

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591940

研究課題名(和文)食道癌におけるmicroRNAを介した偽遺伝子による遺伝子制御機構の解明の解明

研究課題名(英文)Pseudogene affected gene expression via regulating microRNA in esophageal squamous cancer

研究代表者

長井 洋平(NAGAI, Yohei)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：30551254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPTENとその偽遺伝子であるPTENP1の発現が相関関係であることを確認した。また、食道扁平上皮癌でmiR-223は、癌抑制遺伝子FBXW7の発現を抑制し、癌の進展に寄与していることを報告した。この結果をもとに、FBXW7の発現を抑制するonco-miRを捕捉するsponge(罫)として、遺伝子の3'UTRを癌細胞に導入する治療法を考えたが、結合するmiRNAの発現変化、FBXW7自体の発現の変化、並びに癌の増殖にいずれも大きな変化はなく、治療として期待されたものではなかった。胃癌においてmiR-200bが、ZEB1、ZEB2の発現を抑制し、癌の上皮間葉転換に影響を及ぼすことを報告した。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRs) are ~22 nucleotide non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally. Competitive endogenous RNAs (ceRNAs) sequester miRs to regulate mRNA transcripts containing common microRNA recognition elements. We investigated the relationship among the PTEN, PTENP1 by qRT-PCR in 40 cancer cell lines. In the 40 gastric cancer patients, we found a remarkably strong correlation between the expression levels of the PTEN and PTENP1. Next, we indicate that high expression of miR-223 had a significant adverse impact on the survival of esophageal squamous cell carcinoma patients through repression of the function of FBXW7. We sought that 3'UTR of FBXW7 will be therapy sponge which decoy of onco-miRs targeted FBXW7. However, up-regulated 3'UTR of FBXW7 did not affect the expression of miRs and FBXW7. Next, we suggest that miR-200b regulates the ZEB1/2 in gastric cancer and thus controls EMT in gastric cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：microRNA pseudogene FBXW7

### 1. 研究開始当初の背景

L. Polisenonらは、2010年にPTENの偽遺伝子(pseudogene)であるPTENP1が、microRNAを介して互いに制御し合っており、miRNAが本来結合する標的遺伝子の3'UTRと同様の遺伝子配列を偽遺伝子が持っていた場合、偽遺伝子はおとりとなり、対応する遺伝子と同様の生物学的役割を担うことを報告した。

### 2. 研究の目的

我々は、この報告と上記の我々の研究の結果を元に、それぞれの遺伝子におけるmiRNAを介した遺伝子発現制御機構に解明することが目的であった。

また、食道扁平上皮癌、胃癌などの上部消化管癌においてmicroRNAの発現異常と癌の悪性を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)我々は、まず、癌抑制遺伝子PTENとその偽遺伝子であるPTENP1の発現解析を、食道癌を含む消化器癌細胞株54種類で、real time PCRにて検討した。

(2)癌抑制遺伝子FBXW7をmiR-223が制御していることを食道扁平上皮癌で証明したが、この結果を元に、癌抑制遺伝子の発現を抑制しているonco-miRを捕捉するsponge(おとり)として、遺伝子の3'UTRを癌細胞に導入する治療法を考えた。

(3)食道扁平上皮癌109例を対象とし、定量的RT-PCR法にてmiR-223の発現を確認し、同一連続切片の免疫染色によりFBXW7蛋白の発現を確認し、miR-223との関係を解析した。さらに、食道癌細胞株を用いて、miR-223の発現を変化させ、FBXW7とその標的蛋白であるc-Myc、c-Junの発現変化を解析した。

(4)胃癌40例を対象とし、癌部、非癌部の新鮮凍結組織よりtotal RNAを抽出し、定量的RT-PCR法にてmiR-200bおよびE-cadherin、ZEB1、ZEB2の発現を解析した。さらに、胃癌細胞株を用いて、miR-200bによるEMT制御機構について解析した。

### 4. 研究成果

(1)癌細胞株54種類にてPTENとPTENP1

の発現は相関関係にあることが分かった。また、PTENをtargetとするmiRNAの中でmiR-19、21、26a、26bの発現を調べるとそれぞれのmiRNAはPTENの発現と逆相関関係にあることが分かった。我々はこれらの結果を元に食道扁平上皮癌臨床サンプルを用い、その発現を検討中である。

(2)FBXW7 3'UTRを細胞株に導入し、結合していたmiRNAの発現変化、FBXW7自体の発現の変化、ならびに癌の増殖進展抑制の効果を検討したが、いずれも大きな変化はなく、治療効果として期待されたものではなかった。

