

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590398

研究課題名（和文） 胃癌におけるマイクロRNA発現異常の解析

研究課題名（英文） Genome-wide microRNA expression profiling in gastric cancer

研究代表者

守山 正胤（Moriyama Masatsugu）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90239707

研究成果の概要（和文）：

MicroRNAの発現異常が発癌に関わるとの指摘があり、いくつかの臓器癌において癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子様の働きをするmicroRNAが報告されている。我々はこれまで進行胃癌のゲノム異常（ゲノムコピー数異常）をアレイCGH法により解析し、報告してきたが、今回、マイクロアレイを用いてmicroRNAの発現を網羅的に解析して、ゲノムコピー数異常に伴うmicroRNAの発現異常を解析したい。さらに同定した異常発現microRNAの機能を解析して、胃癌発癌に関わるmicroRNAを同定した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated expression profiles of microRNA (miRNA) in gastric carcinomas by use of a miRNA microarray platform covering a total of 470 human miRNAs. By comparing miRNA expression profiles between intestinal-type and diffuse-type gastric carcinomas (ANOVA $P < 0.05$), we could not identify any miRNAs differentially expressed between them, suggesting that, in gastric carcinomas, the miRNA expression profile might not be correlated with histopathologic subtypes. We identified 39 differentially expressed miRNAs in gastric carcinoma, of which 6 were significantly downregulated and the other 33 were upregulated. Among the 6 down-regulated miRNA, we selected 3, miR-375, miR-29c and miR-148a, as gastric cancer-related miRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医学・人体病理

キーワード：マイクロアレイ、網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

MicroRNA（マイクロRNA）は蛋白質をコードしていない約22塩基の小さなRNAで、相補的な配列を持つmRNAに結合してその翻訳

を抑制したり、あるいはmRNAの分解を促進することが知られている。重要なことは、2005年に癌遺伝子Rasの機能がmicroRNAによって制御されていることが発見され（Cell,

120, 635, 2005)、かつ実際にヒトのリンパ腫ならびに肺癌においてマイクロ RNA の過剰発現が見いだされたことである (Cancer Res, 64, 3087, 2004; Cancer Res, 65, 9628, 2005)。このことは、マイクロ RNA が癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として機能することを示唆している。我々は最近、腎細胞癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイルをマイクロアレイを用いて網羅的に解析して、腎細胞癌では miR-200 family が発現低下しておりそれが腎癌における E-cadherin 発現低下を引き起こしていることを初めて見出した。したがって、マイクロ RNA 発現異常の解析は発癌メカニズムの解明に欠かせない。

一方、癌において、遺伝子発現異常を引き起こすものとして、ゲノムコピー数異常が重要である。我々はこれまで、胃癌のゲノムコピー数異常をアレイ CGH 解析によって網羅的に解析し、胃癌には他臓器癌と異なる特有のゲノム異常が存在すること、そしてそれが遺伝子発現に影響することを示してきた。

我々は、さらにこれらの進行胃癌症例の mRNA 発現をマイクロアレイで解析し、ゲノム増幅領域および欠失領域に存在し、発現亢進あるいは発現低下する遺伝子をそれぞれ複数同定し報告した。私は、胃癌におけるゲノムコピー数異常が mRNA のみならずマイクロ RNA 発現にも影響する可能性が強いと考えた。これまですでにゲノムワイドな解析に基づく microRNA 発現に関する報告は 2 報 (Cancer Cell, 13, 272, 2008; PNAS, 103, 2257, 2008) 外国から出されており、発現亢進する microRNA が報告されているが、発現抑制する microRNA の報告はなく、かつゲノムコピー数異常との詳細な関連性についても調べられていない。そこで、本研究では、進行胃癌における microRNA の発現異常を網羅的に解析し、特に発現低下するマイクロ RNA にも注目して、さらにゲノムコピー数異常が microRNA 発現に及ぼす影響を解析して胃癌の発症と進展に関わるマイクロ RNA を同定することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 4 つを達成することで、胃癌発症に関わる miRNA を同定することを目的とした。

第一に、胃癌におけるマイクロ RNA の発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、正常胃組織における発現プロファイルと比較検討して、どのような microRNA の発現異常が胃癌において特徴的にみられるかを明らかにする。さらに検出された異常発現に関して、real-time PCR により validation をおこない、発現異常を確認する。

