

プレス通知資料（研究成果）



P-CREATE

次世代がん医療創生研究事業
Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

報道関係各位

平成29年6月22日

国立大学法人 東京医科歯科大学

国立大学法人 山梨大学

京都府立医科大学

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

がん転移に深くかかわる上皮間葉転換を制御するマイクロRNAの機能を解明 「マイクロRNAと抗がん剤併用による新規がん治療戦略への期待」

【ポイント】

- 上皮系マーカー遺伝子である *CDH1* (E-カドヘリン)を用いたレポーターシステムと 1,090 種類のマイクロRNA を搭載したマイクロRNA ライブラリーを組み合わせることで上皮間葉転換 (EMT)に関わる2種類のマイクロRNA (*miR-509-5p* と *miR-1243*)を同定しました。
- *miR-509-5p* と *miR-1243* は、それぞれ異なる経路で EMT を抑制することがわかりました。
- これらマイクロRNA を介して、EMT を抑制することで、隣がん治療で最も使用される抗がん剤のゲムシタビンの効果が上昇することがわかりました。
- 上記マイクロRNA の発現を調べることで、ゲムシタビンの効果を予測できる可能性があります。

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子細胞遺伝分野の村松智輝助教、稲澤譲治教授と京都府立医科大学大学院医学研究科消化器外科学 平本秀一大学院生、大辻英吾教授、ならびに、山梨大学医学部外科学講座第一教室 市川大輔教授らの研究グループは、独自のEMT可視化システムとマイクロRNAライブラリーを組み合わせることにより、上皮間葉転換 (EMT)を制御するマイクロRNA (miRNA)を同定しました。この研究は、文部科学省新学術領域研究 (15H05908)「がんシステムの新たな俯瞰と攻略」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)「次世代がん医療創生研究事業」(P-CREATE)などの支援のもと遂行され、その研究成果は、国際科学雑誌 *Scientific Reports* (サイエンティフィック リポーツ)に、2017年6月21日にオンライン版で発表されました。

【研究の背景】

がん転移は、予後不良の最たる原因であり、複雑かつ多段階のステップによって成立することがこれまでの研究から明らかになってきています。しかし、未だ不明な点が多く残されており、その分子機構の解明はがん治療薬開発における喫緊の課題です。がん転移のステップの一部としてよく知られているのが、上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) です。EMT は、上皮系の細胞が、間葉系形質を獲得する現象であり、間葉系形質を獲得したがん細胞は移動・浸潤能が亢進し、がん転移を起こしやすいと考えられています。EMT を促進する遺伝子や EMT とは逆方向の間葉系形質から上皮系形質へ誘導する (MET: Mesenchymal Epithelial Transition) 遺伝子も、数多く報告されており、その分子機構は徐々に解明されてきています。本研究では、独自に開発したレポーターシステム (EMT 可視化システム [図 1 A]) と 1090 種類のマイクロ RNA (miRNA) を搭載した miRNA ライブラリーを組み合わせた大規模 EMT 関連 miRNA スクリーニングを用いて、EMT 抑制性の miRNA を同定することを目的として解析を行いました。このレポーターシステムは、上皮系マーカー遺伝子である *CDH1* (E-カドヘリン) のプロモーター領域を蛍光タンパク質である GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子の上流に挿入することにより、*CDH1* の転写活性依存的に GFP が発現するものです。このシステムを用いることにより、EMT 変化を GFP の強度により可視化・定量化することが可能です。一方、miRNA とは、20-25 塩基程度の RNA であり、複数の標的遺伝子を持ち、標的遺伝子の 3' UTR (3' untranslated region) に結合し、翻訳または転写を抑制することが知られています。以前、研究グループでは、同 EMT 可視化システムと 470 種類の miRNA を搭載した miRNA ライブラリーを用いて EMT 抑制性の *miR-655* を同定しており (Harazono Y et al., PLoS One 2013)、本研究ではさらに多くの miRNA を対象に大規模スクリーニングを行いました。

