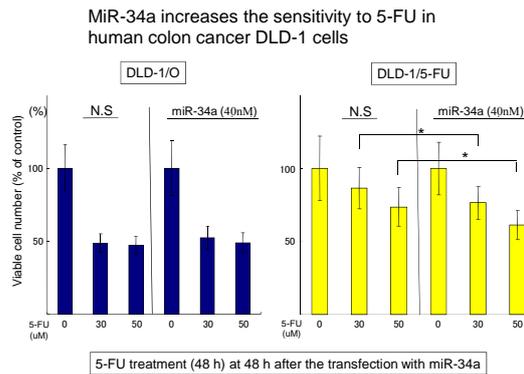


(Fig.6)

また、miR34a を DLD-1 に transfection したのち、5-FU を投与すると 5-FU 耐性株の薬剤耐性が解除された。(Fig.7) (Fig.8)



(Fig.7)



(Fig.8)

消化器癌の薬剤耐性のメカニズムを探り、microRNA によって抗癌剤薬剤耐性の解除を行い、抗癌剤感受性の向上につなげ、臨床応用できる可能性が示唆された。

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 2 件)

① Yukihiro Akao, Shunsuke Noguchi, Akio Iio, Keitaro Kojima, Takeshi Takagi, et al. Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells *Cancer Letters* 査読有 300 (2011) 197-204

② Takeshi Takagi, Akio Iio, Yoshihito Nakagawa, Tomoki Naoe, Nobuhiko Tanigawa, Yukihiro Akao, Decreased Expression of MicroRNA-143 and -145 in Human Gastric Cancers, *Oncology* 査読有 2009;77:12.21

[学会発表] (計 1 件)

① Takeshi Takagi, MicroRNA-34a is associated with 5-FU resistance in colorectal cancer DLD-1 cells, 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 1, 2009, Yokohama

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高城 武嗣 (Takagi Takeshi)

研究者番号 : 80531897