

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680090

研究課題名(和文) 胃癌関連マイクロRNAの探索とエピジェネティック治療への応用

研究課題名(英文) Identification of critical microRNAs in gastric cancer and application for epigenetic therapy.

研究代表者

齋藤 義正 (SAITO, Yoshimasa)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：90360114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胃悪性腫瘍における重要なマイクロRNAとして、胃癌におけるmiR-29cの発現低下および胃MALTリンパ腫におけるmiR-142、-155の発現上昇をそれぞれ特定した。胃癌細胞に対しSAHAやDZNepなどのEZH2阻害薬を投与したところ、miR-1246、-302a、-4448の活性化を認めた。さらにエピジェネティクス変化により制御されているマイクロRNAを特定する独自のChIP on chip法を開発した。胃発がん過程においてマイクロRNAの発現異常は重要な役割を果たしており、エピジェネティック治療ががん抑制マイクロRNAの活性化を介して抗腫瘍効果を発揮することが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the role of microRNAs (miRNAs) during gastric carcinogenesis and the feasibility of epigenetic therapy for gastric neoplasms. miRNA microarray analyses revealed that miR-29c was significantly down-regulated in gastric cancers and that miR-142 and miR-155 were overexpressed in gastric MALT lymphomas. miR-1246, miR-302a and miR-4448 were up-regulated by treatment of gastric cancer cells with EZH2 inhibitors such as SAHA and DZNep. In addition, we have developed a novel miRNA promoter microarray for chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip assay. Using this custom-made miRNA promoter microarray, we have successfully performed ChIP-on-chip assay to identify miRNAs regulated by histone modification. These results indicate that misexpression of miRNAs plays critical roles during gastric carcinogenesis and that epigenetic therapy with chromatin-modifying drugs exert multiple anti-cancer effects through activation of tumor-suppressor miRNAs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：エピジェネティクス エピジェネティック治療 マイクロRNA 胃癌

1. 研究開始当初の背景

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。

研究代表者らはマイクロ RNA の発現が DNA メチル化やヒストン修飾などの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 (Saito Y *et al.* Cancer Cell 2006)。本報告によりエピジェネティクス変化がマイクロ RNA の重要な発現制御機構であることがコンセンサスとなっている。

現在、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行われている。DNA メチル化阻害薬は骨髄異形成症候群の治療薬として承認され、大きな効果をあげている。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は皮膚 T 細胞リンパ腫の治療薬として承認されている。しかし、胃がんをはじめとする固形がんに対するエピジェネティック治療の効果については明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、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 を探索し、マイクロ RNA のエピジェネティック制御に基づく胃がんの新たな治療法の開発を目指した。

以下の 3 点を具体的な到達目標とした。

(1) 早期胃がんや転移・浸潤を認める悪性度の高い胃がんなどで発現異常を示すマイクロ RNA を同定し、その標的遺伝子を解析し、それらのマイクロ RNA が胃がんの予後・再発を予測する新規分子マーカーとなるかどうかを明らかにする。

(2) 胃がんの発生・進展に重要な役割を果たすマイクロ RNA のがん部、非がん部におけるプロモーター領域のエピジェネティクス変化を解析し、発現制御機構を解明する。また、これらのエピジェネティクス変化が胃がんの新規分子マーカーや治療の標的となるか検討する。

(3) 本研究を臨床応用に展開するため、胃がん細胞を 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で処理し、マイクロ RNA のエピジェネティクス制御による抗腫瘍効果を解析し、エピジェネティック治療が胃がんの新たな治療戦略となるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 胃発がん過程において重要なマイクロ RNA の同定・機能解析

十分なインフォームド・コンセントのもとに採取された胃がんの臨床検体から DNA および RNA を抽出し、マイクロアレイおよび定量

的 RT-PCR 法によって胃がん組織および非がん胃粘膜におけるマイクロ RNA の発現プロファイルを網羅的に解析した。転移・浸潤を認める悪性度の高い胃がんなどで発現異常を示すマイクロ RNA、すなわち胃がんの発生・進展に重要な役割を果たすマイクロ RNA を同定した。さらに、これらのマイクロ RNA の機能を解析するため、標的遺伝子について検討を行った。

