

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659619

研究課題名(和文)大腸癌におけるmiRNA発現がマイクロサテライト不安定性により与える影響

研究課題名(英文)Relationship between microsatellite instability and microRNA in colon cancer

研究代表者

中村 泉(NAKAMURA, IZUMI)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌遺伝子や癌抑制遺伝子として機能するmiRNAが存在し、その発現異常が発癌に関与することが明らかとなった。大腸癌においてmiRNAの発現クラスターはマイクロサテライト不安定性(MSI)の有無により、全く異なることが示されている。われわれはmiRNAの成熟過程においてMSIによる遺伝子変異がmiRNAの構造変化をもたらすかをヘアピンループの自由エネルギーの変化を中心に検討した。結果、MSIによる静的変異はmiRNAの発現に直接的な影響を与えない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mismatch repair-deficient colorectal cancers display widespread instability at DNA microsatellite sequences (MSI). But MSI has been reported to commonly occur at coding repeats, leading to alterations in the function of a number of genes encoding cancer-related proteins, nothing is known about the putative impact of this process on non-coding microRNAs. We considered whether genetic mutation due to MSI changed the structure of miRNA hairpin loop by using thermodynamic free energy. Our results provide evidence that DNA repeats contained in human miRNA gene are relatively rare and preserved from mutations due to MSI.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：MSI 大腸癌 miRNA

1. 研究開始当初の背景

背景-I

大腸癌とマイクロサテライト不安定性

大腸癌の罹患率は最近 25 年間で約 4 倍に増え、2020 年の患者数は 1.5 倍に増加し、男性 2 位、女性は 1 位になると予想されている。マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability: MSI) は、ミスマッチ修復 (Mismatch Repair: MMR) 遺伝子の機能異常による DNA 複製エラーを反映する指標である。大腸癌の 15%程度が MSI が高く (MSI-H)、残りの 85%が MSI が低い (MSI-L)か MSI を示さない (Microsatellite stable: MSS)大腸癌に分類される。MSI を呈する大腸癌では、TGFβRII,IGF2R,BAX などの重要な遺伝子で変化が報告されている。MSI は大腸癌の発育・進展に広く関与し、メタアナリシスでは MSI-H 大腸癌は、MSI-L 大腸癌および MSS 大腸癌よりも再発率が低く、予後良好であると報告されている。また、MSI-H 大腸癌には、術後補助 5-FU 療法による生存への上乗せが認められなかったとも報告されており、MSI 状況の認識は治療の観点からも重要である。

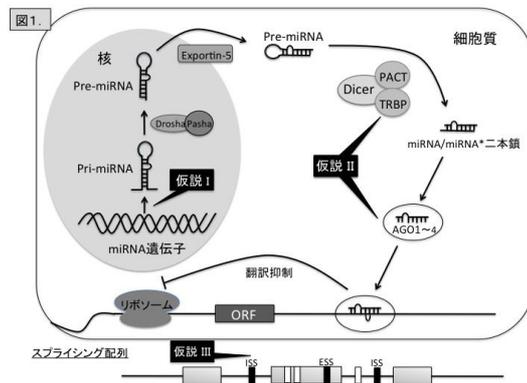
背景-II 大腸癌とマイクロ RNA

標的遺伝子群の発現を制御する小 RNA 分子であるマイクロ RNA(miRNA)は高次の生物学的機能に関わっている。近年、癌遺伝子や癌抑制遺伝子として機能する miRNA が存在し、その発現異常が発癌に関与すること、さらには miRNA 異常が治療標的となりうる事が明らかになり注目されている。大腸癌において発現亢進している miR-21,miR-106a はそれぞれ PTEN,RB との関係がいられている。しかし、MSI 大腸癌においては miR-25,miR-143/134 ファミリー、miR-17-92 の発現が低下しており、miRNA の発現クラスターは MSI の有無により、全く異なることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

近年、癌遺伝子や癌抑制遺伝子として機能する miRNA が存在し、その発現異常が発癌に関与することが明らかとなった。大腸癌においても miRNA の発現亢進あるいは低下が確認されている。興味深いことに、miRNA の発現クラスターはマイクロサテライト不安定性(MSI)の有無により、全く異なることが示されている。われわれは以前の研究より MSI が miRNA 発現に影響を与えていると仮説をたて、その作用機序、および機能的意義を探索することを目的とした。

