

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23659327  
 研究課題名(和文) 炎症関連発がんにおける microRNA の役割とバイオマーカーとしての有用性の検討  
 研究課題名(英文) Roles of microRNA in inflammation-related carcinogenesis and its possibility for use as a biomarker  
 研究代表者  
 村田 真理子 (MURATA MARIKO)  
 三重大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号： 10171141

研究成果の概要(和文)：感染・炎症発がんのひとつのモデルとして Epstein-Barr (EB) ウィルス感染上咽頭癌について、microRNA の上咽頭癌発症への関与とスクリーニングのためのバイオマーカーとしての有用性について検討した。上咽頭癌と正常上咽頭の生検組織を用い microRNA マイクロアレイ解析を行い、有意に発現差のあった microRNA が検出された。一部の microRNA は組織レベルと血中レベルに正の相関を示し、上咽頭癌治療の新しいターゲットあるいはバイオマーカーへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma (NPC) is one of the inflammation-associated cancers. To explore the mechanisms of NPC development and certain biomarkers for screening, a microarray profiling survey was performed to reveal the expression patterns of microRNAs across primary tumors (NPC) and normal nasopharyngeal epithelia (NNE). Quantitative real-time PCR confirmed that expression levels of the microRNAs were significantly different between NPC and NNE tissues. Several microRNAs also have significant differences in plasma samples. Up- and down-regulated microRNAs may play a role in NPC development and there is a possibility to use as biomarkers and novel targets for NPC treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：環境衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：炎症、上咽頭癌、microRNA、ターゲット遺伝子、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

感染症および慢性炎症は全世界の発がん要因の約 25% を占めると推定されている (Schetter et al. Carcinogenesis, 2010)。感染症炎症関連発がんの分子機構の解明と早期発見の方法の開発は緊急に取り組むべき重要課題である。近年、遺伝子発現の制御要因としてエピゲノムの重要性が明らかになり、DNA のメチル化やヒストン修飾などに加えて、microRNA が注目されている。microRNA はタンパクをコードしない small RNA の一種で、成熟型では 20～22 ヌクレオチドから

成り、広く細胞に発現しており、多数の生体反応に影響している。microRNA は炎症のメディエーターとして自然・獲得免疫の両反応に関与し、さらに炎症関連発がんにおいても重要な役割を果たすことが明らかになりつつある (Davidson-Moncada et al. Ann NY Acad Sci 2010)。RNAs は生体内外にある RNA 分解酵素により容易に変性するが、リポタンパク膜に包まれた小胞(exosome)として細胞外に放出された microRNA は、安定に血中を循環しえることが見いだされている (Fleischhacker & Schmidt, BBA, 2007)。興

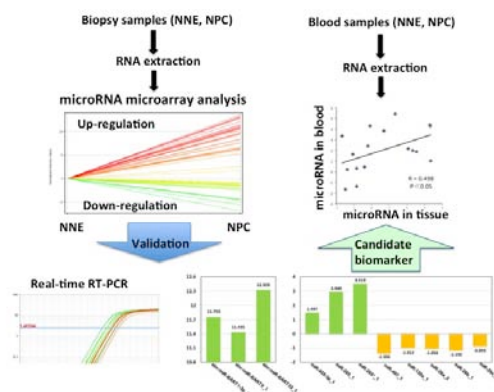
味深いことに、細胞から放出された **exosome** が別の細胞に取り込まれることにより、その中に含まれる **microRNA** が運ばれ(Skog, et al. Nat Cell Biol, 2008)、がん細胞から放出された **exosome microRNA** により、正常細胞にがん細胞の影響が及ぶというデータが出されている (Kosaka et al. JBC 2010)。これはがんの早期診断に血中の分泌型 **microRNAs** が利用できる可能性を示すものであり、がん予防戦略として非常に挑戦的である。

## 2. 研究の目的

本研究では感染・炎症発がんのひとつのモデルとして **Epstein-Barr (EB)** ウイルス感染上咽頭癌における **microRNA** の役割を中心に解析し、バイオマーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

