

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591931

研究課題名(和文) 胃癌におけるマイクロRNAを用いた新しい治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapy with microRNA in gastric cancer

研究代表者

佃 和憲 (Tsukuda, Kazunori)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20346430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胃癌細胞におけるマイクロRNA(以下miR)34b/cの異常を検討した。miR34b/cは癌抑制遺伝子であるp53の下流に存在し、癌抑制作用を有すると考えられている。胃癌細胞株においてmiR34b/cは遺伝子メチル化により発現が抑制されており、特にp53の変異のない細胞株で高度に抑制されていた。患者の胃癌組織においても同様のメチル化変異が確認された。また、発現が抑制されている胃癌細胞株にmiR34b/cを遺伝子導入したところ細胞抑制作用がみられ、胃癌に対する遺伝子治療の可能性を示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：The genetic alteration of microRNA 34b/c in gastric cancers has been studied. The microRNA 34b/c is considered to work under p53, the tumor suppressor gene, and have tumor suppressor effects. The promoter region was highly methylated and the expression was suppressed in most gastric cancer cell lines. The similar methylation was also found in primary gastric cancer tissues of the patients. And gene transfection of microRNA 34b/c in the gastric cancer cells showed the suppression of tumor growth which insinuated that this microRNA would be useful for gene therapy to the gastric cancers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外化学

キーワード：胃癌 マイクロRNA 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

胃癌の治療には手術、化学療法を用いた集学的治療が行われるが、いまだにその治療成績は不十分であると言わざるをえない。今日の分子生物学の発展により悪性腫瘍における遺伝子変異の理解がすすみ、それに立脚した新しい治療法が開発されている。

我々はこれまで種々の悪性腫瘍の分子生物学的異常を検索しており、特に癌抑制遺伝子について遺伝子変異、メチル化異常、発現異常等を明らかにしてきた。その過程において、1つの悪性腫瘍の中に複数個の遺伝子異常が蓄積し、また、個々により異常のパターンが異なることを示してきた。

その中で、今回注目した遺伝子は、タンパクにならない遺伝子群であるマイクロRNA(以下 miRNA)である。miRNAはRNA干渉能を有しており、他の遺伝子のメッセンジャーRNAのC末端に存在する非翻訳領域に作用し、メッセンジャーRNAがタンパク質に翻訳されることを抑制している。悪性腫瘍においては、主として癌化を抑制する働きをもつmiRNAと癌化を促進する働きをもつmiRNAが存在する。これらmiRNAの異常が種々の悪性腫瘍で報告されるようになっており、これを基に胃癌の新しい治療法の開発をめざした。

2. 研究の目的

胃癌におけるmiRNA異常を解析し、その病態の解明とともに、新しい治療法の開発を目指した。

(1) 癌抑制性miRNAの解析と癌化への関与を解析する、

(2) miRNA導入による抗腫瘍効果を検討する。

特に、癌抑制的な働きをもつmiR-34 familyに注目しており研究を進めてきた。他施設からの胃癌におけるmiR-34の変異に関する報告は見られるようになってきたが、本研究は遺伝子治療や他の治療との

併用治療にまで応用することを目指した。

miR-34は腫瘍抑制遺伝子であるp53の制御を受けており、胃癌においてp53の異常がある場合、miR-34の機能は失われている。それ以外にもmiR-34自体が発現低下する場合があります、DNAのメチル化をその機構の一つと考えている。これらいくつかの機構によりmiR-34が異常を示すことが予想されるが、胃癌におけるメカニズムを明らかにすることが本研究の第一の目標である。

miR-34はp53の下流の因子として働きE2F3, Cyclin E2, CDK6等の発現を抑制的に制御している。このため、細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用を有している。このためmiR-34の発現低下は発癌に働いており、癌細胞に対するmiR-34の導入は増殖抑制・アポトーシスの誘導を惹起し、抗腫瘍効果を示すことが予想され、これを細胞株を用いて示すことが2点めの目標である。

さらに、研究の発展ができる場合は、miR-34の導入により、p53と同様に悪性腫瘍においてアポトーシスの誘導し、抗癌剤や放射線治療に対する増強作用が示すことも目標としている。

3. 研究の方法

(1) 胃癌における発現異常を示すmiRNAの同定。

胃癌細胞株を使用し、脱メチル化処理を行った細胞と元細胞で発現に差のあるmiRNAを網羅的に検索する。また、miR-34b/cについてはさらに、原発腫瘍組織を用いて発現低下の確認およびその機構の解明、特に遺伝子のメチル化を中心に解析を行う。これに関しては胃癌ですでに知られているピロリ菌感染、p53遺伝子異常を踏まえ、複合的に解析する。

(2) miRNAの胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討。

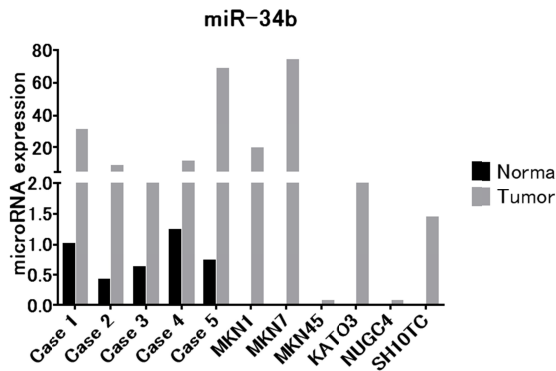
miRNAを発現ベクターに組み込み、miRNAの発現が低下している胃癌細胞株に導入し効果を検証する。細胞の増殖能に

については colony formation アッセイおよび MTS アッセイを用いて検討を行う。

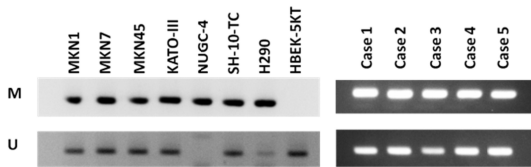
(3) マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討。
効果の明らかとなった細胞株を用いてマウスモデルを作成し、遺伝子導入による効果を in vitro で確認する。

4. 研究成果

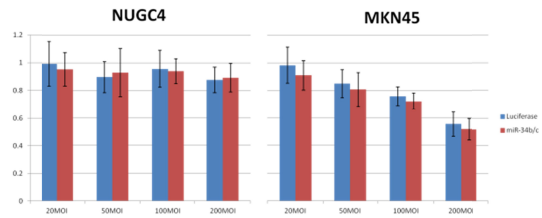
(1) 胃癌細胞株および胃癌組織における miR-34b/c の発現を示す。胃癌組織については正常粘膜の方が発現が低かったが、細胞株においても強く発現が低下している細胞株が見られた。



胃癌細胞株および胃癌検体で miR34b/c の遺伝子のメチル化を検討すると、ほぼすべての検体でメチル化を確認できた。また、発現の強く低下していた細胞株 MKN45, NUGC4 は p53 が正常と知られており、miR34b/c の低下が別経路での p53 の抑制作用と考えられた。



(2) 胃癌細胞株に遺伝子導入を行うと細胞の増殖抑制作用が認められた。



(3) マウスにおける in vivo の検討を引き続き行う予定であり、さらに臨床に即した成果を得られるものと期待する。

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0件)

[学会発表](計0件)

[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

佃 和憲 (TSUKUDA KAZUNORI)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：20346430

(2)研究分担者

豊岡 伸一 (TOYOOKA SHINICHI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30397880

浅野 博昭 (ASANO HIROAKI)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：70534775