以下に miRNA の成熟過程を示す(図 1)。この過程における MSI の影響につき、以下の仮説を立てた。



仮説-I

MSI 近傍の静的変異による 2 次構造の変化が precursor-miRNA の切り出しに影響を与えるか？

ゲノム中にコードされている miRNA は、主に RNA ポリメラーゼ II によってステムループ構造を複数持った数百～数千塩基程度の primary miRNA(pri-RNA)として転写される。Pri-RNA は核内で切断され 70 塩基程度の precursor miRNA(pre-miRNA)となる。

MSI を有する消化器癌ではフレームシフト変異を頻発し、アミノ酸配列に影響を与える。以前に、われわれは、アミノ酸配列に影響をあたえない、いわゆる”静的変異”のみでも DNA のヘアピンループ構造が大きく変化することを明らかにした(図 2:TGFβ R プロモーター領域の(A)10 近傍の SNPs(静的変異)が 2 次構造に与える影響)。

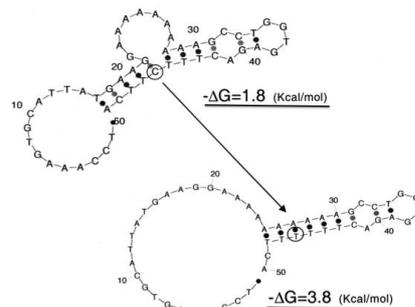


図2. TGFβR プロモーター領域の(A)10近傍のSNPs(静的変異)が2次構造に与える影響

このヘアピンループの変化が miRNA の切り出しに影響を与えるかを *mfold* DNA folding program(DNA 折り畳み構造の自由エネルギーを計算)を用いて検討する。

仮説-II

TARBP 遺伝子,AGO2 遺伝子等のフレームシフト変異が miRNA の生成に影響を与える可能性はあるか？

MSI を有する消化器癌ではフレームシフト変異を頻発するが、DICER と複合体を形成する TRBP 遺伝子や AGO2 遺伝子のフレームシフト変異が報告されている。これは miRNA 成熟プロセスに MSI が関与している

事を示しており、結果として miRNA の全体的な機能低下、ひいては癌の発生・進展に重要な関与をしているものと考えられる。この変異が実際に miRNA 発現に影響しているかについて検討する。

仮説-III

スプライシング配列周辺のマイクロサテライトの変異が miRNA の結合を阻害する可能性は？。

5' および 3' スプライス配列、ブランチ部位周辺の配列エキソン内やイントロン内に存在するスプライシングエンハンサー配列 (ESE, ISE) あるいはスプライシングサイレンサー配列 (ESS, ISS) 部周辺のマイクロサテライトの変異が miRNA の結合を阻害する可能性につき検討する。

3. 研究の方法

研究-I

ステムループ構造を複数持った数百~数千塩基程度の primary miRNA (pri-RNA) して転写される。Pri-RNA は核内で切断され 70 塩基程度の precursor miRNA (pre-miRNA) となる。大腸癌において発現報告がある miRNA の周囲配列に、マイクロサテライトを持つ pre-miRNA を miRbase より抽出し *mfoldDNA folding program* (DNA 折り畳み構造の自由エネルギーを計算) を用いて 2 次構造の変化を確定する。この構造変化が miRNA の形態・切り出しに影響しうるか検討する。

研究 -II

RNaseIII 型の酵素である Dicer と複合体を形成し miRNA/miRNA* を生成する TRBP 遺伝子 (TAR RNA-binding protein 2) は exon5 に (C)5, (C)7 の 2 つの一塩基繰り返し配列をもつ。その他 AGO1 遺伝子、AGO2 遺伝子、EXPORTIN5 遺伝子はそれぞれ、一塩基繰り返し配列を持つ。HCT116 および LoVo 等の MSI-H 細胞株と MSS 細胞株、さらには臨床検体を用いて同遺伝子の変異をキャピラリー・シーケンサーを用いた SSCP 法にて判定後、MSI-H 細胞株と MSS 細胞株での miRNA 発現をリアルタイム PCR を用いて解析する。