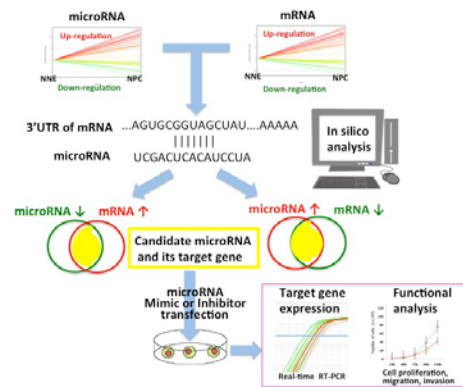
広西医科大学附属病院および医学研究センター上咽頭癌研究部の協力の下、インフォームド・コンセントの得られた上咽頭癌患者(NPC)および非癌患者(NNE)より血液および咽頭生検組織を採取した。生検試料より RNA を抽出し、**microRNA** および **mRNA** についてマイクロアレイ解析を行った。発現差の見られた **microRNA** および **mRNA** をリアルタイム PCR にて確認した。併せて、上咽頭上皮細胞培養細胞および上咽頭癌培養細胞を用いて **miRNA** 遺伝子発現の差異を観察した。血液試料より RNA を抽出し、候補 **microRNA** の検出を行った。



## 4. 研究成果

上咽頭癌と正常上咽頭の生検組織を用い **miRNA** マイクロアレイ解析を行い、有意に発現差のあった **miRNA** が検出された。定量的リアルタイム PCR により、有意に差がある **miRNA** を明らかにした。発現上昇の見られた **miRNA** のうち、**EBV** encoded **miR-BARTs** (**ebv-miR-BARTs**) は上咽頭癌

組織において非常に強く発現していた(日本環境変異原学会 2012 年 11 月、静岡において発表)。血液試料を用いてバイオマーカー候補として **miRNA** について発現量を検討しており、一部の **miRNA** は組織レベルと血中レベルに正の相関を示し、上咽頭癌治療の新しいターゲットあるいはバイオマーカーへの応用が期待できる(日本衛生学会 2013 年 3 月、金沢において発表)。さらに、**miRNA** の機能解析のため、**In silico** 解析によりターゲット遺伝子を探索し、**mRNA** マイクロアレイ解析結果と統合解析することによりターゲット遺伝子を絞り込んでいる。現在、**miRNA** の **mimic** あるいは **inhibitor** を上咽頭癌培養細胞にトランスフェクションし、細胞増殖や浸潤能への影響とターゲット遺伝子発現レベルの変動を検討している。



## 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 13 件)

1. Mo Y, Midorikawa K, Zhang Z, Zhou X, Ma N, Huang G, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Promoter hypermethylation of Ras-related GTPase gene **RRAD** inactivates a tumor suppressor function in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 323(2):147-54(2012). 査読有
2. Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitrate and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012:623019. (2012). 査読有
3. Thanan R, Ma N, Iijima K, Abe Y, Koike T, Shimosegawa T, Pinlaor S, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Kawanishi S. Proton pump inhibitors suppress iNOS-dependent DNA damage in Barrett's esophagus by increasing Mn-SOD expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 421(2):280-5. (2012). 査読有

