

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590363

研究課題名（和文） がん関連遺伝子の発現制御に関わる microRNA の影響

研究課題名（英文） Alterations of microRNA associated with cancer-related genes

研究代表者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：10326647

研究成果の概要：近年、蛋白質をコードしない遺伝子(non-coding RNA ; ncRNA)が機能的 RNA として振る舞うことが注目されている。特に miRNA は、全蛋白質の 10-30%程度を制御下にしているとの試算もなされている。miRNA は genetic/epigenetic 以外の第三の遺伝子制御機構として、細胞特異的な遺伝子発現に関与している可能性がある。本研究では、複数の癌腫において、生物学的特性の形成に重要な miRNA の発現異常を解析した。甲状腺癌では、未分化癌における miR-138 の極端な発現低下が確認された。miR-138 の発現低下は hTERT 遺伝子産物の発現を誘導し、甲状腺未分化癌のアグレッシブな生物学的特性を反映するものと考えられた。また、約半数の骨肉腫で、miR-127 の発現低下が認められた。miR-127 の発現低下は BCL6 の過剰発現を誘導した。miR-127 はエピジェネティックな発現の制御を受けており、miR-127 の発現低下により誘導された BCL6 陽性骨肉腫では、予後不良の傾向にあった。悪性黒色腫では miR-211 の発現低下が認められ、これは cancer-testis antigen である PRAME の発現を誘導していた。PRAME 遺伝子産物は白血病では免疫療法の標的遺伝子ともなっており、治療戦略への応用も考えられた。また当所目的で掲げた maspin 遺伝子の aberrant は発現に関与する miRNA の特定には至らなかった。悪性腫瘍には組織型毎に特徴的な miRNA のプロファイルを示し個々の癌腫の生物学的特性の形成に役立っている。本研究で特定された miRNAs は今後個々の癌腫の治療戦略を考える上に重要な情報を供与するものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：microRNA, がん遺伝子, がん抑制遺伝子, エピゲノム

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

分化した細胞では、複数の遺伝子の中から特定の遺伝子セットのみを発現させ、組織・器官を形成し、生体の恒常性を維持している。この細胞特異的な遺伝子発現の破綻は、細胞単位での恒常性を喪失させ、細胞の化生・脱分化の誘導につながり、時には発がんのイニシエーションとなる可能性さえある。細胞特異的な遺伝子発現の制御機構を解明することは、細胞の分化・脱分化の誘導による悪性腫瘍の克服や再生医療の開発につながる重要な研究領域と位置づけられる。

我々はこれまでに、化生粘膜上皮や異型性病変で aberrant に発現する蛋白質に注目し、エピジェネティックな異常と化生・異型性病変の発生が密接な関連を持つことを *in vitro*, *in vivo* で明らかにしてきた。しかし、aberrant に発現している個々の蛋白質について、多数の細胞株や生体材料で検討を進めると、genetic/epigenetic な発現制御機構の破綻だけでは説明のつかない事象に、しばしば遭遇する。これらの事象の説明には、DNA→RNA→蛋白質というセントラルドグマ以外の機構の破綻している可能性を考える必要がある。

近年、蛋白質をコードしない遺伝子(non-coding RNA ; ncRNA)が機能的 RNA として振る舞うことが注目されている。特に 22 nt 程の microRNA (miRNA)は、mRNA の 3' -UTR と会合することを通して蛋白質への翻訳を抑える働きを持つことが明らかとなった。全蛋白質の 10-30%程度が miRNA の抑制機構の制御下にあるとの試算もなされている。miRNA は genetic/epigenetic 以外の第三の遺伝子制御機構として、細胞特異的な遺伝子発現に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで我々が精力的に解析を行ってきた 2 種類のがん関連分子(hTERT, maspin)に着目し、miRNA による遺伝子産物の発現抑制機構の解析を行う。

3. 研究の方法

本研究は、3段階の構成で展開された。STEP1は、miRNA microarrayを用いた、培養細胞株での網羅的miRNAの発現解析を行った。計画段階の癌腫と若干異なり、甲状腺癌、骨肉腫、悪性黒色腫について行った。STEP2は、特定された癌種特異的変動miRNAの標的遺伝子解析を行った。STEP3は、hTERT

および maspin遺伝子の発現制御に関わる miRNAの解析に特化して行った。

(1) miRNA microarray.