(3)miR-223は、癌部において高発現しており、FBXW7蛋白の発現と逆相関関係にあった。また、miR-223高発現は、多変量解析において独立した予後規定因子であった。食道癌細胞株においてmiR-223を高発現させると、FBXW7の発現は有意に抑制され、FBXW7の標的蛋白であるc-Myc、c-Junの発現は増加した。また逆にmiR-223の発現を抑制すると、FBXW7の発現は有意に増加した。

(4)miR-200bの発現はZEB2と逆相関、E-cadherinと相関関係にあった。また、miR-200b低発現群に、poor/sig群、深達度が深い症例、リンパ節転移陽性、リンパ管浸潤陽性、Stage進行例が有意に多かった。胃癌細胞株にmiR-200bを高発現させると、ZEB2の発現は有意に抑制され、E-cadherinの発現は増加し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能が低下した。

pseudogeneの生物学的役割に関しては、今回の研究では確認できなかったが、われわれは、上部消化器癌において2種類のmicroRNAの発現異常ならびそれに伴う遺伝子発現異常、癌の進展について報告した。

### 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5件)

Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M,

Watanabe M, Baba H. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013 Mar 15;119(6):1159-67. 査読有  
DOI: 10.1002/cncr.27895.

Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Kamohara H, Baba Y, Mimori K, Baba H. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Jan 3;106(1):182-8. 査読有  
DOI: 10.1038/bjc.2011.509.

Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H. MicroRNA-200b Regulates Cell Proliferation, Invasion, and Migration by Directly Targeting ZEB2 in Gastric Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul;19 Suppl 3:S656-64. Epub 2012 Feb 4. 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-012-2217-6.

Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H. Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 106: 188-92, 2012 査読有  
DOI: 10.1002/jso.23064.

Nagai Y, Watanabe M, Ishikawa S, Karashima R, Kurashige J, Iwagami S, Iwatsuki M, Baba Y, Imamura Y, Hayashi N, Baba H. Clinical significance of Wnt-induced secreted protein-1 (WISP-1/CCN4) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011 Mar 31(3):991-7. 査読有  
URL:<http://ar.iiarjournals.org/content/31/3/991.full.pdf+html>

〔学会発表〕(計6件)

藏重 淳二、渡邊 雅之、岩槻 政晃、馬場秀夫、森 正樹、三森 功士、「miR-223は食道扁平上皮癌において癌抑制遺伝子ユビキチンリガーゼ複合体基質ユニットFBXW7の

発現を制御する」、第21回日本がん転移学会学術集会、2012年7月12日~13日、オリエンタルホテル広島

藏重 淳二、渡邊 雅之、田中 洋平、木下浩一、齋藤 誠哉、岩槻 政晃、馬場 祥史、馬場 秀夫、「食道扁平上皮癌においてmicroRNA-223は癌抑制遺伝子ユビキチンリガーゼ複合体基質ユニットFBXW7の発現を制御する」、第112回日本外科学会定期学術集会 2012年4月12日~14日、幕張メッセ(千葉県)

Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H, Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2012, 2012年4月1日~4月4日、アメリカ合衆国 シカゴ

藏重 淳二、蒲原 英伸、渡邊 雅之、田中 洋平、木下 浩一、齋藤 誠也、岩槻 政晃、馬場 祥史、馬場 秀夫、「胃癌におけるmicroRNA-200familyの発現と臨床病理学的検討」、第84回日本胃癌学会総会、2012年2月8日~10日 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

藏重 淳二、渡邊 雅之、田中 洋平、木下 浩一、齋藤 誠也、日吉 幸晴、岩槻 政晃、馬場 祥史、馬場 秀夫、「胃癌におけるmicroRNA-200bによる浸潤転移機構の制御」第20回日本がん転移学会学術集会 2011年7月12、13日 アクトシティ浜松(静岡県)

Junji Kurashige, Masayuki Watanabe, Yukiharu Hiyoshi, Hidenobu Kamohara, Koichi Kinoshita, Seiya Saito, Masaaki Iwatsuki, Yoshifumi Baba, Naoko Hayashi, Hideo Baba, MicroRNA-200b regulates Epithelial Mesenchymal Transition by targeting ZEB2 in Gastric Cancer, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日~5日、名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計1件)

藏重 淳二、渡邊 雅之、岩槻 政晃、岩上 志朗、馬場 秀夫、『最新胃癌学 基礎と臨床の最新研究動向』、「胃癌におけるマイクロRNA-200bの意義」2013年 159 - 165

〔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

長井 洋平 (NAGAI, Yohei)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医  
師  
研究者番号：30551254

### (2) 研究分担者

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)  
公益財団法人がん研究会・がん研有明病  
院・食道担当部長  
研究者番号：80254639

林 尚子 (HAYASHI, Naoko)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医  
師  
研究者番号：20452899

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：20599708

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：