4. Thanan R, Oikawa S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Pinlaor S, Pairojkul C, Wongkham C, Sripa B, Khuntikeo N, Kawanishi S, Murata M. Inflammation-induced protein carbonylation contributes to poor prognosis of cholangiocarcinoma. *Free Radic. Biol. Med.* 52(8):1465-72. (2012). 査読有
  5. Thanan R, Murata M, Ma N, Hiraku Y., Oikawa S, Hammam O, Wishahi M, El Leithy T, Kawanishi S. Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediat. Inflamm.* 2012: 165879. (2012). 査読有
  6. Thanan R, Ma N, Iijima K, Abe Y, Koike T, Shimosegawa T, Pinlaor S, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Kawanishi S. Proton pump inhibitors suppress iNOS-dependent DNA damage in Barrett's esophagus by increasing Mn-SOD expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421: 280-285 (2012). 査読有
  7. Huang S, Guo S, Guo F, Yang Q, Xiao X, Murata M, Ohnishi S, Kawanishi S, Ma N. CD44v6 expression in human skin keratinocytes as a possible mechanism for carcinogenesis associated with chronic arsenic exposure, *Eur. J. Histochem.*, (2012) 査読有
  8. Guo F, Ma N, Horibe Y, Kawanishi S, Murata M, Hiraku Y. Nitrate DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260(2):183-92. (2012). 査読有
  9. Murata M, Kawanishi S. Mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic arylamines. *Front Biosci.* 1(16):1132-43(2011). 査読有
  10. Ohnishi S, Saito H, Suzuki N, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi, S. Nitrate and oxidative DNA damage caused by K-ras mutation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413: 236-240 (2011). 査読有
  11. Huang Y-J, Zhang B-B, Ma N, Murata M, Tang A-Z, Huang G-W. Nitrate and oxidative DNA damage as potential survival biomarkers for nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol.* 28:377-84 (2011). 査読有
  12. Ma N, Thanan R, Kobayashi H, Hammam O, Wishahi M, Leithy TE, Hiraku Y, Amro el K, Oikawa S, Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. Nitrate DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with Schistosoma haematobium infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414: 344-349 (2011). 査読有
  13. Yata K, Oikawa S, Sasaki R, Shindo A, Yang R, Murata M, Kanamaru K, Tomimoto H. Astrocytic neuroprotection through induction of cytoprotective molecules; a proteomic analysis of mutant P301S tau-transgenic mouse. *Brain Res.* 1410: 12-23. (2011). 査読有
- [学会発表] (計 22 件)
1. 村田真理子. シンポジウム 2 健康長寿社会における学会活動の方向性、がんとエピジェネティクス、第 83 回日本衛生学会総会、金沢市、2013 年 3 月 24~26 日
  2. Umawadee Laothong, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata, Somchai Pinlaor. Melatonin protects against *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma and liver injury in hamsters. 第 83 回日本衛生学会総会、金沢市、2013 年 3 月 24~26 日
  3. Shumin Wang, Yingxi Mo, Kaoru Midorikawa, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Identification of dysregulated microRNA in nasopharyngeal carcinoma. 第 83 回日本衛生学会総会、金沢市、2013 年 3 月 24~26 日
  4. Bo Hou, Yingxi Mo, Zhe Zhang, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kaoru Midorikawa, Mariko Murata. Up-regulation of GLRX3 is associated with invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma. 第 83 回日本衛生学会総会、金沢市、2013 年 3 月 24~26 日
  5. Feiye Guo, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Yusuke Hiraku. Nitrate DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube in cultured cells: a comparison with oxidative DNA damage. 第 83 回日本衛生学会総会、金沢市、2013 年 3 月 24~26 日
  6. 平工雄介、Feiye Guo、馬寧、川西正祐、村田真理子. 多層カーボンナノチューブによる DNA 損傷：肺上皮細胞における 8-ニトログアニン生成. 第 12 回分子予防環境医学研究会、つくば市、2013 年 2 月 1~2 日
  7. 王淑民、莫穎禧、翠川薫、張哲、黄光武、馬寧、平工雄介、及川伸二、村田真理子. 上咽頭癌における microRNA 調節異常の検討. 第 41 回日本環境変異原学会、静岡市、2012 年 11 月 29~30 日
  8. 大西志保、馬寧、タナン レイヌー、小林 果、平工雄介、及川伸二、村田真理子、川西正祐. ビルハルトツ住血吸虫感染による膀胱癌における DNA 損傷と幹細胞マーカー. フォーラム 2012 衛生薬学・

