

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860262

研究課題名(和文) アポトーシス制御および発癌過程におけるEBV由来microRNAの機能の解明

研究課題名(英文) The roles of EBV-encoded microRNAs in the regulation of apoptosis and carcinogenesis

研究代表者

牛久 綾(篠崎綾)(Shinozaki-Ushiku, Aya)

東京大学・医学部附属病院・特任講師(病院)

研究者番号：60581824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の発生におけるEpstein-Barr virus(EBV)由来のmicroRNAの役割を解明するために、手術により切除された胃癌組織および胃癌細胞株を用いて、EBV関連胃癌におけるEBV由来のmicroRNAの発現を網羅的に解析し、発現のプロファイルを明らかにした。発現の高かった特定のmicroRNAについて、その標的遺伝子を予測し、胃癌細胞株を用いて、その機能を解析した結果、EBV由来のebv-miR-BART4-5pが、アポトーシス促進因子であるBidの発現を抑制することにより、アポトーシス抵抗性を獲得することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the roles of EBV-encoded microRNAs in gastric carcinogenesis, surgically resected gastric carcinoma tissues and gastric carcinoma cell lines were analyzed. Comprehensive expression profiling of EBV-encoded microRNAs revealed several EBV microRNAs were highly expressed. Genes which are potentially targeted by these microRNAs were identified by in silico analysis. In vitro study showed ebv-miR-BART4-5p inhibits Bid, one of the apoptosis activators, which leads to resistance to apoptosis.

研究分野：人体病理学

キーワード：Epstein-Barr ウイルス アポトーシス 胃癌

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr virus (EBV) は代表的なヒトの癌ウイルスであり、悪性リンパ腫をはじめとする造血器腫瘍、上咽頭癌や胃癌などの上皮性腫瘍において、腫瘍発生に密接に関連している。EBV による発癌に関しては、これまで潜伏感染遺伝子の機能に着目した研究が主体であったが、近年、発癌におけるエピジェネティック異常が注目されるようになり、その中でも microRNA の機能に関する研究が盛んに行われている。EBV はウイルスそのもののゲノムにコードされる microRNA を有しており、EBV による発癌に関連している可能性が示唆されているが、その詳細については不明な点が多い。

2. 研究の目的

EBV による発癌の過程において、主にアポトーシス制御の観点からウイルス由来 microRNA の果たす役割を探求する。EBV 関連胃癌のモデル細胞株を用いた分子生物学的手法により、EBV 由来 microRNA の発現とこれによるアポトーシス関連蛋白の制御機構を解明する。この結果から発癌に寄与すると考えられるアポトーシス関連蛋白を同定し、その機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒトから得られた EBV 関連腫瘍組織を用いて、定量的 RT-PCR 法により、EBV 由来 microRNA の発現を網羅的に解析する。胃癌とそれ以外の EBV 関連腫瘍における発現を比較し、胃癌で高発現している microRNA を同定する。

(2) 公開されているデータベース、web 上のソフトウェアを用いて、EBV 由来 microRNA の標的となる遺伝子を検索する。

(3) EBV 由来 microRNA の標的となる遺伝子の発現について胃癌細胞株を用いて検討し、これらの蛋白発現とアポトーシス制御の関連について解析する。

4. 研究成果

(1) EBV 関連胃癌 (10 症例) の手術検体から RNA を抽出し、既知の 44 種類の EBV 由来 microRNA の発現を網羅的に解析した (図 1)。発現の高かったものについては、上咽頭癌 (5 例) および EBV 陽性悪性リンパ腫 (5 例) との比較を行い、EBV 関連胃癌で特異的に発現が高いものを見出した。それらについては EBV 関連胃癌モデル細胞株や EBV 関連胃癌から樹立された細胞株においても発現が高いことが確認された (図 2)。

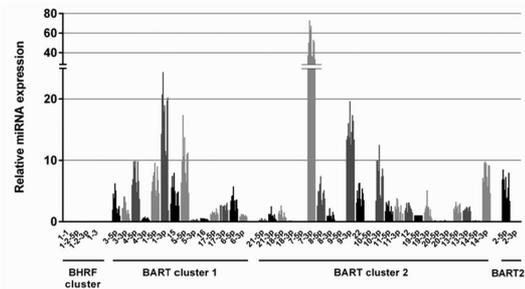


図 1

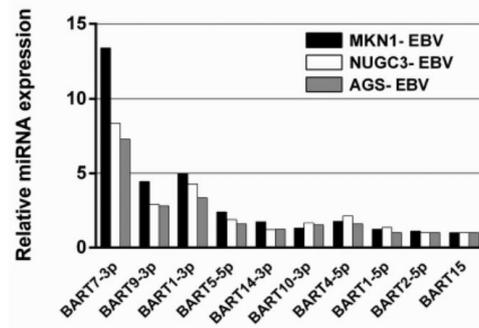


図 2

(2) Web 上に公開されている、microRNA の標的遺伝子を予測するソフトウェアである Target Scan Human Custom を用いて、EBV 関連胃癌で高発現している EBV 由来 microRNA (10 種類) の標的遺伝子を検索した。約 2600 個の遺伝子が候補として挙がり、これらについて pathway 解析を行ったところ、細胞増殖、アポトーシス、接着因子、Wnt シグナルなどの経路に関連していることが明らかになった。(表)