第二に、これらの発現異常が病理亜型、な

らびに臨床的予後とどのような関連性があるかを解析する。

第三に、我々はこれまでアレイ CGH 解析によりゲノムコピー数異常を解析してきたが、本研究で作成する microRNA の発現プロファイルデータと、アレイ CGH のデータを統合して、ゲノムコピー数マイクロ RNA roRNA の発現異常に及ぼす影響を明らかにする。

第四に、発現異常を認めたマイクロ RNA を胃癌細胞に transfect して過剰発現させたり、siRNA により発現抑制したりすることで、細胞の増殖、生存にどのような機能を示すかを解析する。

3. 研究の方法

本研究では、まず、LCM を用いて胃癌組織から癌細胞ならびに正常胃上皮細胞を切り取り、total RNA を抽出する。Agilent 社製のマイクロアレイを用いてマイクロ RNA の発現を網羅的に解析して、胃癌において発現異常を示すマイクロ RNA を抽出する。さらに、抽出されたマイクロ RNA が本当に発現亢進あるいは低下しているかをリアルタイム PCR で確認する。そして、発現異常が確認されたマイクロ RNA について、培養細胞に遺伝子導入あるいはノックダウンしてその機能を解析して、発現異常の意義を明らかにする。最後に、これまでにすでに報告したアレイ CGH 解析による遺伝子コピー数異常との関連を解析して、マイクロ RNA の発現異常がゲノム異常によりもたらされたものか否かを検証する。

詳細は以下である。

(1) 正常胃組織ならびに胃癌組織から total RNA を抽出する。

凍結ブロックから切り出した組織切片から Laser-captured microdissection (LCM) を用いて、癌組織の癌細胞と周辺組織の正常胃粘膜の上皮細胞を切り取り、total RNA を miRNeasy mini kit (Agilent) を用いて抽出、精製する。

(2) 胃癌組織におけるマイクロ RNA プロファイリングを解析する。

正常胃上皮細胞と胃癌組織から抽出した 100ng の total RNA を用いて Agilent 社の 8x15K microRNA アレイで解析する。

- ①正常胃組織 8 例と胃癌組織 30 例について以下のプロトコールで解析。
- ②バイオアナライザー (Agilent 社製) を用いて抽出した RNA の質を評価。
- ③microRNA labeling reagent and Hyb kit を用いて microRNA をラベルし、ハイブリダイズする。
- ④アレイを wash 後、レーザースキャナーでシグナルを検出する。

- ⑤GeneSpring GXソフトウェア (Agilent) で発現プロファイルを作成し、胃癌において異常発現する microRNA を検出する。
- ⑥さらに、クラスター解析により、microRNA 発現パターンにより胃癌の亜型分類が可能かを解析する。

(3) microRNA プロファイリングと病理組織学的因子および臨床的予後との関連性の解析する。

クラスター解析の結果、亜型分類が可能な場合、それらの亜型と病理組織学的因子 (組織型、分化度など)、臨床的予後との相関を解析する。

(4) 組織ならびに細胞株の解析の結果、異常発現する microRNA として抽出されたものについて、リアルタイム PCR を行い、発現異常を確認する (validation)。

Taqman Micro RNA assay kit (アプライドバイオシステムズ) を用いる。

(5) ゲノムコピー数異常と microRNA 発現異常の関連性を検討する。

- ①我々はすでに進行胃癌のアレイ CGH 解析とトランスクリプトーム解析を行い、両データを統合してゲノムコピー数異常が mRNA 発現に及ぼす影響を報告している。そこで、本研究で抽出された microRNA 発現異常プロファイルのデータも同様にアレイ CGH データと統合して、ゲノム異常の存在する領域で発現異常を認めた microRNA を抽出する。
- ②ゲノムコピー数の増加あるいは減少と microRNA 発現変化の相関を解析する。

