

科学的研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22791280

研究課題名 (和文) 消化器癌の抗癌剤耐性を制御する microRNA の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and Functional Analysis of microRNAs Regulating chemoresistance of Digestive Cancer

研究代表者

友國 晃 (TOMOKUNI AKIRA)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40528577

研究成果の概要 (和文)：

本研究では特に肝癌に着目してインターフェロン- α (IFN- α)耐性を制御する microRNA について検討した。肝癌細胞株 PLC/PRF/5 (PLC-P), その IFN- α 耐性クローン (PLC-Rs; PLC-R1, -R2, -R3) を用いた miRNA マイクロアレイから抽出された miR-146a は, 定量的 PCR にて PLC-Rs において PLC-P よりも有意に発現が高いことが示された。リポフェクション法による miRNA の発現増強/発現抑制, 遺伝子ノックダウンの実験から miR-146a が SMAD4 を標的として IFN- α 感受性を低下させることを明らかにした。肝癌患者に対する IFN- α ベースの治療において miR-146a は効果予測や治療ツールとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Interferon-based (IFN-based) therapy is effective in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC). However, the issue of resistance to this therapy remains to be solved. The aim of this study was to identify microRNAs (miRNAs) that govern the sensitivity to IFN- α in HCC cells. miRNA microarray analysis using IFN- α -resistant clones of PLC/PRF/5 (PLC-Rs) and their parental cells (PLC-P) was conducted. Changes in the anti-cancer effects of IFN- α were studied after gain-of-function and loss-of-function of the candidate miRNA. miR-146a expression was significantly higher in PLC-Rs than in PLC-P. miR-146a decreased the sensitivity to IFN- α through the suppression of apoptosis. Further experiments showed that miR-146a-related resistance to IFN- α was mediated through SMAD4. The results indicated that miR-146a regulated the sensitivity of HCC cells to the cytotoxic effects of IFN- α through SMAD4, suggesting that this miRNA could be suitable for prediction of the clinical response and potential therapeutic target in HCC patients on IFN-based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,600,000	780,000	3,380,000
23年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：microRNA, 抗癌剤耐性, 網羅的発現解析, 肝癌

1. 研究開始当初の背景

教室では高度進行肝細胞癌に対するインターフェロン- α /5-FU 動注化学療法の有効性を報告してきたが、無効例の予後は依然極めて悪く、同治療に対する耐性形成は大きな課題である。そこで、教室では同治療のキードラッグであるインターフェロン- α に注目して研究を進め、複数のインターフェロン- α 感受性制御分子を同定してきた。

一方、近年遺伝子発現の Modulator として機能する microRNA (miRNA)が正常細胞のみならず、癌細胞においても重要な働きを持つことが報告され注目を集めている。

2. 研究の目的

肝細胞癌におけるインターフェロン- α 感受性を制御する miRNA を同定し、その機能を解析することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)miRNA マイクロアレイ

肝癌細胞株 PLC/PRF/5 の親株（以下 PLC-P とする）、およびその IFN- α 耐性クローン（以下 PLC-Rs; PLC-R1, -R2, -R3 とする）を用いた miRNA マイクロアレイ解析を行った。

(2)定量的 PCR 法

(1)から得られた候補につき qRT-PCR を行い PLC-P, -Rs における発現を確認した。

(3)発現増強/抑制実験

(1), (2)から抽出された miRNA について、リポフェクション法により PLC-P における発現増強株、PLC-Rs における発現抑制株を作成し、インターフェロン- α 感受性との関係を検証した。

(4)標的遺伝子に関する検討

抽出された miRNA の標的遺伝子についてもインターフェロン- α 感受性との関係を解析した。

4. 研究成果

(1)miRNA マイクロアレイ

PLC-P および PLC-R1, R2, R3 における発現を比較し、fold change > 1.2 であった miRNA は 115 個抽出され、なかでも miR-146a が最も fold change が大きかった (fold change 3.04)。

(2)定量的 PCR 法

PLC-Rs における miR-146a 発現は PLC-P と比較して有意に高いことが確認された。

(3)miR-146a の発現増強/発現抑制系

- ① MTT アッセイにてインターフェロン- α 感受性を検討したところ、miR-146a の発現増強により PLC-P の IFN- α 感受性が有意に低下し、逆に miR-146a の発現抑制により PLC-R1 の IFN- α 感受性が有意に向上することが示された。
- ② Annexin V アッセイでは miR-146a の発現調節により、IFN- α 曝露に伴うアポトーシス細胞数の有意な変化を来たことが示され、miR-146a がアポトーシスの抑制を介して IFN- α 感受性を低下させることが明らかとなった。

(4)miR-146a の標的遺伝子に関する検討

miR-146a の標的遺伝子に関してこれまで知られている中でも、特に癌抑制遺伝子として知られる SMAD4 に注目して検討した。

- ① miR-146a の発現増強/抑制株を用いたウェスタンブロット法による解析から、miR-146a の発現と SMAD4 の発現は逆相関関係にあることが示された。
- ② SMAD4 を knock down することにより PLC-P における IFN- α 感受性は有意に低下した。さらに、miR-146a 発現抑制に伴う PLC-R3 の IFN- α 感受性の向上が、SMAD4 の knock down により相殺されることが示された。

以上より、miR-146a は SMAD4 を標的として肝癌細胞におけるインターフェロン- α 感受性を抑制していることが明らかとなった。

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)

Tomokuni A, Eguchi H, Tomimaru Y, Nagano H, Doki Y, et al. miR-146a suppresses the sensitivity to interferon- α in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 414 (2011), 675-680

〔学会発表〕(計 2 件)

友國晃, 江口英利, 永野浩昭, 土岐祐一郎, ら. 肝癌細胞株におけるインターフェロン耐性を制御する microRNA の同定と機能解析. 第 111 回日本外科学会総会, 2011 年 5 月, 紙上開催.

友國晃, 江口英利, 永野浩昭, 土岐祐一郎, ら. 第 47 回日本肝臓学会学術集会, 2011 年 6 月 2 日, 東京大学.

〔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

友國 晃 (TOMOKUNI AKIRA)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 40528577