TABLE 2 Functional clustering analysis of EBV miRNA target genes

Database	Related pathway(s)	Gene count	P value
KEGG	Pathways in cancer	37	0.0009
KEGG	Focal adhesion	31	0.0000
KEGG	Regulation of actin cytoskeleton	28	0.0005
KEGG	Wnt signaling pathway	25	0.0000
KEGG	Ubiquitin mediated proteolysis	20	0.0011
KEGG	Axon guidance	17	0.0080
KEGG	Viral myocarditis	16	0.0000
KEGG	T cell receptor signaling pathway	16	0.0035
KEGG	Tight junction	16	0.0240
KEGG	Neurotrophin signaling pathway	15	0.0270
KEGG	Adherens junction	14	0.0011
KEGG	ECM-receptor interaction	14	0.0025
KEGG	ErbB signaling pathway	13	0.0092
KEGG	Dilated cardiomyopathy	13	0.0140
KEGG	Colorectal cancer	12	0.0180
KEGG	Hypertrophic cardiomyopathy	12	0.0190
KEGG	Fc gamma R-mediated phagocytosis	12	0.0400
KEGG	Pathogenic <i>Escherichia coli</i> infection	11	0.0030
KEGG	p53 signaling pathway	11	0.0110
KEGG	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	11	0.0230
KEGG	Endometrial cancer	10	0.0053
KEGG	Acute myeloid leukemia	10	0.0110
KEGG	Dorsoventral axis formation	8	0.0008
KEGG	SNARE interactions in vesicular transport	7	0.0330
Reactome	REACT_604: hemostasis	24	0.0058
Reactome	REACT_16888: signaling by PDGF	18	<0.0001
Reactome	REACT_11061: signaling by NGF	17	0.0380
Reactome	REACT_13552: integrin cell surface interactions	15	0.0001
Reactome	REACT_578: apoptosis	14	0.0280
Reactome	REACT_18266: axon guidance	13	<0.0001
Reactome	REACT_11044: signaling by Rho GTPases	13	0.0430
Reactome	REACT_9417: signaling by EGFR	11	0.0002
Biocarta	Apoptotic signaling in response to DNA damage	7	0.0180
Biocarta	D4-GDI signaling pathway	5	0.0340

これらの遺伝子の中から、アポトーシス関連遺伝子に着目して、胃癌細胞株での発現を検討した。

(3) EBV 関連胃癌モデル細胞株を用いて、いくつかのアポトーシス関連蛋白 (Bcl-2 ファミリー) について Western Blot を用いて発現を検討したところ、EBV 感染株において、アポトーシス促進因子である Bid の発現が低下することが明らかになった (図 3)。

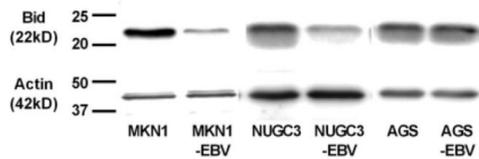


図 3

EBV 由来の microRNA である ebv-miR-BART4-5p の seed 配列が Bid の 3' 端の非翻訳領域に存在しており、この遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを作成した (図 4)。このプラスミドを導入した細胞株に対して、EBV 感染あるいは ebv-miR-BART4-5p 導入を行うことにより、レポーター活性が低下することを示した (図 5)。

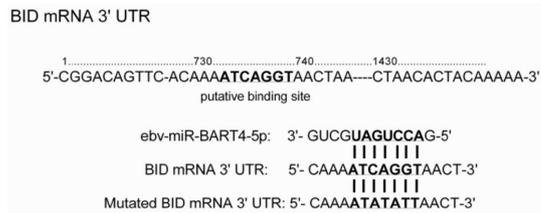


図 4

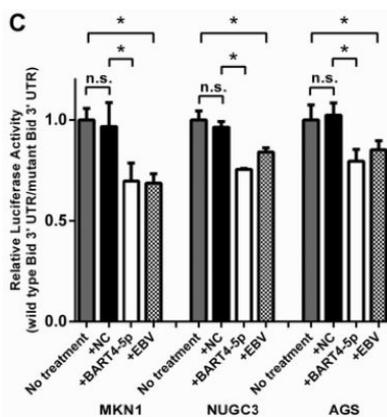


図 5

また、EBV 非感染株に ebv-miR-BART4-5p を導入することで Bid の発現が低下し (図 6)、さらに EBV 感染株において ebv-miR-BART4-5p を阻害することにより、部分的に Bid の発現が回復することが示された (図 7)。

