

次世代統合ゲノミクス解析による新時代を切り拓く消化器発癌研究と その革新的医療への実用化

札幌医科大学 医学部 内科学第一講座
山本 博幸

1. はじめに

本研究テーマでは、癌関連遺伝子の non-coding DNA 領域における遺伝子変異の役割と microRNA (miRNA)をはじめとする non-coding RNA の発現および発現調節異常を次世代統合ゲノミクス解析により明らかにし、これまで申請者が報告してきた coding 領域の遺伝子異常に関する知見 (Nature, Science, Nature Genetics 他)と統合し、遺伝子情報システムの時空間的制御機構の異常に基づく、消化器発癌進展の分子病態を解明することを目的とした。本報告書では、miRNA に関する研究成果を報告する。近年、癌において miRNA が重要な役割を担っていることが明らかにされ、注目されている¹⁾²⁾。miRNA は 22 塩基程度の短い non-coding RNA であり、相補的な標的 mRNA の主に 3' UTR に結合して翻訳阻害や mRNA 分解を誘導することで、標的遺伝子の働きを抑制する。癌では miRNA の発現プロファイルに大きな変化があり、癌遺伝子的あるいは癌抑制遺伝子的に機能する miRNA が多数存在すると考えられている。胃癌リスクの予測マーカーとなり得る miRNA 異常を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2-1. 胃癌細胞株の脱メチル化処理により発現誘導を受ける miRNA の網羅的解析。胃癌細胞株を 5-aza-2' -deoxycytidine (DAC) および DAC+ 4-phenylbutyrate (4-PBA) 処理した後、miRNA microarray analysis を用いて解析した。

2-2. mature miR-34b/c の発現を TaqMan MicroRNA Assays によって解析した。

2-3. 胃癌細胞株・組織における miR-34b/c の DNA メチル化を methylation specific PCR (MSP)、bisulfite pyrosequencing、bisulfite sequencing により解析した。

2-4. 胃癌細胞株に miR-34b、miR-34c の precursor を遺伝子導入し、細胞増殖に与える影響、遺伝子導入によって誘導される遺伝子発現プロファイルのグローバルな変化について oligonucleotide microarrays を用いて解析した。

3. 結果

3-1. 胃癌細胞株の脱メチル化処理による多くの miRNA の発現誘導

アレイ解析した 470 miRNAs のうち、AGS 細胞株の DAC 処理にて 48 miRNAs の発現亢進 (5倍以上)、DAC+PBA 処理にて 135 miRNAs の発現亢進 (5倍以上) を認めた。同様に MKN74 細胞株では、53 miRNAs、150 miRNAs の発現亢進を認めた。強い発現亢進を認めた miRNA の多くは、19 番染色体の miRNA cluster に位置していた。

発現亢進を認めた miRNA の中で、miR-34 family に注目した³⁾。miR-34 family の 3 メンバーともに p53 による直接的調節を受け、ヒト癌において癌抑制効果を示している。AGS、MKN74 細胞株ともに、miR-34b、

miR-34cの発現がDAC処理にて誘導された。両細胞株において、miR-34b、miR-34cの発現は、DAC+ PBA処理にて、より強く発現誘導された。

3-2. 胃癌細胞株におけるmiR-34b、miR-34cの発現低下

検討した全ての胃癌細胞株において、miR-34b、miR-34cの発現は正常胃組織に比べて、発現が低下していた。胃癌細胞株のDAC処理にて、miR-34b、miR-34cの発現は回復し、DAC+ PBA処理にて、より強く発現が誘導された。

3-3. 胃癌細胞株におけるmiR-34b/cのDNAメチル化

成熟miR-34b、miR-34cは、ひとつのprimary transcriptから生成される。miR-34bのproximal upstream regionのCpGアイランドは、プロモーター活性を有している。この領域のDNAメチル化が胃癌細胞におけるmiR-34b/cのサイレンシングに関わっているか解析した。MSPにより、多くの胃癌細胞株において、CpGアイランドがメチル化していることが明らかになった。bisulfite pyrosequencingにより、胃癌細胞株における高度のメチル化を認めたが、健常人の正常胃粘膜ではわずかのメチル化しか認めなかった。bisulfite sequencingでも同様に、胃癌細胞株における高度のメチル化を認めたが、健常人の正常胃粘膜ではわずかのメチル化しか認めなかった。

3-4. miR-34b/cの胃癌細胞株増殖抑制作用

MKN74、AGS、SNU638細胞株にmiR-34b、miR-34cのprecursorを遺伝子導入したところ、細胞の増殖が有意に抑制された。遺伝子導入細胞株において、miR-34sの標的として知られるhepatocyte growth factor receptor (MET)、cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)、cyclin E2 (CCNE2)の発現は、real-time RT-PCR解析でいずれも抑制されていた。METの発現抑制は、ウェスタンブロットでも確認された。

3-5. 胃癌細胞株におけるmiR-34b/cによる多数の遺伝子発現の変化

SNU638細胞株において、miR-34b/cの遺伝子導入によって誘導される遺伝子発現プロファイルのグローバルな変化についてoligonucleotide microarraysを用いて解析した。miR-34b発現により1,113 probe setsが発現低下(1.5倍以上)し、miR-34c発現により3,202 probe setsが発現低下していた。miR-34bとmiR-34cのホモロジーから、発現低下を認めた遺伝子に関して、有意なオーバーラップを認めた。多くの細胞周期関連遺伝子の発現低下を認めた。発現低下を認めた遺伝子には、gene ontology解析により、細胞周期遺伝子、mitosis遺伝子が最も多く含まれていた。

