

平成21年4月1日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790920
研究課題名 (和文)
食道癌における発癌／抑制に関与する microRNA の同定とその機能解析
研究課題名 (英文)
Identification and functional analysis of microRNAs which involved in the oncogenesis or tumor suppression in esophagus cancer.
研究代表者
伊藤 佐智夫 (ITO SACHIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30335624

研究成果の概要：

本研究では食道癌における microRNA (miRNA) の発現パターンを解析し、発癌または癌抑制に関与する miRNA の同定を試み、死亡率の低減を目指すための予防や早期発見法への応用に貢献できることを目的とした。食道癌臨床検体と食道癌細胞株についてマイクロアレイを用いて 787 種の miRNA のスクリーニングを行った。その結果、腫瘍特異的または腫瘍分化度特異的に発現レベルの異なるいくつかの miRNA を同定することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,600,000	0	2,600,000
20年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：食道癌、microRNA、癌遺伝子、癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 背景：microRNA (miRNA) は特定のメッセージンジャーRNA (mRNA) の3' 非翻訳領域 (UTR) の相補的に結合し、mRNA の翻訳制御を

担っている。最近の研究においては、miRNA の発現変動には発癌やアポトーシスと密接な関連があることも報告されており、疾患との関係も注目されている。

(2) 動機: 食道癌は予後が思わしくない疾患であるが、早期治癒率は良く、5年生存率も〜80%と上がることから、予防や早期発見が有効である。原因遺伝子が同定されていない食道癌に関しては、発癌においてmiRNAが癌遺伝子のように作用している可能性が大きいのではないかと考え、本研究では食道癌におけるmiRNAの発現パターンを解析し、死亡率の低減を目指すための予防や早期発見法への応用、さらには食道癌の発癌または癌抑制に関与するmiRNAを同定した上で機能解析を行い遺伝子治療への応用まで視野を広げたいと考えた。

2. 研究の目的

機能性RNA、特にmiRNA生合成機構の研究は、ここ数年で急速に進行し、全貌が明らかにされようとしている。しかしこれまでに多くのmiRNAが同定されてきたが、それらの標的遺伝子や癌をはじめ様々な疾患に関する作用機構などまだ未解明な点が多く存在するのも現状である。腫瘍組織と正常組織との発現比較において、いくつかのmiRNAの高発現や発現抑制が見られることから、腫瘍組織と正常組織との発現比較において、いくつかのmiRNAの高発現や発現抑制が見られることから、癌とmiRNAの関係に着目した。本研究では食道癌における発癌または癌抑制に関与するmiRNAを特定することを目標とし、これまでに明らかにされていない様々な生命活動の解明に助力しようとした。

3. 研究の方法

(1) 787種類のmiRNAの発現レベルの比較を食道癌患者の腫瘍細胞(T)と正常細胞(N)から抽出したRNAを複数ペア用いてそれぞれ行う。miRNAアレイを用いることにより一度に多くのmiRNAのスクリーニングを行うことが可能である。1ペアではmiRNAアレイの結果に不安が残るので、可能な限り多数のサンプルで行うことで再現性・信頼性がより確かなものにする事ができる。尚、今回は予算の関係上3検体比較を行った。

(2) 9細胞株(高中低分化型各3種)比較を行った。

(3) (1)のmiRNAアレイで癌細胞と正常細胞で発現レベルの違いが見られたmiRNAについては次の場合を想定して、解析を進めた。

① 癌細胞での発現が減少しているmiRNA: 癌化の抑制に関与すると考えられるので、これまでに我々が蓄積したLOHのデータを参照して、LOH領域近傍に位置しているmiRNAを優先的に選択した。〈特に癌抑制遺伝子が存在する染色体領域ではないものから〉。

② 腫瘍組織での発現が増加しているmiRNA: 癌化・発癌に関与している可能性が高いと考えられるが、癌化による染色体異常も疑われるのでCGH等のデータと比較して慎重に選択した。

(4) これら発現レベルの差がみられたmiRNAについてはmiRNAアレイのフォローアップのため、TaqMan MicroRNA Assaysを使用し当研究室が保持している食道癌サンプルで定量解析を行った。これらのキットを使用する理由は貴重な臨床サン

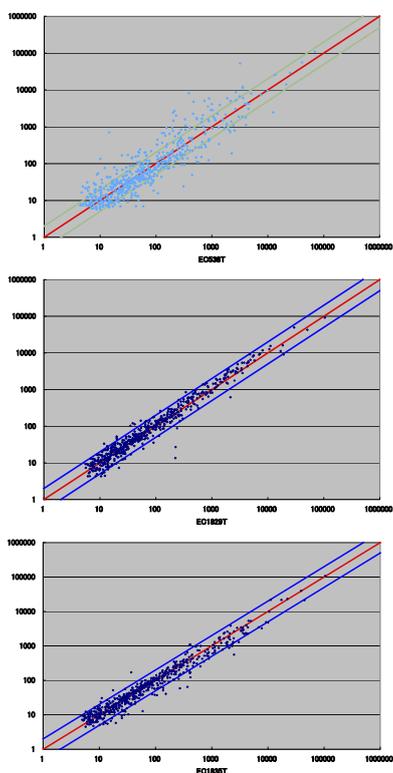
プル RNA が極めて少量で検出が可能であるためである。これら検出および定量法の結果を統括し、多くの食道癌で共通の発現変化を伴う miRNA を同定していく。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析の結果.