研究 -III

スプライシングを制御する RNA 配列

5' および 3' スプライス配列、ブランチ部位周辺の配列、エキソン内やイントロン内に存在するスプライシングエンハンサー配列あるいはスプライシングサイレンサー配列 (ESE, ISE) (ESS, ISS) 近傍のマイクロサテライトを ESE finder よりピックアップする。その位置に対応するマイクロサテライトおよび SNPs を Blast, JSNP をもちいて検索し、HCT116 および LoVo 等の MSI-H 細胞株と MSS 細胞株、さらには臨床検体を用いて同遺伝子の変異をキャピラリー・シーケンサーを用いた SSCP 法にて判定後、MSI-H 細胞株と MSS

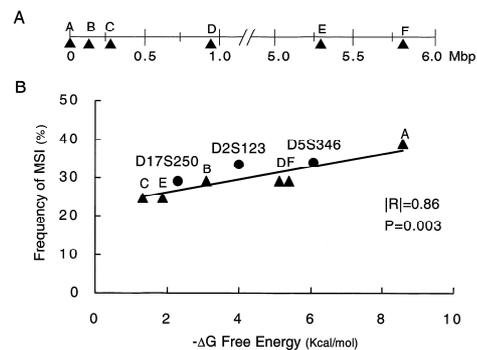
細胞株での miRNA 発現をリアルタイム PCR を用いて解析する。

4. 研究成果

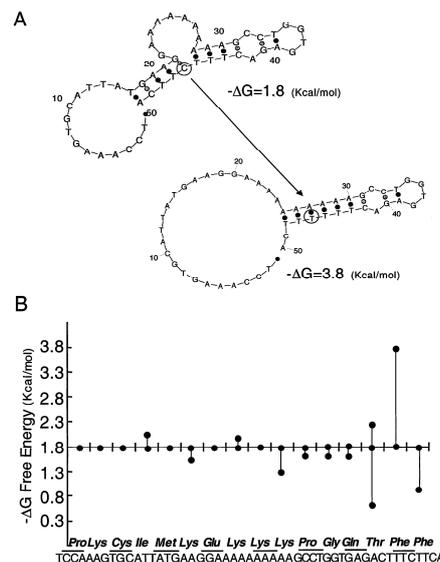
研究-I

MSI 近傍の静的変異による 2 次構造の変化が precursor-miRNA の切り出しに影響与えるかを検討した。

予備検討: 腫瘍な MSI マーカーである D17S250, D2S123, D5S346 と同一遺伝子上に近接して存在する 6 個の繰り返し配列を選択し MSI の頻度と Free Energy との関係を調査した。その結果、下図の如く両者は正の相関を認めた。



続いて、繰り返し配列周囲の一塩基変異 (SNP) が自由エネルギーにどのように影響を及ぼすかを検討した。静的な変異を起こす 16 種類の一塩基変異により、自由エネルギーは 0.38~2.1 倍変化することが明らかになった。



以上の関係を基礎として下記の検討を行った。

これまでの文献より正常組織と比較し大腸癌においてその発現パターンが大きく変化していると報告されている miRNA の構造を調査した。例えば、MSI と MSS にて発現状態

の異なる miR-142-3p, miR212, miR151, miR144, MSI-L と MSI-H において発現パターンの異なる miR-92, miR-223, miR-155, miR196a, miR-31, miR26b の MSS のサブタイプ分類に有用な miR-320, miR-498 などを含む。しかしながら上記の miRNA の stem-loop 周囲配列にマイクロサテライト配列を持つものは認めなかった。

