

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430147

研究課題名(和文) KSRPを標的としたmiRNA制御薬としてのクルクミンアナログの作用機序

研究課題名(英文) Pharmacological potential of curcumin analog targeting KSRP, a regulator of miRNA

研究代表者

柴田 浩行 (Shibata, Hiroyuki)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50260071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンアナログGO-Y030、及びGO-Y078が各種mRNAやmiRNAに与える影響を調べた。大腸癌細胞株では41,058種のmRNAのうち、GO-Y030で発現が増減するものにBCL-2, c-Myc, TP53などが含まれる。また、2,669種のmiRNAのうち、GO-Y030で28種、GO-Y078で11種の発現増強を認めた。GO-Y078によって血管内皮細胞株で発現が変動するmRNAは200%以上の発現増強が470種、50%以下の発現低下が243種あった。GO-Y030でhas-miR-19b-3pの発現が亢進した。また、GO-Y078によって5種類のmiRNAの発現が低下した。

研究成果の概要(英文)：Effects on mRNA and miRNA by curcumin analogs, GO-Y030 and GO-Y078, were examined. BCL-2, c-Myc and p53 were included in the affected transcripts by GO-Y030 among 41,058 transcripts in colorectal cancer cell line. Among 2,669 species of miRNAs in colorectal cancer cell line, 28 species and 11 species of miRNAs were up-regulated by GO-Y030 and GO-Y078, respectively. In endothelial cells, 470 species of mRNAs were up-regulated and 243 species were down-regulated. As for miRNA, has-miR-19b-3p was up-regulated in endothelial cells by GO-Y030, and 5 species of miRNAs were down-regulated by GO-Y078. KSRP contribution to the regulation of mRNA or miRNA expression was not elucidated at this present.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：クルクミン mRNA miRNA KSRP

1. 研究開始当初の背景

クルクミンは食用されるフィトケミカルである。その薬理作用は多岐にわたり、炎症作用、抗アルツハイマー作用などに加えて抗腫瘍作用が含まれる。抗腫瘍作用は発がんに関与する分子、オンコジーンに代表されるがん関連分子を制御する。例えば大腸がんなどの消化器がんに関与する Wnt シグナルの中心的なオンコジーンである β -Catenin を分解し、大腸がん、胃がんなどの発がん抑制やがんの進行を抑制する。また、炎症やがん化に関与する Nuclear Factor-kappa B 転写因子を抑える。さらにアポトーシス誘導に関与する Caspase 3 などを誘導し、アポトーシス耐性となったがん細胞に再度細胞死を誘導する。このようにクルクミンにはマルチターゲットな制がん作用が知られている。クルクミンアナログの多標的制御性は何によって発揮されるのか？そのメカニズムを依然として謎に包まれている。しかし、それを明らかにすれば、この伝説的な化合物の真価が科学的にも実証され、単なる伝承薬から現代の分子標的治療薬へと変貌できると考えている。我々は近年、クルクミンアナログが miRNA 制御タンパク質 KSRP とインターアクションすることを見出した。KSRP は miRNA プロセッシングにおいて中心的な役割を演じていることが示されており、このことからクルクミンアナログ KSRP-mRNA/miRNA の制御機構が存在することが示唆される。miRNA は様々な mRNA の転写調節に関与し、一つの miRNA が複数のクライアント mRNA を持つことが知られており、クルクミンやそのアナログのマルチターゲット性の機序をここに求めることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

クルクミンアナログが KSRP と直接結合し、様々な oncogenic mRNA 抑制や tumor suppressive miRNA 発現増強に働くという仮説を証明する。これらが KSRP を標的とした miRNA 制御性抗腫瘍薬として開発される基礎的な検証を行う。

3. 研究の方法

mRNA アレイや miRNA アレイを用いて大腸癌細胞株 HCT116 において発現が変化するトランスクリプトをスクリーニングした。また、同様に抗腫瘍活性の強いクルクミンアナログ GO-Y030 や GO-Y078 を HCT116 に作用させた場合の mRNA や miRNA の発現パターンの変化を観察した。

さらにクルクミンアナログには血管新生阻害活性も認められ、血管内皮細胞 HUVEC を用いて mRNA アレイや miRNA アレイによる発現プロファイルと GO-Y030 や GO-Y078 による発現プロファイルの変化を調べた。

アレイによって得られた、クルクミンアナログによって発現が変化する mRNA や miRNA

種についてリアルタイム RT-PCR を用いて発現量の変化を確認する。さらに得られたトランスクリプトについてタンパク質レベルの発現量を ELISA 法やウェスタンブロット法で確認する。

さらに、それぞれの細胞において変化するタンパク質を同定するために 2 Dimension の電気泳動を行う。これによって得られたタンパク質が miRNA > mRNA > タンパク質のルートに則るものであるか検証する。

セルライゼートから KSRP の免疫沈降法で結合する miRNA がアレイなどで発現変動の認められた miRNA 種であるか、RT-PCR によって確認する。

4. 研究成果

41,058 個の mRNA のうち、GO-Y030 で増減する遺伝子のプロファイルを同定した。それらには BCL-2, c-Myc, TP53 などが含まれる。また、HCT116 に GO-Y030 および GO-Y078 を作用させた場合の miRNA の網羅的遺伝子発現解析では 2,669 個の miRNA トランスクリプトのうち、GO-Y030 では 28 種の miRNA、GO-Y078 では 11 種の miRNA の有意な発現増強を認めた。特にコントロールの 2.5 倍以上に発現量が亢進するものに GO-Y030 の場合 (表-1)、has-miR-1290 (x3.6), has-miR-1469 (x2.5), has-miR-149-3p (x2.5), has-miR-4279 (x2.8)などの miRNA トランスクリプトが見いだされた。GO-Y078 では has-miR-1260a (x2.7), has-miR-1280 (x3.5), has-miR-720 (x2.5)などが見いだされた。