3-6. 胃癌組織におけるmiR-34b/cの高頻度なメチル化

bisulfite pyrosequencingにより、118例中83例(70%)で、高レベル(>15.0%)のmiR-34b/cメチル化を認めたが、H. pylori陰性の健常人の正常胃粘膜では、わずか(<15.0%)のメチル化しか認めなかった。つまり、miR-34b/cメチル化は、tumor-predominantな現象であると考えられた。bisulfite sequencingにより、上記の結果は検証された。miR-34b/cメチル化は、臨床病理学的因子との関連やp53遺伝子変異との有意な相関を認めなかった。

3-7. 胃癌組織におけるmiR-34b/cの発現低下

TaqMan RT-PCRによる発現解析では、正常胃粘膜と比べ、miR-34b/cメチル化陽性胃癌におけるmiR-34b/cの発現低下を認めた。in situ hybridizationによる発現解析において、miR-34bの発現は、隣接非癌組織において認め、胃癌組織においては低下していた。

3-8. 胃癌患者の非癌部胃粘膜におけるmiR-34b/cのメチル化

109例の胃癌患者(同時性あるいは異時性多発胃癌32例および単発胃癌77例)の非癌部粘膜および85例の健常人(H. pylori陽性78例、陰性7例)の胃粘膜を内視鏡的に胃体部および前庭部から採取し、

DNAを抽出、miR-34b/cメチル化を解析した。miR-34b/cメチル化は、*H. pylori*陽性で20.7%、*H. pylori*陰性で7.8%であった。従って、miR-34b/cメチル化は、*H. pylori*感染との関連が示唆された。癌患者の非癌部粘膜における平均miR-34b/cメチル化は、22.7%であった。多発胃癌症例と単発胃癌症例と比較すると、前者で27.3%と後者の20.8%より有意に高かった。両群の年齢に差があるため、年齢を調整して比較したところ、多発胃癌症例で有意にメチル化が高かった。

3-9. 非癌部胃粘膜における miR-34b/c メチル化は多発胃癌のリスクマーカーとなる

12例の単発胃癌および26例の多発胃癌症例それぞれの非癌部と癌部のmiR-34b/cメチル化を比較した。単発胃癌では、非癌部と癌部でメチル化レベルに差を認めなかった(22.1% vs 22.8%)が、多発胃癌では、非癌部(32.3%)に比べ、癌部(41.4%)でメチル化レベルが高かった。

非癌部粘膜におけるmiR-34b/cメチル化レベルを4群に分け、胃癌との関連を解析した。最も低レベル(<17%)のメチル化を示した群と比較し、最も高レベル(>25%)のメチル化を示した群は、胃癌全体との有意な相関を認めなかったが、多発胃癌との有意な相関を認めた(年齢調整オッズ比27.7%)。年齢、性別、*H. pylori*感染、胃炎の程度を調整して解析したところ、オッズ比はさらに高く、44.8%だった。従って、非癌部胃粘膜におけるmiR-34b/cのメチル化は、多発胃癌の独立したリスクファクターであることが示唆された。

ROC曲線解析を行ったところ、miR-34b/cメチル化は、多発胃癌の患者の胃粘膜と単発胃癌あるいは健康人の胃粘膜を区別可能であった。miR-34b/cメチル化の多発胃癌に対する最も区別可能なカットオフ値は23.1%(感度90.6%、特異度72.8%)であった。非癌部胃粘膜におけるmiR-34b/cメチル化は、胃癌の高リスク群のスクリーニングのマーカーとして有用であることが示唆された。

4. 考察

miR-34ファミリーはp53によって誘導され、METやCDK4などを標的とすることで癌抑制遺伝子的に機能することが知られている。本研究では、胃癌においてmiR-34b/cの発現が、転写開始点のCpGアイランド高メチル化によりサイレンシングされていることを明らかにした。さらにmiR-34b/c遺伝子のメチル化は*H. pylori*陽性の健康人胃粘膜からも検出されること、多発胃癌の背景胃粘膜からはより高レベルのメチル化が検出されることを明らかにした。これらの結果から、miR-34b/c遺伝子のメチル化は胃発癌の早期から生じる変化であり、かつ胃癌リスクの予測マーカーとなり得ることが示唆された。

今後は、本研究成果を基盤に、遺伝子情報システムの時空間的制御機構の異常に基づく、消化器発癌進展の分子病態をさらに解明し、革新的医療への実用化を展開していきたいと考えている。

5. 参考文献

- 1) Davalos V, Esteller M : MicroRNAs and cancer epigenetics : a macroevolution. *Curr Opin Oncol* 22 ; 35-45 : 2010
- 2) Melo SA, Esteller M : Dysregulation of microRNAs in cancer : Playing with fire. *FEBS Lett* 2010 [Epub ahead of print]
- 3) Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al : Epigenetic silencing of microRNA-34b_c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 68 ; 4123-4132 : 2008