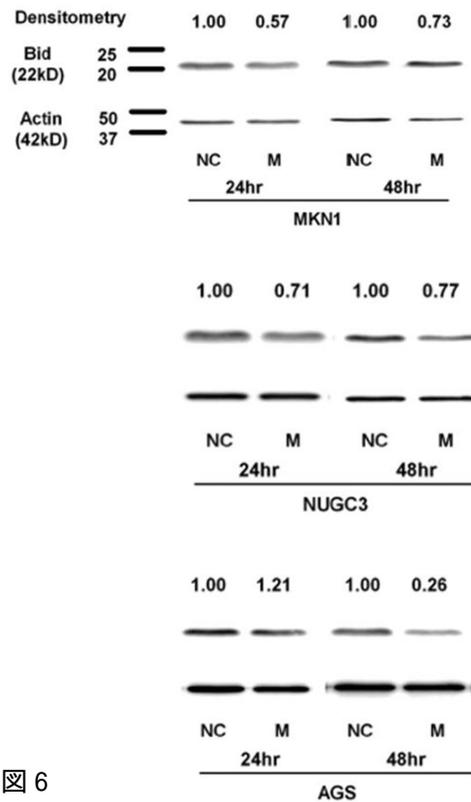


図 6

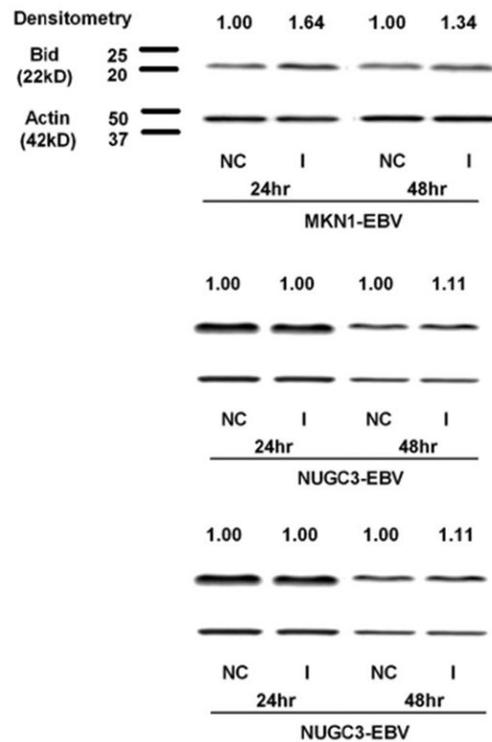


図 7

また、ebv-miR-BART4-5p の導入によりアポトーシスの頻度が低下することが明らかになった (図 8)。

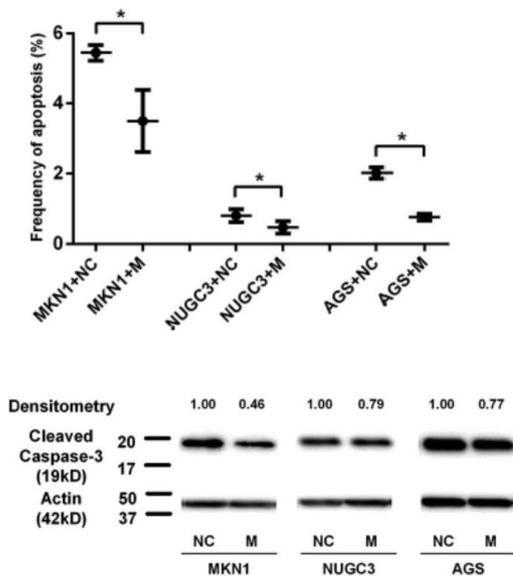


図 8

## 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)

Profiling of Virus-Encoded MicroRNAs in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Their Roles in Gastric Carcinogenesis.

Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Isogai M, Hibiya T, Ushiku T, Takada K, Fukayama M. *J Virol*. 2015 May 15;89(10):5581-91. 査読あり

Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review).

Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. *Int J Oncol*. 2015 Apr;46(4):1421-34. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

牛久綾, EBV 関連胃癌, 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Akiko Kunita, Aya Shinozaki-Ushiku, Hiroyuki Abe, Munetoshi Hinata, Masashi Fukayama, Epstein-Barr Virus-encoded MicroRNAs in Gastric Carcinoma, 第 5 回新学術領域発がんスパイラル国際シンポジウム, 2015 年 2 月 26 日~27 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

牛久綾, 国田朱子, 磯貝まや, 牛久哲男, 高田賢蔵, 深山正久, EBV 関連胃癌における

ウイルス由来 microRNA の発現およびその機能の解明, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24 日~26 日, ANA クラウンホテル広島 (広島県広島市)

国田朱子, 牛久綾, 阿部浩幸, 磯貝まや, 深山正久, Epstein-Barr Virus-encoded MicroRNAs in Gastric Carcinoma, 第 5 回新学術領域発がんスパイラル国際シンポジウム, 京王プラザホテル札幌 (北海道札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛久(篠崎)綾 (SHINOZAKI-Ushiku, Aya)  
 東京大学医学部附属病院 病理部 特任講師 (病院)

研究者番号: 60581824