(6) 異常発現候補遺伝子として抽出された microRNA の機能解析。

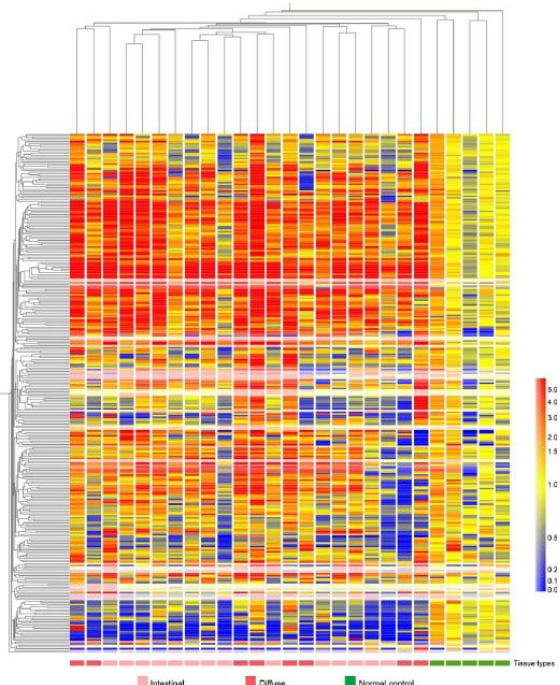
- ①異常発現する microRNA が癌細胞にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、Anti-miR miRNA inhibitor (Ambion 社) を用いたノックダウンや Pre-miR miRNA molecule (Ambion 社) を用いた発現誘導により機能解析する。
- ②21 年度に胃癌における異常発現 microRNA として抽出された microRNA を高発現している胃癌細胞株あるいは発現が認められない胃癌細胞株を使って、機能解析を行う。我々はすでに胃癌細胞株における microRNA の網羅的発現プロファイルを解析済みであるので、用いる胃癌細胞はそのデータを用いて決定する。
- ③機能解析としては、細胞増殖能 (MTT assay)、アポトーシス制御能、細胞周期解析、運動能ならびに浸潤能の解析などを行う。

4. 研究成果

第一に、我々は胃癌組織におけるマイク

ロ RNA 発現プロファイルをマイクロアレイで解析した。クラスター解析を行ったところ、正常組織と胃癌組織で発現プロファイルが明らかに異なっていることを発見した (図 1)。組織型・リンパ節転移の有無など、臨床病理学的因子とは関連が認められなかった。

図 1



ロ RNA を同定するため、ANOVA 解析を行ったところ、発現低下するマイクロ RNA を 6 個、発現亢進するマイクロ RNA を 33 個、同定した (図 2)。発現差の認められたマイクロ RNA のうち、miR-17-5p と miR-93 と miR-29c についてはリアルタイム PCR で発現を確認した。

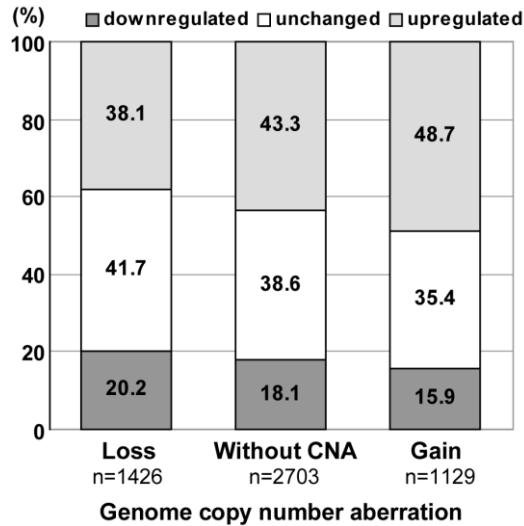
図 2, miRNAs differentially expressed between tumor and normal tissues.

