

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08307

研究課題名(和文) miR449aによるがん抑制の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of miR449a to inhibition of tumorigenesis

研究代表者

西田 純 (NISHIDA, Jun)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：00361981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAとNotchシグナルは腫瘍形成や細胞分化に関わっているが、Notchを介したマイクロRNAの発現のそれらに対する役割は未だ不明である。私達はNotchシグナルにより制御されるマイクロRNAであるmiR449aを同定した。miR449a欠損マウスにAOM/DSSを投与すると腸上皮細胞の分裂や大腸がんの発生が野生型に比べ増加した。大腸がん患者においてもmiR449a発現とがん悪性度とは負の相関が見られた。miR449a欠損マウスの大腸がん組織ではがん抑制遺伝子MLH1の発現が野生型に比べ低下していた。これらはmiR449aが腸上皮細胞分裂を制御し大腸がん形成抑制に働く事を示唆する。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs and Notch signaling control cell differentiation and tumorigenesis. However, the mechanisms through which Notch mediates microRNA expression are still unclear. We found that miR449a was indirectly regulated by Notch signaling. Although miR449a-deficient mice did not show any Notch-dependent defects in immune cell development, treatment of miR-449a-deficient mice with azoxymethane and dextran sodium sulfate increased the numbers and sizes of colon tumors and intestinal epithelial cell proliferation. In patients with colon cancer, miR-449a expression was inversely correlated with histological scores and was positively correlated with the expression of MLH1. Colon tissues of miR-449a-deficient mice showed reduced MLH1 expression compared with those of wildtype mice. Thus, these data suggested that miR-449a acted as a key regulator of colon tumorigenesis by controlling the proliferation of intestinal epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：マイクロRNA がん

1. 研究開始当初の背景

Notch は生体の発生や細胞分化に機能しているシグナル分子群である。私達は Notch シグナルが制御するマイクロ RNA を検索し、miR449a を見いだした。近年の研究から、miR449 の発現とがん発生の関連がいくつか報告されている。例えば、肺がんや胃がん患者のがん組織において miR449 の発現量が正常組織に比べ低下しており、その発現量ががんの悪性度と相関している事が明らかとされた。また、これらの報告では、in vitro の解析により miR449 が p53 経路の活性化を引き起こす事、また、サイクリン依存キナーゼ 6 の発現調節を行っている事が明らかにされ、miR449 の発現低下がアポトーシスの阻害や細胞分裂異常を引き起こし、がん発生に関与する事が示唆された。しかしながら、これらの報告は in vitro の解析を基にしたものであり、miR449a が生体内でがん化に関与しているかは未だ不明であり、その分子メカニズムも明らかになっていない。

2. 研究の目的

miR449a は数多くある microRNA の一つであるが、胃がんや肺がんにおいてその発現が低下している事が報告されている。しかし、miR449 とがんの発症、悪性化の分子メカニズムはほとんどわかっていない。そこで本研究では miR449a が関与するがん抑制機構について、miR449a 欠損マウスを用いて分子レベルで明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

大腸がん患者組織における miR449a の発現解析

miR449a 欠損マウスにおける、アゾキシメタン (AOM)/DSS 誘導性大腸がんモデルを用いた解析

AOM/DSS 誘導性大腸がん組織を用いた RNA マイクロアレイ解析

miR449a 欠損による免疫系細胞への影響

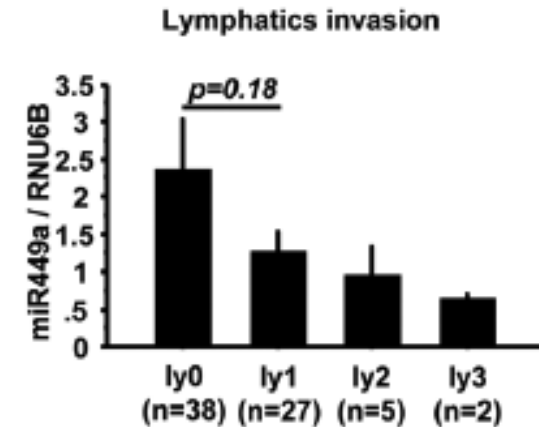
miR449a 発現調節機構の解析

4. 研究成果

大腸がん患者組織における miR449a の発現解析

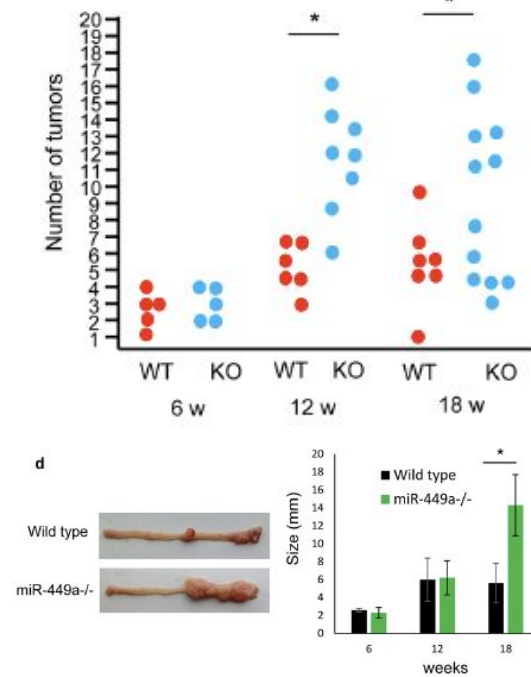
私達は大腸がん患者のがん組織における miR449a の発現を解析した。その結果、前述の報告と同様に悪性度が高いがんで、miR449a の発現が低下している事が明らかとなった。さらに、がん部における miR449a の発現量と患者の予後の関連を調べたところ、miR449a が低発現であった