- 環境トキシコロジー、名古屋市、2012年10月25~26日
9. 村田真理子, 平工雄介, 及川伸二, タナン レイヌー, ピラオール ソムチャイ, 馬寧, 川西正祐. バレット食道におけるプロトンポンプ阻害剤の Mn-SOD 発現を介した DNA 損傷への効果. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋市、2012年10月25~26日
  10. 平工雄介, Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子. カーボンナノチューブによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋市、2012年10月25~26日
  11. 平工雄介, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子. Association of asbestos fiber contents with oxidative and nitrative DNA damage in human lung. 第71回日本癌学会総会、札幌市、2012年9月19~21日
  12. Yingxi Mo, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Xiaoying Zhou, Guangwu Huang, Zhe Zhang, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Genome-wide DNA methylation study of nasopharyngeal carcinoma in Chinese patients with Epstein-Barr virus infection. 第71回日本癌学会総会、札幌市、2012年9月19~21日
  13. Feiye Guo, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Yusuke Hiraku. Nitrative DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube with different lengths in cultured cells. 第71回日本癌学会総会、札幌市、2012年9月19~21日
  14. Shumin Wang, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ying Xie, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Mariko Murata. Stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with SDF-1 in nasopharyngeal carcinoma. 第71回日本癌学会総会、札幌市、2012年9月19~21日
  15. 大西志保, 村田真理子, 川西正祐. 食品に含まれる有効成分の安全性評価: 酸化促進作用による DNA 損傷性とエストロゲン感受性乳癌細胞の増殖促進作用. 日本社会薬学会第31年会、鈴鹿市、2012年9月15~16日
  16. Yingxi Mo, Ning Ma, Shumin Wang, Zhe Zhang, Ying Xie, Guangwu Huang, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Cytosine methylation in EBV-mediated nasopharyngeal carcinoma in relation to nitrative stress. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Edinburgh, UK, 2012年7月22~26日
  17. Yusuke Hiraku, Kiyoshi Sakai, Eiji Shibata, Michihiro Kamijima, Naomi Hisanaga, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Nitrative DNA damage in human lung tissues in association with asbestos exposure. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Edinburgh, UK, 2012年7月22~26日
  18. Ning Ma, Shiwen Huang, Feiye Guo, Songchao Guo, Mariko Murata, Shosuke Kawanishi. Arsenic-induced nitrative DNA damage in human HaCaT keratinocytes. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Edinburgh, UK, 2012年7月22~26日
  19. Feiye Guo, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Yusuke Hiraku. Nitrative DNA damage in human lung epithelial cells treated with multi-walled carbon nanotube. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Edinburgh, UK, 2012年7月22~26日
  20. Raynoo Thanan, Shinji Oikawa, Puangrat Yongvanit, Yusuke Hiraku, Ning Ma, Somchai Pinlaor, Chawalit Pairojkul, Chaisiri Wongkham, Banchob Sripa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Protein carbonylation in liver fluke-induced cholangiocarcinoma in relation to poor prognosis. Mahidol International Conference on Infection and Cancer. Bangkok, Thailand 2012. February 6-8.
  21. Raynoo Thanan, Mariko Murata, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi. Parasite infection induces oxidative/nitrative DNA damage in stem-like cells in relation to carcinogenesis. 第70回日本癌学会総会、名古屋市、2011年10月3~5日
  22. 中村朱里, 翠川薫, 平工雄介, 及川伸二, 福原潔, 川西正祐, 村田真理子. 乳癌治療薬タモキシフェンによる子宮内膜発がん機構の検討. 第81回日本衛生学会総会、東京、2011年3月25~28日
- 〔図書〕 (計1件)
1. Ma N, Murata M, Ohnishi S, Thanan R, Hiraku Y, Kawanishi S. 8-Nitroguanine: A potential biomarker to evaluate the risk of inflammation-related carcinogenesis. In: *Biomarker*. Khan TK (ed.). InTech, 201-224 (2012)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 真理子 ( MURATA MARIKO )  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号： 10171141

### (2) 研究分担者

翠川 薫 ( MIDORIKAWA KAORU )  
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ  
アソシエイト  
研究者番号： 20393366