(2) エピジェネティクス変化によって発現制御されている胃がん関連マイクロ RNA の同定

エピジェネティクス変化によって制御されている胃がん関連マイクロ RNA を探索するために、胃がん細胞におけるプロモーター領域の DNA メチル化やヒストン修飾の状態をパイロシークエンス法やクロマチン免疫沈降法によって解析した。胃がん関連マイクロ RNA のエピジェネティクス変化による発現調節機構について検討した。

(3) 胃がん細胞株を用いたエピジェネティック治療の効果検討

エピジェネティック治療がマイクロ RNA を介した胃がんの新たな治療戦略となるか検討した。胃がん細胞株 AGS, MKN45, TMK1 を DNA メチル化阻害薬

(5-aza-2'-deoxycytidine: 5-Aza-CdR)

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

(suberoylanilide hydroxamic acid: SAHA)

ヒストンメチル化酵素阻害薬

(3-Deazaneplanocin A: DZNep) によって処理し、その発現変化をマイクロアレイによって網羅的に解析した。エピジェネティック治療によるこれらのマイクロ RNA の発現変化を解析し、がん抑制効果が期待できるか検討した。エピジェネティック治療によって発現が有意に変化するマイクロ RNA の中で、胃がんの発生・進展において重要なものを選び、最終的に胃がんの新規治療標的となるマイクロ RNA を決定した。エピジェネティック治療によるこれらのマイクロ RNA ならびに標的遺伝子の発現変化を解析し、胃がん治療の新たなアプローチとなるか検討した。以上から、マイクロ RNA を標的としたエピジェネティック治療が胃がんの全く新しい分子標的治療法となるか検討した。

4. 研究成果

(1) 胃がんの進展過程における *miR-29c* の発現低下

胃がんの発生・進展に重要な役割を果たすマイクロ RNA を同定するため、胃がん組織および非がん胃粘膜におけるマイクロ RNA の発現変化を網羅的に解析した。マイクロアレイによる解析の結果、がん抑制マイクロ RNA の候補である *miR-29c* の発現が前がん病変の胃腺腫から早期胃がんへと進行する過程で低下し、進行胃がんでは早期胃がんよりもさらに *miR-29c* 発現が低下することを確認した (図 1)。さらに *miR-29c* の標的遺伝子の 1 つである *Mcl-1* の発現が進行胃がんにおいて

上昇しており、*miR-29c*の発現低下が *Mcl-1* を活性化して胃発がん重要な役割を果たしていることが考えられた (Saito Y *et al.* Int. J Cancer 2013)。

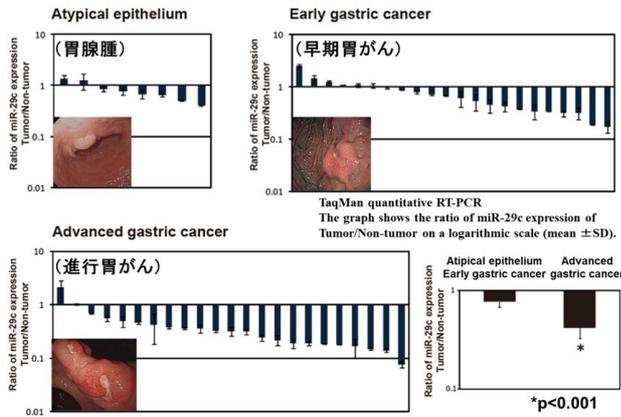


図1 *miR-29c*発現の低下と胃がんの進展との相関

*miR-29c*発現が前がん病変の胃腺腫から早期胃がんへと進行する過程で低下し、進行胃がんでは早期胃がんよりも顕著に *miR-29c*発現が低下することを確認した。

(2)胃 MALT リンパ腫におけるマイクロ RNA 発現異常

胃がん同様、胃の悪性腫瘍として注目されている胃 MALT リンパ腫では、その発症・増殖に *H. pylori* が深く関与していることが明らかになっている。約 70% の症例で *H. pylori* 除菌治療により胃 MALT リンパ腫の寛解を認めるが、病変部において *API2-MALT1* キメラ遺伝子が存在すると、*H. pylori* 除菌治療による効果が低いことが報告されている。胃 MALT リンパ腫に関しても同様にマイクロ RNA 発現プロファイルを解析したところ、*API2-MALT1* キメラ遺伝子を伴い *H. pylori* 除菌治療に抵抗性の胃 MALT リンパ腫において *miR-142* および *miR-155* の発現が著明に上昇していた(図2)。

