

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590419

研究課題名（和文） マイクロRNA-143、145の発癌への関与

研究課題名（英文） Role of miR-143 and -145 in carcinogenesis of colon cancer

研究代表者

赤尾 幸博（AKAO YUKIHIRO）

岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号：00222505

研究成果の概要（和文）：

miR-143、-145、-34a は共に大腸腺腫・癌細胞において低発現であり、がん抑制遺伝子として機能している。がん細胞ではこれらのマイクロRNAの転写に異常があることが明らかになった。これらをごん細胞に導入すると増殖が抑制され、アゴニストとして治療に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We examined the expression levels of miRNAs (miRs) in colorectal tumors (63 cancer specimens and 65 adenoma specimens) and paired non-tumorous tissues. Decreased expression of miR-143 and -145 was frequently observed in the adenomas and cancers tested, compared with miR-34a down-regulation and miR-21 up-regulation. Expression profiles of miR-143 and -145 were not associated with any clinical features. Since the down-regulation of miR-143 and -145 was observed even in the early phase of adenoma formation, the decreased expression of both miRs would appear to contribute mainly to the initiation step of tumorigenesis, not to the progression stage, and not to clinical prognostic factors. For clinical application, we changed the sequences of the passenger strand in the miR-143 duplex and performed chemical modification at the 3'-overhang portion of miR-143, leading to greater activity and stability to nuclease. The cell growth inhibitory effect of the chemically modified synthetic miR-143 *in vitro* was greater than that of endogenous miR-143. The miR-143 showed a significant tumor-suppressive effect on xenografted tumors of DLD-1 human colorectal cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：マイクロRNA、がん

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画の成果としてヒトゲノムの98%にも及ぶジャンクとよばれた非コード領域から多数の non-coding RNA (poly-A を持つ)が転写されていることが確認された。このような転写産物の多くは修飾を受け、18-25 ヌクレオチドの小さな RNA (miRNA) になり、遺伝子 (mRNA) の発現を翻訳レベルで制御していることが明らかになった。miRNA の発現異常と発癌との間に密接な関係が報告されている。一般的に miRNA は 100-200 以上の mRNA (蛋白コード遺伝子) を標的にすることが知られている。癌に観察される染色体異常の領域から転写される miRNA はその発現に異常がみられ、従来の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常の蓄積と相まって、癌化の促進、進展と深く関連すると考えられている (図2)。miRNA が癌の発生、増殖に関係する遺伝子を標的にすればそれら遺伝子の発現を翻訳段階でコントロールすることになる。したがって、miRNA 発現異常はさまざまな生命現象に影響を与え、その脱制御がついには発癌につながるとも考えられる。実際、慢性リンパ性白血病でしばしば異常が認められる 13q14 領域の欠失により miRNA の 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 (Calin et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002)。その後、miR-15a と miR-16 の標的遺伝子がアポトーシスを抑制する Bcl-2 であることが報告され (Cimmino et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005)、13q14 領域の欠失により miRNA の miR-15a と miR-16 の発現の低下が bcl-2 の発現を上げることになり癌化に関与することが強く示唆された (図2)。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著明に抑制されることが報告されている。let-7 の標的遺伝子が RAS であることも確認された (Johnson et al. *Cell*, 2005)。さらに乳癌において miR-125b、miR-145、miR-21、miR-155、その他組織特異的な miRNA 発現プロファイルがあることから様々な癌において特徴的な発現プロファイルをもつことが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では①miR-143,-145 の発癌への関与について大腸癌において低発現をきたしている機構、②標的遺伝子のさらなる同定、細胞死との関連について解明し、③動物モデルにおいて miR-143,-145 の治療効果を検証する。

3. 研究の方法

①細胞モデルを用いた miRNA-143 と 145 の発癌との関連 (赤尾、中川)

miRNA-143、145 の発現レベルは TaqMan probe miRNA assay と Ambion miRNA Detection assay の両方法を用いた Real-time PCR で決定する。

②標的遺伝子の同定

標的遺伝子の同定は分子メカニズムの解明に必須である。

・バイオインフォマティクスにより絞り込んだ標的遺伝子について検証する。(可能性の高いものから miRNA-143、145 を導入した DLD-1 細胞の蛋白抽出液を用いてウェスタンブロット解析により絞り込んでいく。)

・標的遺伝子として ERK5 が確認された。配列からすでに結合部位が推定されている。欠損変異体ベクターを作成し、結合部位を決定する。他の標的遺伝子候補についても同方法で確認する

③細胞死との関連を検証する。

・Jurkat 細胞の Fas を介したアポトーシスにおいて miRNA-143 の発現が上昇することが確認された。アポトーシス細胞をフィコールを用いた重心遠心法により分離し、アポトーシスの段階とその発現との関連を調べる。さらにカスパーゼ、そのインヒビターを用いてそれらの活性化との関連を調べる。

・ヒト大腸癌 DLD-1 を用いた TRAIL を介した細胞死との関連を同様に調べる。

4. 研究成果

① miR-143 -145 -34a は大腸腺腫(症例 63 例)、癌 (69 例) において高頻度で低発現 (*Cancer Gene Ther*, 2010)。

② 3 者はがん抑制マイクロ RNA として機能している (*Cancer Gene Ther*, 2010; *BBRC*, 2008 その他 5 報)。

③ 標的遺伝子として miR-143 は ERK5、miR-145 は Fascin1、miR-34a は Sirt1、E2F3 を同定した (*Oncology*, 2009; *Leuk Res*, 2009; *BBRC*, 2008; *Cancer Lett*, in press)。