(A) Downregulated miRNAs in tumor						
ID (miRBase 9.1)	Fold change	SD	Raw	Corrected P	Mature accession	ID (miRBase 13.0)
hsa-miR-375	0.15	0.52	809.2	0.0204	MIMAT0000728	hsa-miR-375
hsa-miR-29c	0.16	0.15	1667.4	0.0102	MIMAT0000681	hsa-miR-29c
hsa-miR-148a	0.19	0.43	1176.0	0.0259	MIMAT0000243	hsa-miR-148a
hsa-miR-30a-5p	0.30	0.37	220.0	0.0284	MIMAT0000087	hsa-miR-30a
hsa-miR-30e-5p	0.34	0.28	363.8	0.0147	MIMAT0000692	hsa-miR-30e
hsa-miR-638	0.46	0.34	1480.5	0.0303	MIMAT0000338	hsa-miR-638
(B) Upregulated miRNAs in tumor						
hsa-miR-18a	10.66	7.99	962.8	0.0102	MIMAT0000072	hsa-miR-18a
hsa-miR-106a	9.02	5.21	2212.5	0.0102	MIMAT0000103	hsa-miR-106a
hsa-miR-17-5p	9.01	5.66	1830.2	0.0102	MIMAT0000075	hsa-miR-17
hsa-miR-146a	8.86	18.74	735.5	0.0112	MIMAT0000449	hsa-miR-146a
hsa-miR-93	8.27	5.31	1227.2	0.0102	MIMAT0000093	hsa-miR-93
hsa-miR-19a	7.80	5.18	2188.3	0.0102	MIMAT0000073	hsa-miR-19a
hsa-miR-30a	7.62	4.55	2857.1	0.0102	MIMAT0000075	hsa-miR-30a
hsa-miR-20b	6.84	4.22	798.7	0.0102	MIMAT0000113	hsa-miR-20b
hsa-miR-25	5.57	3.68	1255.5	0.0102	MIMAT0000081	hsa-miR-25
hsa-miR-15b	5.47	2.89	1370.8	0.0102	MIMAT0000417	hsa-miR-15b
hsa-miR-425-5p	5.27	3.47	509.6	0.0102	MIMAT0000393	hsa-miR-425
hsa-miR-92	5.24	3.15	3143.2	0.0102	MIMAT0000092	hsa-miR-92a
hsa-miR-194	5.16	3.24	4713.8	0.0134	MIMAT0000460	hsa-miR-194
hsa-miR-10a	4.77	8.26	607.3	0.0303	MIMAT0000253	hsa-miR-10a
hsa-miR-222	4.70	4.20	936.6	0.0147	MIMAT0000279	hsa-miR-222
hsa-miR-7	4.68	3.87	802.8	0.0102	MIMAT0000252	hsa-miR-7
hsa-miR-106b	4.30	2.86	2382.1	0.0112	MIMAT0000680	hsa-miR-106b
hsa-miR-320	4.20	2.04	1416.7	0.0134	MIMAT00000510	hsa-miR-320a
hsa-miR-21	4.05	2.17	21464.0	0.0102	MIMAT0000076	hsa-miR-21
hsa-miR-34a	4.03	4.00	1422.8	0.0134	MIMAT0000255	hsa-miR-34a
hsa-miR-19b	3.99	2.24	4842.2	0.0102	MIMAT0000078	hsa-miR-19b
hsa-miR-107	3.89	1.72	2857.5	0.0102	MIMAT0000104	hsa-miR-107
hsa-miR-215	3.78	2.10	2395.3	0.0147	MIMAT0000272	hsa-miR-215
hsa-miR-192	3.74	2.04	3743.4	0.0170	MIMAT0000222	hsa-miR-192
hsa-miR-429	3.65	5.92	2019.4	0.0170	MIMAT00001536	hsa-miR-429
hsa-miR-27a	3.32	2.18	1186.0	0.0226	MIMAT0000084	hsa-miR-27a
hsa-miR-223	3.13	4.33	585.6	0.0451	MIMAT0000280	hsa-miR-223
hsa-miR-23a	2.89	2.11	1821.2	0.0226	MIMAT0000078	hsa-miR-23a
hsa-miR-107	2.89	1.72	2857.5	0.0196	MIMAT0000104	hsa-miR-107
hsa-miR-200b	2.57	3.38	5048.1	0.0284	MIMAT0000318	hsa-miR-200b
hsa-miR-24	2.53	2.07	4163.1	0.0344	MIMAT0000080	hsa-miR-24
hsa-miR-15a	2.32	1.03	913.7	0.0170	MIMAT0000068	hsa-miR-15a
hsa-miR-16	1.85	0.77	3698.1	0.0284	MIMAT0000069	hsa-miR-16

NOTE: miRNAs with raw signal over 500 in tumor tissue are shown.

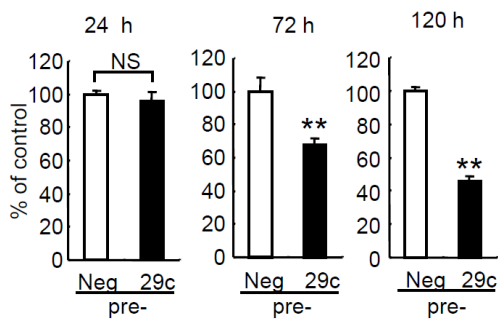
第二に、ゲノムコピー数異常とマイクロ RNA 発現の相関を解析した。以前に我々が報告したゲノムコピー数とメッセンジャーRNAの相関と比較し、ゲノムコピー数とマイクロ RNA の相関は小さいことがわかった (図 3)。

図 3, Population of deregulated miRNAs in genomic regions with copy number aberration.