そこで、miRbase を用いて 7 塩基以上の一塩基繰り返し配列をもつ miRNA の抽出を試み、mfoldDNA folding program を用いて通常配列の RNA 折り畳み構造の自由エネルギーを計算した。

miRNA 遺伝子	染色体座	繰り返し数	G
mir-1302-7	8q24.3	A7	-15.2
mir-511-1	10p12.33	T7	-33
mir-543	14q32.31	T7	-24.8
mir-548f-3	5q22.1	T7	-24.8
mir-548f-5	Xp21.1	T7	-37.7
mir-548u	6p11.2	T7	-36.3
mir-3166	11q14.2	T7	-61.2
mir-328	16q22.1	G7	-45.9
mir-1225	16p13.3	G7	-49.5
mir-4271	3p21.31	G7	-24.1
mir-92b	1q22	C7	-66.1
mir-152	17q21.32	C7	-48.2
mir-296	20q13.32	C7	-44.1
mir-1249	22q13.31	C7	-32.7
mir-320c-1	18q11.2	A8	-34.7
mir-525	19q13.42	A8	-40.4
mir-320b-2	1q42.11	A9	-45.3
mir-644	20q11.22	T9	-28.8
mir-4329	Xq23	T9	-21.7
mir-1273c	6q25.2	T11	-46.1
mir-567	3q13.2	A13	-27.8
mir-1303	5q33.2	T13	-43.9
mir-1234	8q24.3	G18	-49.5

自由エネルギーが -60 を越えた、mir-3166 と mir-92b は共に miRNA ヘアピンのステム部に繰り返し配列を持っていた。この結果はステム部の塩基の変異が大きな free energy の

変化をもたらすとする予備検討の結果と一致する。次に、上記の miRNA 周囲の SNP を Blast、J SNP をもちいて検索を行い構造と自由エネルギーの変化を検討した。

しかしながら、いずれにおいても自由エネルギーの変化は小さいものに留まっており、pre-miRNA からの切り出しを変化させるほどの構造の変化は認められなかった。

研究 -II

MSI を有する消化器癌ではフレームシフト変異を頻発するが、DICER と複合体を形成する TRBP 遺伝子や AGO2 遺伝子のフレームシフト変異が報告されている。これらの遺伝子は miRNA の産生に必須なタンパクであり、マイクロサテライト不安定性を有する一部の大型がんにおいて変異していることが知られている。これは miRNA 成熟プロセスに MSI が関与している事を示しており、結果として miRNA の全体的な機能低下、ひいては癌の発生・進展に重要な関与をしているものと考えられる。この変異が実際に miRNA 発現に影響しているかについて検討した。

RNaseIII 型の酵素である Dicer と複合体を形成し miRNA/miRNA* を生成する TRBP 遺伝子 (TAR RNA-binding protein 2) は exon5 に (C)5,7 の 2 つの一塩基繰り返し配列をもつ。その他 miRNA の構造に關与する AGO2 遺伝子、EXPORTIN5(XPO5) 遺伝子はそれぞれ (C)5,7, (A)4,7 の一塩基繰り返し配列を持つ。MSI-H 細胞株 (HCT116, HCT15 および LoVo) さらには大腸癌臨床サンプル (MSI-H 10 症例を含む) を用いて同遺伝子の変異をキャピラリー・シーケンサーを用いた SSCP 法にて判定後、MSI-H 細胞株と MSS 細胞株での miRNA 発現をリアルタイム PCR を用いて解析した。

	細胞株		臨床検体	
	MSS/MSI-H	MSS/MSI-H	MSS/MSI-H	MSS/MSI-H
TARBP(C)5,7	0%/0%	0%/0%	0%/0%	0%/0%
AGO2 (C)5,7	0%/33%	0%/33%	0%/0%	0%/0%
XPO5 (A)4,7	0%/33%	0%/33%	0%/10%	0%/10%

検討の結果、TRBP, AGO2, XPO5 それぞれにおいて MSS 細胞株および臨床検体では変異を認めなかった。MSI-H では細胞株の 1/3 に AGO2, XPO5 の欠失を認めたが TARBP には認めなかった。特に Reassessing the TARBP2 mutation rate in hereditary nonpolyposis colorectal cancer *Nature Genetics* 42, 817-818 においても TRBP 変異率は極めて低いと報告されている。本検討では MSI-H のサンプル数が少なく、より多くの症例で検討を要する。

研究-III

スプライシング配列周辺のマイクロサテライトの変異が miRNA の結合を阻害に影響するかを検討するため、まづ初めにスプライシングを制御する RNA 配列 5' および 3' スプ