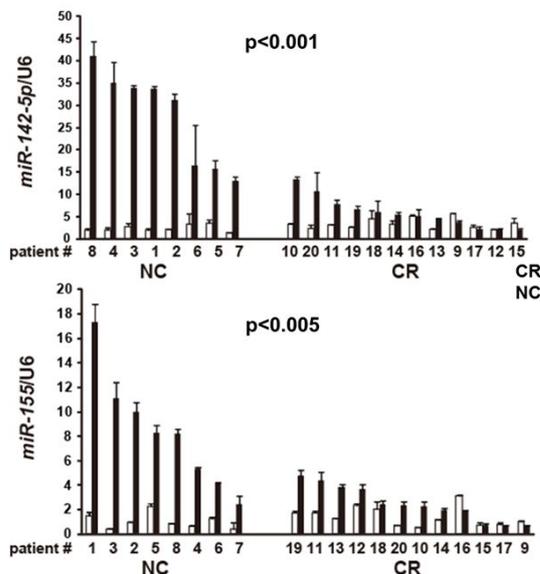


図2 胃 MALT リンパ腫における *miR-142-5p* および *miR-155* の発現変化と除菌治療の反応 *H. pylori* 除菌治療に対して完全寛解 (complete remission: CR) を示したグループに比べ、除菌治療抵抗性 (no change: NC) であったグループにおいては *miR-142* および *miR-155* の発現が有意に上昇していた。

さらに、*miR-142* および *miR-155* の過剰発現が癌抑制遺伝子である *TP53INP1* の発現抑制を介して *API2-MALT1* 陽性胃 MALT リンパ腫発生の一因となっていることが示唆された (Saito Y *et al.* PLoS One 2012)。

(3)ChIP on chip によるエピジェネティクス変化により制御されているマイクロ RNA の同定

エピジェネティクス変化により制御されているマイクロ RNA を同定するためにマイクロ RNA のプロモーター領域に特化したマイクロ RNA アレイを独自に開発した。クロマチン免疫沈降 (ChIP) と chip 解析を組み合わせた ChIP on chip 解析にて、アセチル化ヒストン H3 およびメチル化ヒストン H3 リジン 4 (K4) の有意なシグナル上昇を認めた 22 のマイクロ RNA を同定した (図3、4)。

今回の解析により同定されたエピジェネティクス変化により制御されているマイクロ RNA の候補の中で、転移性がんや乳がんにて発現低下し、がん抑制マイクロ RNA として機能することが報告されている *miR-9* に特に注目した。胃がん臨床検体を用いた検討においては、*miR-9* 発現が非がん胃粘膜に比べ胃がん組織で有意に低下していた。さらに胃がん細胞株を 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することにより *miR-9* の著明な発現上昇を認めており、*miR-9* が胃がんに対するエピジェネティック治療の新たな治療標的となる可能性が考えられた (Saito Y *et al.* Biochem Biophys Res Commun 2012)。