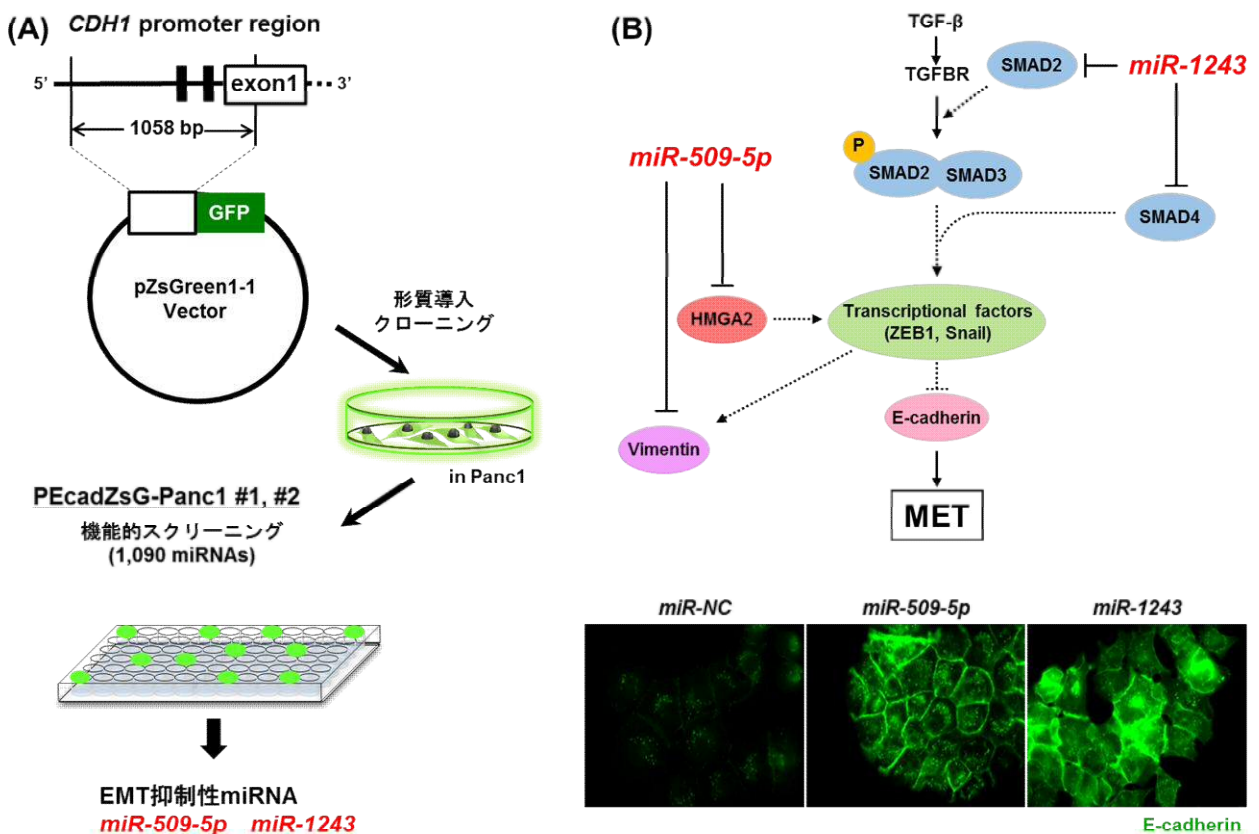


図1 (A) EMT可視化システムの概要 (B) *miR-509-5p*と*miR-1243*のEMT抑制シグナル経路

【研究成果の概要】

研究グループは、膵臓がん細胞株 (Panc1)を用いて EMT 可視化システムを構築し、1090 種類の miRNA をそれぞれ形質導入した後、GFP の蛍光強度を測定しました。また、EMT 可視化システムの構築に際しては、スクリーニング精度を向上させるため、2 つの独立した細胞を樹立しました。miRNA 導入後、細胞増殖を著しく阻害する miRNA は、候補 miRNA から除外しました。その結果、2 つの細胞株から共通して得られた EMT 抑制性候補 miRNA は、6 つに絞られました。その後、検証を重ね、最終的に EMT 抑制性 miRNA として *miR-509-5p* と *miR-1243* を同定しました。*miR-509-5p* は、EMT 促進性遺伝子として知られている HMGA2 や間葉系マーカー遺伝子である vimentin を直接翻訳抑制することによって MET を誘導します。一方、*miR-1243* は、EMT 誘導経路の代表と知られる TGF- β 経路の重要な構成因子である SMAD2, 4 を直接的に翻訳抑制することにより、METを引き起こします (図 1 B)。次に、EMT を起こした細胞は、抗がん剤に耐性を獲得することが知られているため、研究グループはこれら miRNA を細胞に導入した際に抗がん剤 (ゲムシタビン) の効果が上昇するかどうかの検討を行いました。その結果、それぞれの miRNA を導入後、ゲムシタビンの抗腫瘍効果を測定したところ、コントロール群に比べ、miRNA 導入群ではゲムシタビンの効果が増強されることがわかりました (図 2 A)。このことから、この 2 つの miRNA は、MET を促進させることにより、抗がん剤の感受性を高める効果があると考えられます。また、ヒト膵臓がん組織中における *miR-509-5p* の発現を検討したところ、発現の低い群に比べ発現の高い群では予後が良好であるということがわかりました (図 2 B)。