ライス配列、ブランチ部位周辺の配列、エキソン内やイントロン内に存在するスライディングエンハンサー配列あるいはスライディングサイレンサー配列 (ESE, ISE) (ESS, ISS) 近傍のマイクロサテライトを ESE finder よりピックアップした。次に、その位置に対応するマイクロサテライトおよび SNPs を Blast、JSNP をもちいて検索したが、miRNA の結合部に一致する変異を認めず、この配列はむしろ保護されていると考えられた。

考察

大腸癌における MSI と miRNA との関係から自由エネルギーの変化に伴う構造の変化を中心に検討した。Coding 領域の遺伝子内のマイクロサテライトについてはいうまでもないが、主としてその多くが non-coding 領域に存在している miRNA 配列はマイクロサテライト領域周囲の SNP や欠失などにより生じる自由エネルギーの変化に伴い構造が変化し、miRNA の発現に影響すると考えた。しかしながら今回の検討では、この仮説を支持する結果は得られなかった。

最近報告された大腸癌を用いた検討では、MSI による遺伝子変異が miRNA 発現に影響することは稀であると結論づけているものもあり、今回の我々の結果を後押しするものである (*MiRNA Genes Constitute New Targets for Microsatellite Instability in Colorectal Cancer* PLoS ONE 7(2))。

一方、甲状腺乳頭癌において KIT 遺伝子の 3' UTR に存在する遺伝子多型が miR-146 あるいは miR-222 の結合エネルギーを大きく変化させたとの報告もあり、さらに多くの miRNA について検討する必要性の他、CRISPR/Cas9 (クリスパー・キャスナイン) システムを用いた検討なども考慮される。

結論

MSI 近傍の静的変異による 2 次構造の変化が miRNA の切り出しに影響与えないこと、DICER と複合体を形成する各遺伝子の変異率の低さ、そして miRNA の結合部周囲の繰り返し配列の変異率の低さを勘案すると、現状では miRNA 発現に対して MSI の影響は大きくはなく、むしろ保護的に働く可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Okano M, Kumamoto K, Saito M, Onozawa H, Saito K, Abe N, Ohtake T, Takenoshita S. Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer. *Oncol Rep*. 査読有 33(3) 2015 1064-70. doi:10.3892/or.2015.3720

Satoshi Suzuki, Yohei Watanabe, Takashi Yazawa, Teruhide Ishigame, Motoki Sassa, Tomoyuki Monma, Tadashi Takawa, Kensuke Kumamoto, Izumi Nakamura, Shinji Ohoki, Yuichi Hatakeyama, Hiroshi Sakuma, Toshiyuki Ono, Sadao Omata, Seiichi Takenoshita TACTILE SENSOR IS USEFUL FOR ESTIMATING LIVER HARDNESS AND LIVER FIBROSIS COMPARED WITH ULTRASONOGRAPHY AND COMPUTED TOMOGRAPHY. *Fukushima J Med Sci* 査読有 60(2) 2015 116-22 doi:10.5387/fms.2013-7

Maejima Y, Hasegawa S, Horita S, Kumamoto K, Galbanovskis J, Takenoshita S, Shimomura K. Water intake disorder in a DEND syndrome afflicted patient with R50P mutation. *Endocr J*. 査読有 2015 10.1507/endocrj. EJ14-0392

Saito M, Shiraishi K, Matsumoto K, Schetter AJ, Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, Kunitoh H, Nokihara H, Watanabe S, Tsuta K, Kumamoto K, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC, Kohno T. A three-microRNA signature predicts responses to platinum-based doublet chemotherapy in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Sep 15;20(18):4784-93. doi: 10.1158/1078-0432.

Okayama H, Schetter AJ, Ishigame T, Robles AI, Kohno T, Yokota J, Takenoshita S, Harris CC. The expression of four genes as a prognostic classifier for stage I lung adenocarcinoma in 12 independent cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 23(12):2884-94. doi: 10.1158/1055-9965.