第三に、異常発現するマイクロ RNA が癌細胞にどのような影響を与えるか機能解析を行った。我々はまず、胃がんで発現低下していたマイクロ RNA のうち、もっとも有意に発現低下していた miR-29c の機能解析を行った (Corrected p value=0.0102)。miR-29c を胃癌細胞株 MKN7, MKN45, MKN74 へ導入したところ、いずれの細胞株においても細胞増殖抑制が認められた (MKN45, 図 4)。

図 4



以前の報告では、miR-29c は他の癌腫においてアポトーシス誘導能を持つことが知られていたが、興味深いことに、胃癌細胞株ではいずれにおいてもアポトーシスは認められなかった (Caspase 3/7 assay, miR-375 導入細胞をポジティブコントロールとする。図 5)。増殖マーカーであるリン酸化ヒストン抗体を用いて細胞染色を行ったところ、miR-29c 導入細胞で有意に染色率が低下していた (図

6)。この結果は、miR-29c による細胞増殖抑制に細胞周期抑制が関与することを示唆する。

図 5

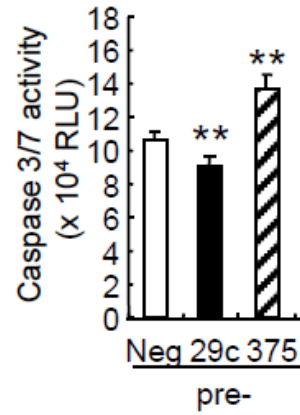
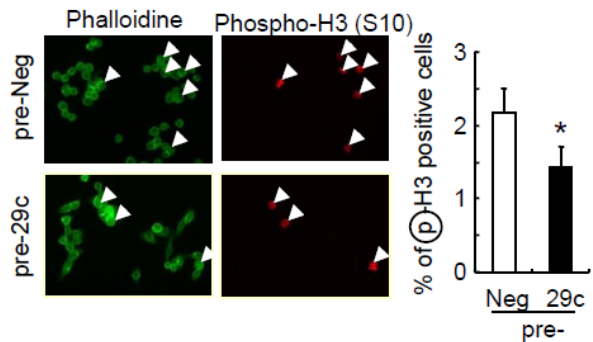
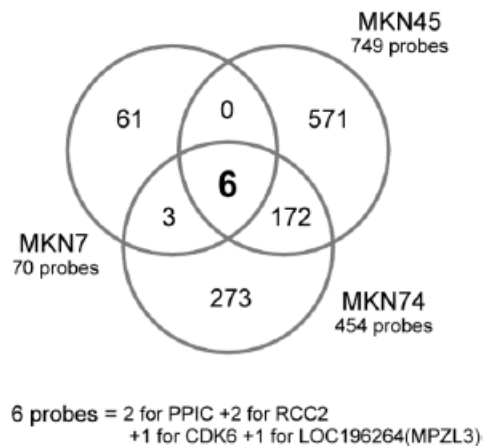


図 6



さらに我々は、miR-29c がどのように細胞増殖を抑制するのか、メカニズム解明を試みた。miR-29c 導入により発現変動する遺伝子を発現マイクロアレイにて解析した。その結果、3 つの細胞株に共通して、CDK6, RCC2, PPIC が発現低下していた (図 7)。

図 7



興味深いことに、これら 3 つの遺伝子の 3' UTR にはいずれも miR-29c の結合配列が含まれていた。今後、更なる解析を行うことで、miR-29c 発現低下と胃癌発症の関係、それを標的とした治療法の開発につながると確信している。

このように、我々は、胃癌におけるマイクロ RNA 発現の異常を網羅的に解析し、がん抑制型マイクロ RNA 候補の同定に成功した。今回のスクリーニングで得られた胃癌で異常発現するマイクロ RNA は miR-29c 以外にも癌化に寄与するものが含まれていると考えられる。今後研究を進展させることにより、マイクロ RNA シグナルを標的とした胃癌における新規治療法の開発につながることが期待される。

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 3 件)

① Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 α , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. J Pathol. 2011 Jun;224(2):280-8.

② MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M. Cancer Res. 2010 Mar 15;70(6):2339-49.

③ Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, Nguyen LT, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. J Pathol. 2008 Dec;216(4):418-27.

[学会発表] (計 1 件)

① 第 100 回 日本病理学会、パシフィコ横浜、2011 年 4 月 28 日ワークショップ 4、「胃癌におけるマイクロ RNA 発現」塚本 善之、守山 正胤 (招待講演)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守山 正胤 (Moriyama Masatsugu)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：90239707

(2) 研究分担者

塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：00433053

(3) 連携研究者

なし