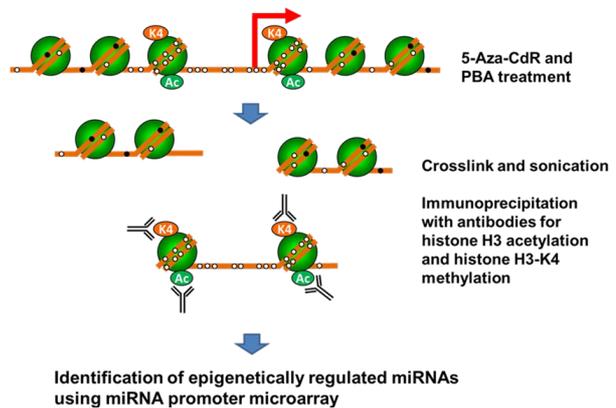


図3 マイクロ RNA プロモーターアレイを用いた ChIP on chip 解析

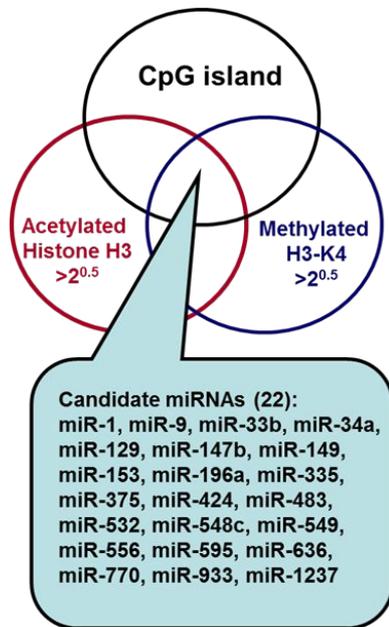


図4 ChIP on chip 解析によって同定されたマイクロ RNA の候補

ChIP on chip 解析にて、アセチル化ヒストン H3 およびメチル化ヒストン H3 リジン 4 (K4) の有意なシグナル上昇を認め、かつ CpG アイランドを有している 22 のマイクロ RNA を同定した。

(4) EZH2 阻害薬によるがん抑制マイクロ RNA の活性化

近年、がん細胞においてヒストン H3 の 27 番目のリジン残基が高頻度にメチル化されており、クロマチン構造の変化を介してがん抑制遺伝子が不活性化されていることが明らかとなった。EZH2 はヒストン H3 のリジン 27 (K27) を修飾するメチル化酵素であり、多くのがん細胞でその発現が上昇していることが報告されている。DZNep は EZH2 を阻害することで抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなり、エピジェネティック治療薬の候補として注目されている。胃がん細胞株 AGS を用い、EZH2 阻害薬の投与によるマイクロ RNA の発現プロファイルと抗腫瘍効果について検討した。

DZNep ならびにヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である SAHA を AGS 細胞に添加したところ、EZH2 の発現が低下し、細胞増殖能が抑制されることが示された。さらにマイクロ RNA の発現変化を網羅的に解析した結果、*miR-1246* が SAHA および DZNep の両薬剤により共通して活性化されることが明らかになった。また、*miR-4448* が DZNep の投与により、*miR-302a* が SAHA の投与によりそれぞれ活性化することが示された。EZH2 阻害薬の投与により、これらのマイクロ RNA の標的遺伝子である DYRK1A、CDK2、BMI-1、Girdin の発現が抑制され、アポトーシスの活性化、細胞周期停止、細胞遊走能の低下などが認められた

(図5)。以上から、胃がん細胞に EZH2 阻害薬を投与すると、複数のがん抑制マイクロ RNA を活性化することで抗腫瘍効果を発揮することが示された (Hibino S, Saito Y *et al.* *Oncogenesis* 2014)。

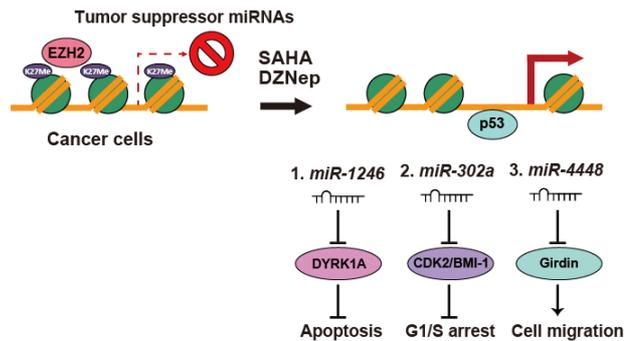


図5 胃がん細胞における EZH2 阻害薬によるがん抑制マイクロ RNA の活性化

EZH2 阻害薬の投与により、がん抑制マイクロ RNA が活性化し、標的遺伝子の発現抑制を介してアポトーシスの活性化、細胞周期停止、細胞遊走能の低下などが認められた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Hibino S, **Saito Y**, Muramatsu T, Otani A, Kasai Y, Kimura M, Saito H. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. *Oncogenesis*. 3: e104, 2014. 査読有.
DOI: 10.1038/oncsis.2014.17.