④ miR-143、-145 は染色体 5q33 に共局在し、同じ Pri-miRNA で転写される (NCR-143/145)。NCR-143/145 は多くの大腸癌サンプル、細胞株で発現が低下していた (*Mol Cancer*, 2010)。

⑤ miR-143 -145 -34a は坦癌動物モデルにおいて抗腫瘍効果を示した。miR-143 は全身投与で効果を示した (*Cancer Gene Ther*, 2010; *Mol Ther*, in press)。

⑥ ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 の 5-FU 耐性株では miR-34a/Sirt1 カスケードが耐性に

関与していた(*Cancer Lett*,2011)。
以上を成果としてあげることができる。

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 9 件)
(9 件すべて査読有り)

1. Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, Naoe T.

Microvesicle-mediated RNA Molecule Delivery System Using Monocytes/Macrophages. *Mol Ther*. 2010 19:395-9.

2. Akao Y, Noguchi S, Iio A, Kojima K, Takagi T, Naoe T.

Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells. *Cancer Lett*. 2011; 28;300(2):197-204.

3. Itoh T, Takeda S, Akao Y.

MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse Pre-osteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1.

J Biol Chem. 2010 285: 27745-52.

4. Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y.

Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer*. 2010;9,136-146.

5. Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Iio A, Ito T, Kojima K, Nakashima R, Kitade Y, Naoe T.

Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors *Cancer Gene Ther* 2010;17,398-408.

6. Ito T, Nozawa Y, Akao Y

MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse Pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5.

J Biol Chem 2009;284,19272-9.

7. Akao Y, Nakagawa Y, Iio A, Naoe T. Role of microRNA-143 in Fas-mediated apoptosis in human T-cell leukemia Jurkat cells.

Leukemia Res 2009;33:1530-8.

8. Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N, Akao Y.

Decreased expression of microRNAs-143 and -145 in human gastric cancers.

Oncology 2009;77:12-21.

9. Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Itoh M. Effects of miR-34a on Cell Growth and Chemoresistance in Prostate Cancer PC3 Cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:114-9.

[学会発表] (計 14 件)

第 33 回日本分子生物学会年会

⑭ microRNA-208 による BMP-2 誘導マウス前駆骨芽細胞分化調節

伊藤智広、竹田秀、赤尾幸博

⑬ Transcriptional and post-translational regulation of miR-143/145 expression through host gene, NCR143/145 in cancers

飯尾明夫、赤尾幸博

以上 平成 22 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド

第 69 回日本癌学会総会

⑫ Dysregulation of miR-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human

colon cancer DLD-1 cells

Yukihiro Akao (Gifu Univ.)

Shunsuke Noguchi (Gifu Univ.)

Tomoki Naoe (Nagoya Univ.)

⑪マイクロ RNA を用いた比較腫瘍学

野口俊助、丸尾幸嗣、赤尾幸博

⑩家族性大腸腺腫症におけるマイクロ RNA-143、-145、34a の発現

中川義仁、赤尾幸博、平田一郎

以上 平成 22 年 9 月 24-25 日 大阪

第 1 回日本 Cell Death 学会

⑨Fas を介した T 細胞のアポトーシスにおける miR-143 の関与

赤尾幸博、野口俊助、直江知樹

平成 22 年 7 月 31 日 名古屋

第 12 回日本 RNA 学会年会

⑧マイクロ RNA-34 の脱制御と抗癌剤耐性

赤尾幸博、野口俊介、飯尾明夫

平成 22 年 7 月 27 日一橋記念講堂 東京

第 9 回バイオテクノロジー国際会議

⑦細胞を用いた新規な RNA 医薬搬送システムの構築—患者の白血球に目的の RNA 分子を導入し体内に戻す—

岐阜大学大学院連合創薬

赤尾幸博

平成 22 年 7 月 2 日 東京

第 149 回日本獣医学会学術集会

シンポジウム：伴侶動物がん臨床の新たな展開：医療への橋渡しを目指す『比較腫瘍学』の基盤形成

⑥創薬分野からみた比較腫瘍学への期待：microRNA を用いた比較腫瘍学から創薬へマイクロ RNA

赤尾幸博

平成 22 年 3 月 28 日 日本獣医生命科学大学（東京都武蔵野市）

日本化学会第 90 春季年会

イブニングセッション

ゲノムケミストリー

⑤がん抑制マイクロ RNA-143、-145 の発現ネットワーク

赤尾幸博

平成 22 年 3 月 27 日 近畿大学本部キャンパス

第 68 回日本癌学会総会

④ 家族性大腸腺腫症における microRNA-143、-145、-7 の発現

中川義仁、赤尾幸博、平田一郎

③ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 における microRNA-34a の 5-FU 耐性への関与

高城武嗣、赤尾幸博

② 細胞死誘導シグナルにおける microRNA-143、-145 の発現

赤尾幸博、飯尾明夫、中川義仁、直江知樹

①飯尾明生、直江知樹、赤尾幸博

microRNA-143/145 クラスターを介在するノンコーディング RNA の同定

以上 平成 21 年 10 月 1-2 日 パシフィコ横浜

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤尾 幸博 (AKAO YUKIHIRO)
岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授
研究者番号：00222505

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：