表-1. GO-Y030 で変化する miRNA

GO-Y030	Fold change	Ref.
has-miR-1290	x 3.6	高発現の NSCLC で予後不良。 神経前駆細胞-過剰発現で増殖抑制。 膵癌で上昇。 頭頸部 SCC でも上昇。 ER 高発現、Ki67 低レベルの乳癌で発現低い。
has-miR-1469	x 2.5	STAT5a を標的とし、肺癌に apoptosis を誘導。

has-miR-149-3p	x 2.5	
has-miR-4279	x 2.8	
has-miR-483-3p	x 1.8	-Catenin の 転写を負に制 御。 膵癌で高発現。

GO-Y078 では has-miR-1260a (x2.7), has-miR-1280 (x3.5), has-miR-720 (x2.5) などが見いだされた (表-2)。

表-2. GO-Y078 で変化する miRNA

GO-Y078	Fold Change	Ref.
has-miR-1260a	x 2.7	
has-miR-1280	x 3.5	ROCK1 を標的 とし、浸潤抑 制。
has-miR-720	x 2.5	Twist を負に制 御する。

このうち、has-miR-720 の発現増強は Twist という Oncogenic な転写因子を負に制御する Tumor Suppressive-miRNA である。Twist は STAT3, RAS, WNT などのシグナル伝達系で刺激されるオンコジーンである。N-Myc とともに神経芽腫などの発症に関わる。また、転移に関して epithelial-mesenchymal transition の中心的なプロモーターとして作用する。また、GO-Y030 により has-miR-483-3p (x1.8) の発現増強が見られるが、これは大腸がん細胞において -Catenin の転写を負に制御することが知られている。クルクミンアナログではコントロールと比較して発現低下をきたすものは無かった。その他のアノニマスな miRNA についても細胞生物学的に抗腫瘍活性を検証中である。

一方、GO-Y078 によって HUVEC で発現が変動する mRNA は 200%以上に発現が増強するものが 470 種あり、50%以下に発現が低下するものは 243 種ある。最大は 12 万倍に発現が増強した PCSK7 である。これは VEGF-D のプロセッシングに関与し VEGF-R2 との結合に必要である。その他、発現が増強するものには TIMM10B (x102,258.6), ACTR1B (x90,197.4), MOCS2 (x29.3), MAPKAPK5 (x16.0), NAA35 (x13.7), FAM208B (12.8), SRRM1 (x11.7) などがある。発現が低下するものには ACY1 (x0.00001), FN1 (x0.03), GNPTG (x0.03), SLC25A39 (x0.11), ZNF630 (x0.11), RPS2P45 (x0.13) などがある。HUVEC の miRNA トランスクリプトームについては GO-Y030 の場合、発現が有意に亢進するものは has-miR-19b-3p (x2.4) のみであった。GO-Y078 の場合は 1.5 倍の発現亢進であった。has-miR-19b-3p は線

維芽細胞のオートファジーを抑制し、has-miR-17-92 領域は VEGF によって活性化され、HUVEC の sprouting に関与する。発現低下する miRNA トランスクリプトームについては GO-Y078 の場合に顕著で、has-miRPlus-A1087 (x0.46), has-miRPlus-A1086 (x0.48), has-miR373-5p (x0.42), has-miR204-3p (x0.47), has-miR943 (x0.34) などが見いだされた (表-3)。

表-3. 血管内皮細胞で変化する miRNA

	Fold Change	Ref.
GO-Y030		
has-miR-19b-3p	x 2.4	線維芽細胞の オートファジ ー抑制
GO-Y078		
has-miR-19b-3p	x 1.5	
has-miRPlus-A1087	x 0.46	
has-miRPlus-A1086	x 0.48	
has-miR373-5p	x 0.42	
has-miR204-3p	x 0.47	has-miR204-3p の肝細胞癌内 皮細胞におけ る過剰発現で アポトーシス を誘導
has-miR943	x 0.34	メトフォルミン による肝細胞 癌の増殖抑制 において has-miR943 の 発現が抑制さ れる

しかし、has-miR204-3p の肝細胞癌内皮細胞における過剰発現でアポトーシスを誘導し、FN1 の発現を抑制することが示されている。GO-Y078 で FN1 の発現が低下することから、has-miR204-3p はネガティブフィードバックループの可能性もある。同じく、メトフォルミンによる肝細胞癌の増殖抑制において has-miR943 の発現が抑制されることが示されている。このとき angiogenin の発現も低下している。

しかし、クルクミンアナログによる mRNA/miRNA 制御における KSRP の直接的な関与の証明には現時点では成功していない。今後はプロテオーム解析なども加えて、より実態を解明してゆく予定である。

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 1 件)

柴田浩行、クルクミン誘導体による胃がん予防研究、Functional Food: 機能性食品の基礎から臨床へ、9

巻、2015、18 - 22

〔学会発表〕(計 1 件)

島津和弘、福田耕二、吉田泰一、井上正大、柴田浩行. 血管新生阻害剤スニチニブやソラフェニブ耐性の打破を目指した新規化合物の開発. 第20回日本がん分子標的治療学会. 2016年5月31日～6月1日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~medonco/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田浩行 (SHIBATA, Hiroyuki)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50260071

(2) 研究分担者

岩淵好治 (IWABUCHI, Yoshiharu)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20211766