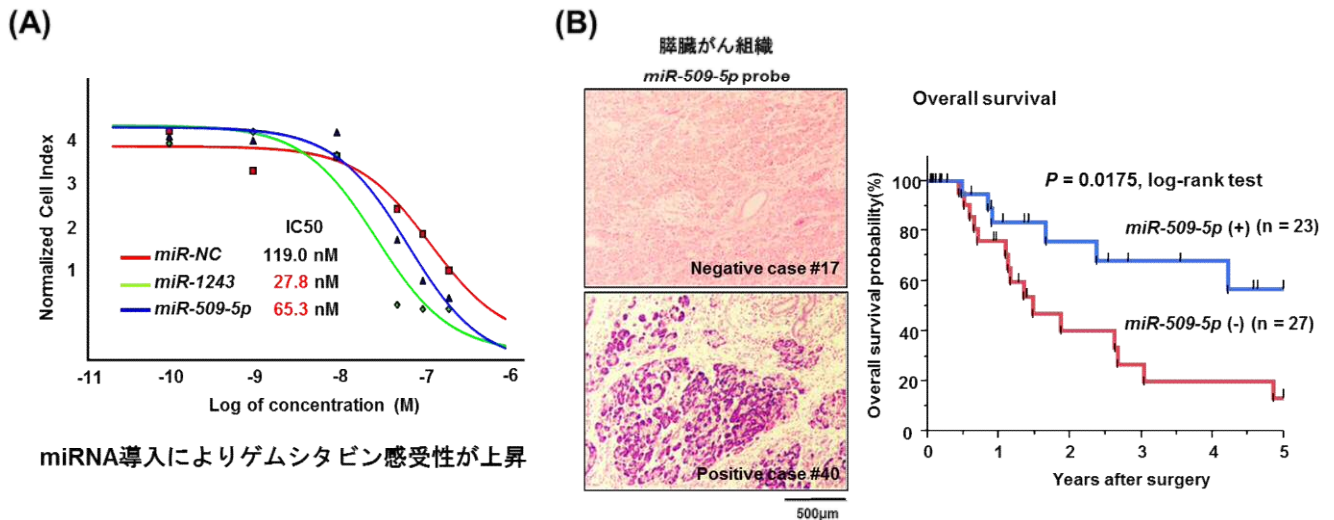


図2 (A) *miR-509-5p*および*miR-1243*導入によるゲムシタビン感受性の検討
(B) 膵臓がん組織中の*miR-509-5p*発現 (左)と生存曲線 (右)

【研究成果の意義】

本研究では、EMT 可視化システムと miRNA ライブラリーを組み合わせた大規模スクリーニングによって EMT 抑制性 miRNA である *miR-509-5p* と *miR-1243* を同定することができました。この EMT 可視化システムは、他の機能的ライブラリー (cDNA、siRNA、shRNA、化合物など)にも応用可能であり、EMT 分子機構の解明にとって有益なツールです。本研究で同定した *miR-509-5p* と *miR-1243* のがん組織中での発現を調べることにより、

予後のバイオマーカーとしてだけでなく、抗がん剤の効果を予測することができる可能性があります。また、上記 miRNA を対象とした核酸薬の開発が成されれば、がん組織中において上記 miRNA の発現がない場合においても、抗がん剤との併用治療を行うことにより、腫瘍抑制効果を増強できる可能性があります。

【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東京医科歯科大学大学難治疾患研究所
分子細胞遺伝分野 稲澤 譲治（イナザワ ジョウジ）
村松 智輝（ムラマツ トモキ）
TEL: 03-5803-5820 FAX: 03-5803- 0244
E-mail: johinaz.cgen@mri.tmd.ac.jp

京都府立医科大学大学院医学研究科
消化器外科学 大辻 英吾（オオツジ エイゴ）
平本 秀一（ヒラモト ヒデカズ）
TEL: 075-251-5527 FAX: 075-251-5522
E-mail: otsuji@koto.kpu-m.ac.jp

山梨大学医学部外科学講座第1教室
市川 大輔（イチカワ ダイスケ）
TEL・FAX: 055-273-7390
E-mail: dichikawa@yamanashi.ac.jp

<AMED 事業に関すること>

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)
戦略推進部 がん研究課
次世代がん医療創生研究事業担当
〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-7-1
TEL: 03-6870-2221 FAX: 03-6870-2244
E-mail: cancer@amed.go.jp

<報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係
〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45
TEL: 03-5803-5833 FAX: 03-5803-0272
E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp

京都府立医科大学広報センター
[事務局: 研究支援課] 担当 中尾
TEL: 075-251-5275 FAX: 同左
E-mail: kouhou@koto.kpu-m.ac.jp

山梨大学総務部総務課広報企画室
〒400-8510 山梨県甲府市武田 4-4-37
TEL:055-220-8006 FAX:055-220-8799
E-mail:koho@yamanashi.ac.jp