Shiozawa M, Miyakura Y, Tahara M, Morishima K, Kumano H, Koinuma K, Horie H, Lefor AT, Sata N, Yasuda Y, Gonda K, Takenoshita S, Tamura A, Fukushima N, Sugano K. Combination of protein coding and noncoding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 査読有 73(13) 2013 3821-32. doi: 10.1158/0008-5472

TAKASHI YAZAWA, MASAHIKO SHIBATA, KENJI GONDA, TAKESHI MACHIDA, SATOSHI SUZUKI, AKIRA KENJO, IZUMI NAKAMURA, TAKAO TSUCHIYA, YOSHIHISA KOYAMA, KENICHI SAKURAI, TATSUO SHIMURA, RYOUICHI TOMITA,

HITOSHI OHTO, MITSUKAZU GOTOH, SEIICHI TAKENOSHITA Increased IL-17 production correlates with immunosuppression involving myeloid-derived suppressor cells and nutritional impairment in patients with various gastrointestinal cancers Mol Clin Oncol 査読有 1(4), 2013 675-679 doi:10.3892/mco.2013.134

IZUMI NAKAMURA, MASAHICO SHIBATA, KENJI GONDA, TAKASHI YAZAWA, TATSUO SHIMURA, TAKAYUKI ANAZAWA, SATOSHI SUZUKI, KENICHI SAKURAI, YOSHIHISA KOYAMA, HITOSHI OHTO, RYOUICHI TOMITA, MITSUKAZU GOTOH, SEIICHI TAKENOSHITA Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system Oncol Lett. 査読有 5(5) 2013 1682-1686 doi:10.3892/mco.2013.134

Shigaki K, Mitomi H, Fujimori T, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Fujii S, Itabashi M, Kameoka S, Sahara R, Takenoshita S. Immunohistochemical analysis of chromogranin A and p53 expressions in ulcerative colitis-associated neoplasia: neuroendocrine differentiation as an early event in the colitis-neoplasia sequence. Hum Pathol. 査読有 44(11) 2013 2393-9. doi: 10.1016/j.

[学会発表](計 4 件)

Shinichi Suzuki, Satoru Suzuki, Toshihiko Fukushima, Izumi Nakamura, Hiroki Shimura, Sanae Midorikawa, Tetsuya Ohira, and Shunichi Yamashita Three-Year Results and Future Scope of the Fukushima Thyroid Ultrasound Examination after the Fukushima Nuclear Power Plant Accident ENDO 2015 年 3 月 5-8 日 San Diego

Izumi Nakamura, Satoru Suzuki, Sanae Midorikawa, Toshihiko Fukushima, Hiroki Shimura, Tetsuya Ohira, Akira Ohtsuru, Masafumi Abe, Yoshisada Shibata, Satoshi Suzuki, Shunichi Yamashita and Shinichi Suzuki Systematic Determination of Thyroid Volume By Ultrasound Examination from the Infant to Adolescence in Japan: The Fukushima Health Management Survey ENDO 2015 年 3 月 5-8 日 San Diego

Satoshi Suzuki, Satoru Suzuki, Sanae

Midorikawa, Toshihiko Fukushima, Hiroki Shimura, Tetsuya Ohira, Akira Ohtsuru, Masafumi Abe, Izumi Nakamura, Shunichi Yamashita, and Shinichi Suzuki, Preliminary Results in Prevalence of Thyroid Hemiogenesis and Hypoplasia: The Fukushima Health Management Survey ENDO 2015 年 3 月 5-8 日 San Diego

織内 昇, 隈元 謙介, 中村 泉, 解良 恭一, 富永 英之, 竹之下 誠一 アミノ酸トランスporter-LAT1 の臨床病理学的意義ならびに画像マーカーの開発 第 51 回日本癌治療学会 2013 年 10 月 24 日 ~ 2013 年 10 月 26 日 京都国際会議場

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中村 泉 (NAKAMURA IZUMI)
福島県立医科大学・器官制御外科・准教授
研究者番号：80423804

(2) 研究分担者

大木 進司 (OHKI SHINJI)
福島県立医科大学・器官制御外科・准教授
研究者番号：20381361

竹之下 誠一 (TAKENOSHITA SEIICHI)
福島県立医科大学・器官制御外科・教授
研究者番号：10167489