臨床 3 検体の場合。

EC538 (T) と EC539 (N)、EC1829 (T) と EC1830 (N)、EC1835 (T) と EC1836 (N) で比較を行った。



臨床 3 検体の比較では共通に増減している miRNA は少ないものであった。

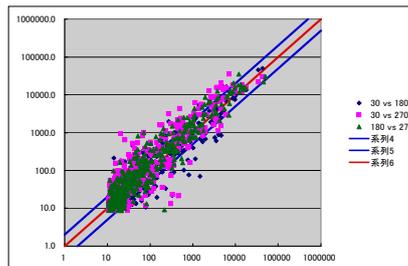
T で増加: miR92a-2*, miR155*, miR193b*, miR508-3p

T で減少: miR142-3p, miR150, miR380, miR140-3p, miR886-3p

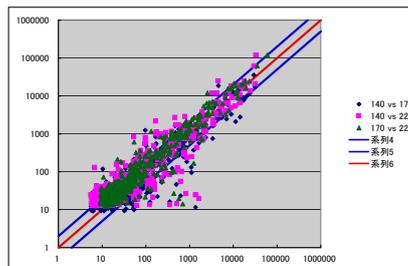
(2) 細胞株の場合。

① 同一分化型間での比較。

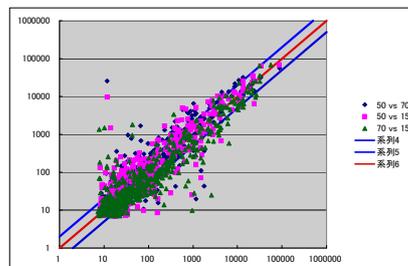
高分化型: KYSE30, 180, 270



中分化型: KYSE140, 170, 220



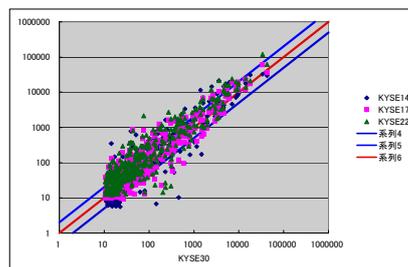
低分化型: KYSE50, 70, 150



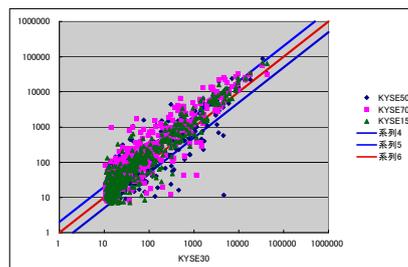
同一分化型とされる細胞株の比較でも miRNA の発現パターンに違いがあることが分かった。

③ 異分化型間での比較。

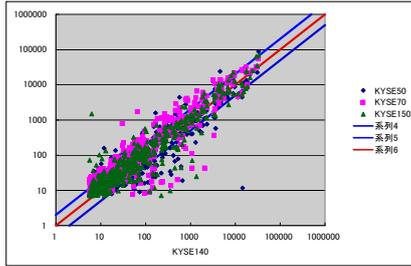
高分化型 (KYSE30) と中分化型 3 細胞



高分化型 (KYSE30) と低分化型 3 細胞



中分化型(KYSE140)と低分化型3細胞



高分化型3種に対して中分化型3種あるいは低分化型3種を比較した場合には、次のようなmiRNAの発現変化が分化型共通に確認された。

中分化型で増加：let7b, miR29a, miR196a, miR9, miR9*, miR148b, miR335, miR422a, 29b-2*

低分化型で増加：let7b, miR23a, miR29a, miR96, miR98, let7i, miR23b, miR339-5p, miR660, miR92-2*, miR520c, miR1225-5p

中分化型3種と低分化型3種の比較では、次のようなmiRNAの発現変化が分化型共通に確認された。

低で増加：let7i, miR23b, , miR9, miR9*, miR361-3p

(3) (1)の臨床3検体において共通に増減しているmiRNAとLOHおよびCGHを対比した結果では優位な相関が見られなかった。このことから染色体異常ではなく、これらの変動しているmiRNAが食道癌発生に関与していると考えられた。

(4) これらの変動miRNAの標的遺伝子をバイオインフォマティクスから検索すると1つのmiRNAについて数千もの標的遺伝子候補があげられた。

これらの候補遺伝子すべてについて機能解析を行うのは非現実的であると考えたので、実際にmiRNAと物理的相互作用をしている標的遺伝子を捕まえる方法を考える必要

がある。

現在、Ago抗体あるいは化学修飾したmiRNAを用いたpull-down法、またmiRNAを細胞に導入し発現変化の見られるタンパク質の質量分析によって候補遺伝子を探索する試みをしている。

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)

[学会発表] (計1件)

1. 発表者名：伊藤 佐智夫

発表タイトル：MicroRNA expression profiling in human esophageal cancer

学会等名：第31回日本分子生物学会

発表年月日：2008年12月12日

発表場所：神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 佐智夫 (ITO SACHIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30335624

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし