

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689031

研究課題名(和文) miR-145を標的としたTRAIL経路活性化による癌の「分子標的併用予防法」

研究課題名(英文) "Combination-oriented molecular-targeting prevention" of cancer via the activation of TRAIL pathway by targeting microRNA.

研究代表者

友杉 真野(堀中真野)(Tomosugi(Horinaka), Mano)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80512037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：TRAILは、癌細胞特異的にアポトーシスを誘導するサイトカインであり、癌予防に寄与している。申請者らは、TRAILの発現調節機構としてmicroRNAの関与の可能性を考えた。既に報告されているmiR-145に加え、複数の候補microRNAについて検討した結果、ヒト癌細胞に対し、著明にTRAILの発現を誘導しうるmicroRNAを見出した。その機序は、プロモーターの活性化を介するものであることが判明した。さらに、TRAILの発現を誘導することが報告されている食品由来の成分のTRAIL発現誘導機構においても、このmicroRNAの発現誘導を部分的に介するものであることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：TRAIL is a cytokine which can induce apoptosis against cancer cells, and contribute to cancer prevention. We considered possibility of the involvement of microRNA as one of the mechanisms of regulation of TRAIL expression. As the results of examinations for several candidate microRNAs including miR-145, we found that certain microRNA (miR-X) significantly induced the expression of TRAIL in human cancer cells. The activity of TRAIL promoter was up-regulated by the microRNA, miR-X. Furthermore, this study showed that miR-X was partially involved in the mechanism of TRAIL induction by the metabolism product derived from a dietary fiber reported as TRAIL inducer.

研究分野：がん予防

キーワード：がん microRNA TRAIL 予防

1. 研究開始当初の背景

TRAIL は、免疫細胞だけでなく多くの細胞で発現が確認されているサイトカインで、膜型と分泌型が存在し、TRAIL 受容体 (DR5) を介して癌細胞に特異的にアポトーシスを誘導する。癌細胞においても発現が確認されており、オートクライン、パラクラインによって作用すると考えられている。TRAIL や TRAIL 受容体のノックアウトマウスは発癌率の増加を示すことから (J. Immunol., 175, 5586, 2005; J. Clin. Invest., 118, 100, 2008), TRAIL は現在、癌予防戦略において最も重要な分子の一つであると考えられている。

しかしながら、多くの癌細胞では TRAIL の発現が抑制されていることが癌予防における大きな障害となっている。申請者らは、TRAIL 受容体である DR5 の発現誘導能を有する天然由来癌予防成分の探索を行い、報告している。その後、乳酸菌や酪酸菌がリンパ球や好中球に対し TRAIL の産生増強効果を示すことを見出し、報告した。免疫細胞での TRAIL 誘導のみに依存する抗腫瘍効果には限界があるため、今回、癌細胞からの TRAIL 産生を促進しうる機序の一つとして、microRNA の発現調節に着目した。

現在、ヒトで 2500 種ほどの microRNA が報告されている。その内、多くの microRNA が発癌の促進や抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた (Semin Cancer Biol., 13, 253, 2003; Nature, 447, 1130, 2007; PNAS, 104, 15472, 2007)。その中で、癌抑制的に働くと考えられている miR-145 に着目した。miR-145 は、大腸癌をはじめとした種々の癌組織において正常組織に比べて発現量が低い (Mol. Cancer Res., 1, 882, 2003; Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 20, 1272, 2011) ことに加え、ヒト癌細胞において miR-145 の発現回復によって TRAIL の発現が増強することが報告されている (Br. J. Cancer, 103, 256, 2010)。

2. 研究の目的

TRAIL の発現誘導能を有する microRNA の発現を促進させる食品成分を探索することにより、新規 TRAIL 発現誘導成分を見出す。並行して DR5 発現誘導成分の探索と新規作用機序の検討を行い、新しい癌の分子標的予防法の開発を試みる。

3. 研究の方法

研究計画段階では、2010 年に Br. J. Cancer に掲載された論文を参考に、ヒト前立腺癌細胞に対し、TRAIL 発現増強作用が示されていた miR-145 に着目した。しかしながら、平成 24 年度中に行った数々の実験の結果、miR-145 による TRAIL 発現上昇は再現性をもって確認されなかった。そのため、研究計画を大幅に修正することとした。

癌抑制能が報告されている microRNA を対象とし、TRAIL の発現を誘導する microRNA の探索に着手した。

1) TRAIL 発現誘導 microRNA の探索と作用機序解明

癌抑制 microRNA の mature miRNA (二本鎖) に相当する配列の合成 RNA (miRNA mimic) をヒト前立腺癌細胞に導入し、TRAIL 発現量に対する影響を検討した。タンパク質レベルの検討は Western blotting にて、mRNA レベルの検討は real time RT-PCR にて行った。また、TRAIL promoter を組み込んだ plasmid を用い、luciferase assay により、TRAIL プロモーター活性に及ぼす影響についても検討を行った。

さらに、ヒト大腸癌細胞、ヒト膀胱癌細胞を用い、TRAIL 発現誘導能を検討した。

TRAIL 発現誘導に伴い、発現変動を示した分子については、で見出された microRNA、および TRAIL との関連性を検討した。

2) 新規 DR5 発現誘導成分の探索と作用機序の解明

申請者らの現在までの研究を継続し、ヒト癌細胞を用い、DR5 発現誘導成分の探索を行った。近年、発癌予防効果が期待されている NSAIDs の DR5 発現誘導効果、TRAIL 感受性増強効果とその作用機序について、検討を行った。

4. 研究成果

1) TRAIL 発現誘導 microRNA の探索と作用機序解明

癌抑制 microRNA の中から、ヒト前立腺癌細胞に対し、TRAIL の発現を誘導する microRNA を探索した結果、新規 TRAIL 発現誘導 microRNA として、miR-X を見出した。癌抑制 microRNA である miR-X は、正常細胞に比べ、多くの癌細胞では発現量が低下していることが報告されている。

miR-X によって、TRAIL の発現が正に制御されているのであれば、癌細胞における TRAIL の発現抑制は、この miR-X の発現が抑制されていることに起因するというものであるとも考えられる。

ヒト前立腺癌細胞に miR-X mimic を導入し、継時的なサンプリングにより、TRAIL 発現量の影響を検討した結果、時間依存的な TRAIL の発現増強作用が認められた (図 1A-C)。

* 図中の NC は miRNA mimic のネガティブコントロールを意味する。

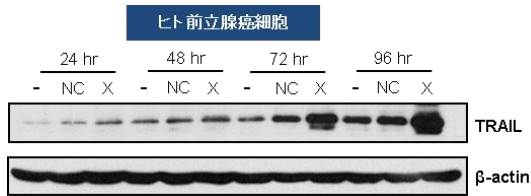


図1A miR-XによるTRAILの発現増強効果 (Western blotting)

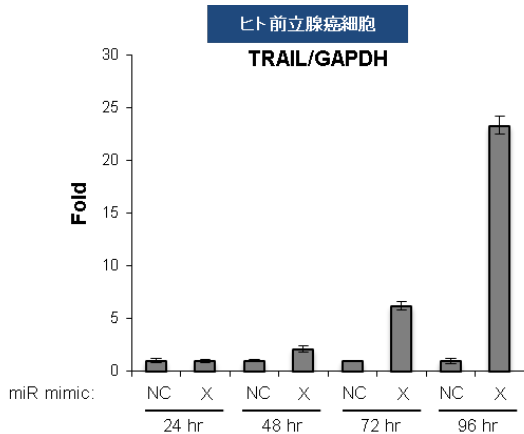


図1B miR-XによるTRAIL mRNAの発現増強効果 (real time RT-PCR)

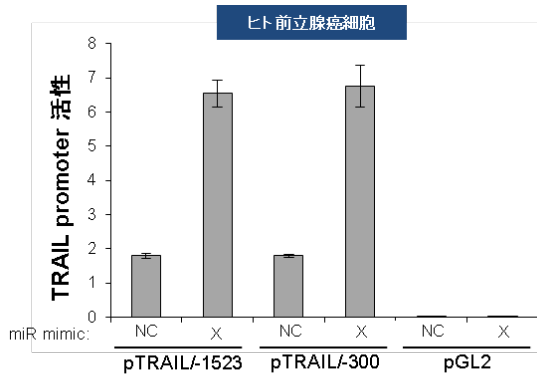


図1C miR-XによるTRAILのプロモーター活性の増強 (luciferase assay)

さらに、ヒト大腸癌細胞、ヒト膀胱癌細胞を加え、TRAIL 発現増強作用について検討を行った。その結果、いずれの細胞においてもタンパク質レベルでTRAILの発現が顕著に誘導された(図1D)。

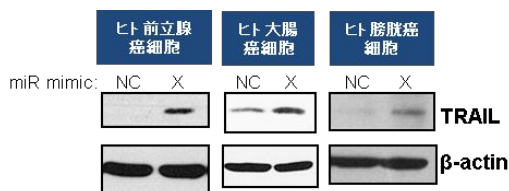


図1D miR-XによるTRAILの発現増強効果 (Western blotting)

miR-Xがヒト癌細胞に対し、TRAILの発現を増強することが複数の細胞において認められたことから、そのTRAIL発現誘導メカニズムの解析を行った。

TRAILのプロモーターレベルでの活性化が認められたことから、TRAILプロモーター上に結合する転写因子から検索を行った。その結果、miR-X mimicの導入によって、TRAILの発現増強とともに発現が顕著に誘導される分子Yが見出された。分子Yの発現をsiRNAによってノックダウンしたところ、miR-X mimicの導入によるTRAIL発現誘導効果が減弱した(図2)。よって、miR-Xは癌細胞内において、分子Yの発現を誘導することで、TRAILの発現を増強させていると考えられる。

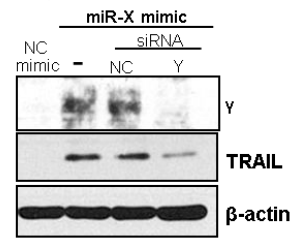


図2 miR-XによるTRAILの発現増強効果における分子Yの関与 (Western blotting)

miR-Xの発現を誘導しうることが、複数の食品成分において報告されていることから、現在、それらのTRAIL発現誘導能について評価を進めている。

2) 新規 DR5 発現誘導成分の探索と作用機序の解明

申請者らの現在までの研究を継続し、ヒト癌細胞を用い、DR5発現誘導成分の探索を行った。近年、発癌予防効果が期待されているNSAIDsのDR5発現誘導効果、TRAIL感受性増強効果とその作用機序について、検討を行った。

ヒト大腸癌細胞およびヒト正常リンパ球に対し、NSAIDsのスリンダクの体内活性化体であるsulindac sulfideのTRAIL感受性増強能を比較した。その結果、ヒト正常リンパ球には全く影響を及ぼさない条件で、ヒト大腸癌細胞に対し、顕著なアポトーシス誘導効果を認めた(図3A)。

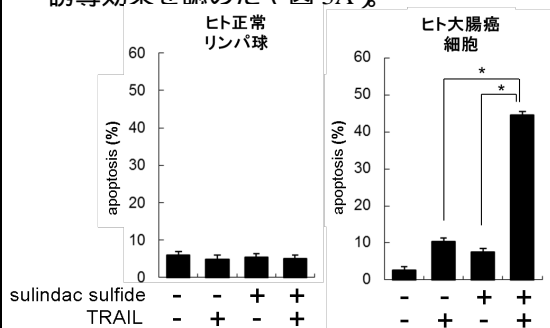


図3A sulindac sulfideによるTRAIL感受性増強効果 (フローサイトメトリー) *; p<0.01

Sulindac sulfide による TRAIL 感受性増強能およびその作用機序の一つとして DR5 の発現増強作用が知られている (Cancer Res., 61, 6918, 2001)。本研究においても、確認実験を行った。その結果、ヒト大腸癌細胞に対し、濃度依存性に DR5 の発現誘導効果が認められた (図 3B,C)。

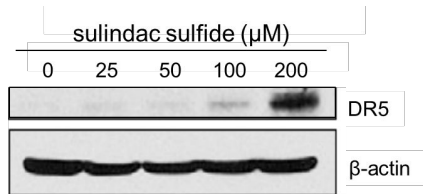


図3B sulindac sulfide によるDR5の発現増強効果 (Western blotting)

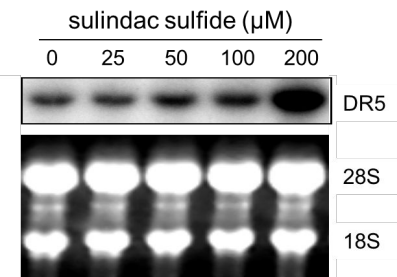


図3C sulindac sulfide によるDR5の発現増強効果 (Northern blotting)

本研究では、さらに DR5 の発現誘導メカニズムの解析を進めた。DR5 のプロモーター配列を組み込んだプラスミドを用い、luciferase assay を行ったところ、DR5 のプロモーター活性化能を認めたため、さらに deletion や point mutation を加えたプラスミドを用い、検証を行ったところ、転写因子である MZF1 が sulindac sulfide 応答領域に寄与している可能性が示唆された(図 3D)。

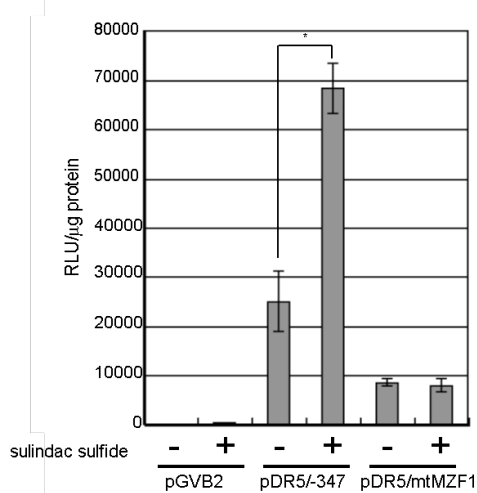


図3D 転写因子MZF1を介したDR5プロモーター活性化増強 (*; p<0.01) (luciferase assay)

そこで、さらに MZF1 を siRNA で特異的に発現をノックダウンしたところ、sulindac sulfide による DR5 の発現誘導効果が減弱した (図 3E)。以上より、sulindac sulfide はヒト癌細胞に対し、転写因子 MZF1 の発現を誘導し、その結果として DR5 発現を増加させ、そして TRAIL 感受性を増強していると考えられる。

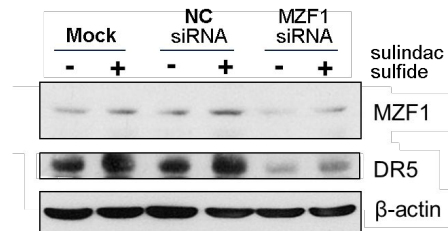


図3E sulindac sulfide によるDR5の発現増強効果におけるMZF1の関与 (Western blotting)

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2件)

Ryoichi Tanaka, Mitsuhiro Tomosugi, Mano Horinaka, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai. Metformin causes G1-phase arrest via down-regulation of miR-221 and enhances TRAIL sensitivity through DR5 up-regulation in pancreatic cancer cells. PLoS One. 2015 May 8;10(5):e0125779. doi: 10.1371/journal.pone.0125779. 査読有

Mano Horinaka, Tatsushi Yoshida, Mitsuhiro Tomosugi, Shusuke Yasuda, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai. Myeloid zinc finger 1 mediates sulindac sulfide-induced upregulation of death receptor 5 of human colon cancer cells. Sci Rep. 2014 Aug 8;4:6000. doi: 10.1038/srep06000. 査読有

[学会発表](計7件)

堀中真野、田中良一、友杉充宏、曾和義広、酒井敏行
メトホルミンはヒト膵癌細胞に対し、miR-221 抑制を介した G1 期停止作用と、DR5 発現誘導を介した TRAIL 感受性増強作用を有する
第 15 回分子予防環境医学研究会
(会場: 自治医科大学 地域医療情報研修センター、栃木県下野市)
2016 年 1 月 30 日

堀中真野、吉田達士、曾和義広、酒井敏行
Myeloid zinc finger 1 mediates sulindac
sulfide-induced upregulation of death receptor 5
of human colon cancer cells.
第 74 回日本癌学会学術総会
(会場: 名古屋国際会議場、名古屋市熱田区
熱田西町)
2015 年 10 月 8 日

堀中真野、吉田達士、曾和義広、酒井敏行
sulindac sulfide による MZF1 発現調節を介し
た TRAIL 感受性増強
第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会
(会場: 松山全日空ホテル、愛媛県松山市一
番町)
2015 年 6 月 11 日

堀中真野、曾和義広、酒井敏行
がんの分子標的予防戦略
第 22 回日本がん予防学会
(会場: ラフレさいたま、さいたま市中央区
新都心)
2015 年 6 月 6 日

堀中真野、酒井敏行
microRNA 発現調節による TRAIL 発現増強作
用の解析
第 85 回日本衛生学会学術総会
(会場: 和歌山県民文化会館・ホテルアバロ
ーム紀の国、和歌山県和歌山市)
2015 年 3 月 27 日

堀中真野、吉田達士、友杉充宏、曾和義広、
酒井敏行
転写因子 MZF-1 を介した sulindac sulfide によ
る DR5 発現誘導機構
第 14 回分子予防環境医学研究会
(会場: 大阪市立大学医学部学舎、大阪市阿
倍野区旭町)
2015 年 2 月 13 日

堀中真野、吉田達士、友杉充宏、酒井敏行
sulindac sulfide による TRAIL 感受性増強作用
第 84 回日本衛生学会学術総会
(会場: 岡山コンベンションセンター、岡山
市北区駅元町)
2014 年 5 月 27 日

〔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
友杉(堀中) 真野
(TOMOSUGI (HORINAKA), Mano)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：80512037

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：