がん患者は予後が不良であった。

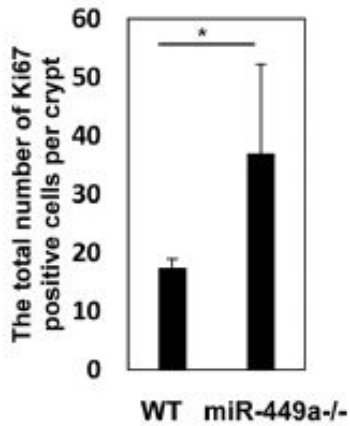
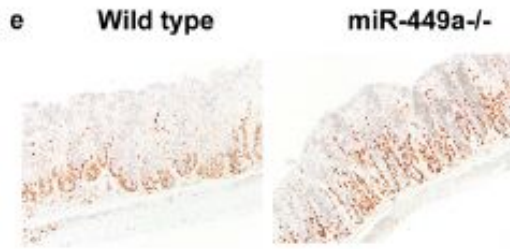


miR449a 欠損マウスにおける、アゾキシメタン (AOM)/DSS 誘導性大腸がんモデルを用いた解析

私達は miR449a 欠損マウスを樹立し、AOM/DSS 誘導性大腸がんモデルを用い、miR449a とがん化の関連について解析をした。その結果、miR449a 欠損マウスでは野生型マウスに比べ多くの大腸がんが発生し、そのサイズも大きかった。



更なる解析の結果、AOM/DSS 処理した miR449a 欠損マウスでは大腸上皮細胞の増殖が促進される事を明らかにした。

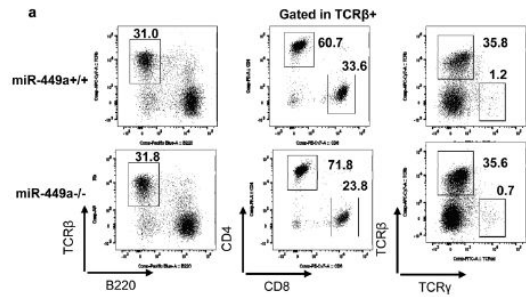


AOM/DSS 誘導性大腸がん組織を用いた RNA マイクロアレイ解析

さらに、AOM/DSS 誘導性大腸がん組織を回収し、RNA マイクロアレイ解析を行った結果、miR449a 欠損マウス大腸がん組織ではがん抑制因子 MLH 1 の発現が野生型と比べ 25%程度まで低下していた。マウス大腸癌細胞株 CT26 に miR449a を強制発現させると MLH 1 の発現の低下が見られた。これらの事から miR449a はがん関連遺伝子の発現を調節する事により細胞のがん化の抑制に働く事が示唆された。

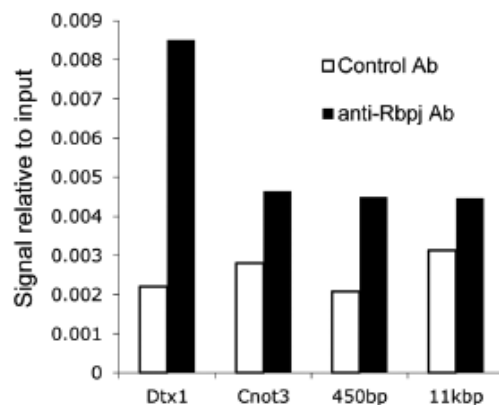
miR449a 欠損による免疫系細胞への影響

がんが発生し増殖していく過程において、免疫系細胞はそれを抑制するように働く。そこで、miR449a の免疫系細胞の分化への影響を解析した。野生型及び miR449a 欠損マウスの脾細胞を調製し、それらに含まれる T 細胞、B 細胞、NK 細胞の割合を解析した。さらに、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、辺縁帯 B 細胞、樹状細胞などについても解析した。しかしながら、それら細胞について野生型と miR449a 欠損マウスの間に有為な差は認められなかった。また、血清中に含まれるイムノグロブリンの量についても解析を行ったが、両者に有為な差は認められなかった。これらの事から miR449a の欠損は免疫系細胞の分化には大きな影響を及ぼさない事が示唆された。



miR449a 発現調節機構の解析

miR449a は CDC20B の第二イントロンに存在する。そこで、CDC20B のプロモーター領域の解析を行った。miR449a は Notch シグナルによって発現が制御され、CDC20B プロモーター領域には Notch による転写制御を司る転写因子 Rbpj の結合配列が転写開始点上流約 450bp 及び 11kbp に存在する。そこで、ChIP アッセイにより Rbpj がそれら結合配列に結合しているかを解析した。マウス脾細胞を調製し、1% パラホルムアルデヒドで固定後ソニケーションにより DNA を断片化し、抗 Rbpj 抗体を用い免疫沈降を行った。得られたサンプルに含まれる結合領域ゲノム DNA をリアルタイム PCR により検出した結果、それら結合配列への Rbpj の結合は認められなかった。この結果より、Notch/Rbpj 複合体は直接 miR449a の発現調節をしている訳ではなく、他の因子を介して調節している可能性が示唆された。



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 1件)

MicroRNA-449a deficiency promotes colon carcinogenesis
 Masanori Niki, Kohei Nakajima, Daichi Ishikawa, Jun Nishida, Chieko Ishifune, Shin-ichi Tsukumo, Mitsuo Shimada, Shinji Nagahiro, Yoshinori Mitamura & Koji

Yasutomo
Scientific Reports vol.7:10696 1-10 (2017)
7) 査読有 DOI:10.1038

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

西田 純(Nishida, Jun)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：00361981

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()