2. **Saito Y**, Saito H, Liang G, Friedman JM. Epigenetic Alterations and MicroRNA Misexpression in Cancer and Autoimmune Diseases: a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013. 査読有.
DOI: 10.1007/s12016-013-8401-z.

3. **Saito Y**, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNA in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 44(1): 31-42, 2014. 査読有.
DOI: 10.1111/hepr.12147.

4. Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Watanabe M, Hossain S, Arai E, **Saito Y**, Sekine S, Akaike T, Kanai Y, Mukaisho KI, Auwerx J, Hibi T. Bile acids increase levels of microRNAs 221 and 222, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 145(6): 1300-11, 2013. 査読有.
DOI: 10.1053/j.gastro.2013.08.008.

5. **Saito Y**, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Tsugawa H, Hibino S, Kanai Y, Saito H, Hibi T. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. **Int J Cancer**. 132 (8): 1751-60, 2013. 査読有.
DOI: 10.1002/ijc.27862.

6. Sato A, **Saito Y**, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Saito H. Suppressive Effect of the Histone Deacetylase Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), on Hepatitis C Virus Replication via Epigenetic Changes in Host Cells. **J Cell Biochem**. 114 (9): 1987-96, 2013. 査読有.
DOI: 10.1002/jcb.24541.

7. **Saito Y**, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Mukai M, Saito H, Hibi T. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to *Helicobacter pylori* eradication. **PLoS One**. 7(11): e47396, 2012. 査読有.
DOI:10.1371/annotation/53d1898f-d0ae-4e5c-a585-c084a5c881bf.

8. **Saito Y**, Suzuki H, Taya T, Nishizawa M, Tsugawa H, Matsuzaki J, Hirata K, Saito H, Hibi T. Development of a novel microRNA promoter microarray for ChIP-on-chip assay to identify epigenetically regulated microRNAs. **Biochem Biophys Res Commun**. 426(1): 33-7, 2012. 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.012.

9. **Saito Y**, Saito H. MicroRNAs in cancers and neurodegenerative disorders. **Front Genet**. 3: 194, 2012. 査読有.
DOI: 10.3389/fgene.2012.00194.
eCollection 2012.

10. **Saito Y**, Saito H. Role of CTCF in the regulation of microRNA expression. **Front Genet**. 3: 186, 2012. 査読有.
DOI: 10.3389/fgene.2012.00186.
eCollection 2012.

〔学会発表〕(計5件)

1. 日比野沙奈, **齋藤義正**, 村松俊英, 大谷亜希, 笠井雄祐, 植木里美, 山田翔士, 木村真規, 齋藤英胤. ヒストン修飾制御薬によるマイクロRNAを介した抗がん作用の検討. 第72回日本癌学会学術総会, 2013/10, 横浜.

2. Hibino S, **Saito Y**, Muramatsu T, Otani A, Kasai Y, Kimura M, Saito H. MiR-1246 and miR-302 are novel targets of epigenetic therapy with DZNep and SAHA in human cancer cells. Digestive Disease Week 2013, 2013/05, Orlando, FL.

3. Matsuura M, **Saito Y**, Doke Y, Yoshida T, Genka A, Muramatsu T, Kimura M, Arai E, Kanai Y, Saito H. The tumor suppressor microRNA-122 is suppressed in liver cancer cells and can be reactivated by DNA methylation inhibitors. Digestive Disease Week 2013, 2013/05, Orlando, FL.

4. 日比野沙奈, **齋藤義正**, 村松俊英, 大谷亜希, 笠井雄祐, 植木里美, 山田翔士, 木村真規, 齋藤英胤. がん細胞に対するDZNepおよびSAHAの投与によるマイクロRNA発現変化の網羅的検討. 日本薬学会 第133年会, 2013/03, 横浜.

5. **齋藤義正**, 村松俊英, 木村真規, 齋藤英胤. がんに対するエピジェネティック治療によるマイクロRNA発現変化の網羅的解析. 日本分子腫瘍マーカー研究会, 2012/09, 札幌.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

文部科学省科学研究費新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」

(<http://ganshien.umin.jp/public/research/main/saito/index.html>)にて当該研究の紹介を行っている。

6．研究組織

(1)研究代表者

齋藤 義正 (SAITO Yoshimasa)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：90360114