TRIZOL による各種培養細胞株から total RNAを抽出して、Ambion社製の microarrayを用いて網羅的解析を行った。各々正常初代培養細胞株と比較して、2倍以上の発現増強、1/2以下の発現低下を有意とした。

(2) real-time PCR 法による miRNA の定量

ABI社製の TaqManmicroRNA early access kitを用いて 157 miRNAについて解析した。必要に応じて興味ある miRNAについては解析を行った。U6の発現を内部標準として、 $\Delta \Delta ct$ 法を用いて計算し、2倍以上の発現増強、1/2以下の発現低下を有意とした。

(3) miRBase による標的遺伝子予測

miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>)を用いて 3' 非翻訳領域に結合する遺伝子予測を行った。

(4) 標的遺伝子に対する miRNA の発現抑制効果の検証。

pMIR-REPORT™ Luciferase assay system (Ambion)を用いて、3' UTRとの結合、蛋白質の発現抑制効果を定量した。Dual-light Luciferase system (ABI)で導入効率の補正を行った。標的遺伝子の発現は、miRNAを lipofectionあるいは electroporationし real-time PCR法および western blot法で確認した。

4. 研究成果

(1) 甲状腺末分化癌における解析

甲状腺末分化癌と乳頭癌間で differential に発現している miRNA の特定を試みた。miR-138 は甲状腺末分化癌で有意に発現低下が認められた。miRBaseにより、miR-138 は hTERT の 3' 非翻訳領域に結合することが予測されたため、reporter assayを行って、その結合および蛋白発現抑制効果を確認した。また miR-138 以外に、miRBaseによって hTERT の 3' 非翻訳領域に結合することが予測された 11 種類の miRNA は甲状腺末分化癌で発現低下していることが確認された。甲状腺末分化癌では miR-138 を初めとした複数の miRNA の発現低下が hTERT の発現誘導に関与していることが示された。

また、miRBase 予測により miR-138 は

VEGF の発現抑制にも関与している可能性が示唆されたため、細胞生物学的に解析を行ったが明らかな関係は認められなかった。

(2) 骨肉腫における解析

骨肉腫培養細胞株と正常骨芽細胞株間で differential に発現している miRNA の内、半数の骨肉腫培養細胞株で発現の低下している miR-127 に着目した。

miRBase 予測により、miR-127 は BCL6 を標的としている可能性が示唆された。reporter assay ならびに transfection assay を用いて miR-127 が BCL6 の発現制御に関与していることを明らかにした。一方、miR-127 は epigenetic な発現制御を受けることが報告されていたので、脱メチル化剤/脱アセチル化剤処理を行い、発現変動を確認した。また、プロモーター領域の DNA メチル化状態も解析した。miR-127 は epigenetic な発現制御を受けていたもののプロモーター領域のメチル化による直接的な制御ではなかった。

さらに骨肉腫原発巣では、約半数で BCL6 の過剰発現例がありこれらの予後は有意に不良であった。miR-127 は骨肉腫の生物学的特性の形成に関与している可能性が示唆された。

(3) 悪性黒色腫における解析

悪性黒色腫と正常ヒト表皮 melanocyte 初代培養株間で differential に発現している miR-211 に着目した。miRBase 予測により、miR-211 は cancer-testis antigen である PRAME を標的としている可能性が示唆された。reporter assay ならびに transfection assay を用いて miR-211 が PRAME の発現制御に関与していることを明らかにした。PRAME は retinoic acid receptor (RAR) を標的にしてがんの生物学的特性の形成に関与している可能性が報告されていたので、miR-211 過剰発現した時の RER α 、RER β の発現も検討した。RER α 、RER β は PRAME の低下に伴い、過剰発現がみられ間接的に制御を受けていることが示された。

(4) maspin の発現制御に関わる miRNA

当所目的で掲げた maspin 遺伝子を標的とした 5 種類の miRNA について reporter assay ならびに transfection assay を行った。しかし、maspin の aberrant は発現に関与する miRNA の特定には至らなかった。

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 6 件)

1. Sakurai E, Maesawa C, Oikawa H, Akasaka K, Tsunoda K, Miyamoto A, Muraoka S, Tada H, Takahashi K, Kudo K, Akasaka T, Tomoyuki Masuda. Down-regulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in melanoma cells, *Br J Dermatol*, in press.
3. Masuda S, Maesawa C, Nagata Y, Nishida J, Satoh T, Tada T, Sakurai E, Miyamoto A, Muraoka S, Shoji Kanno S, Naraba H, Kitagawa T, Shimamura T, Kudo K, Yonezawa Y, Masuda T. Down-regulation of microRNA-127 is associated with overexpression of BCL6 protein in osteosarcoma cells. *Lab Invest*, in press.
4. Nagata Y, Maesawa C, Tada H, Takikawa Y, Yashima-Abo A, Masuda T. Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. *Int J Mol Med* 2009;**24**:35-43.
5. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2009;**39**:359-67.
6. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibasaki M, Yashima-Abo A, Kotani K, Oikawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2008;**99**:280-6.

[学会発表] (計 4 件)

1. Maesawa C, Masuda S, Masuda T. Down-regulation of microRNA-127 is associated with overexpression of BCL6 protein in osteosarcoma cells. 第

- 66回日本癌学会総会, 2007, 10 横浜
2. Ogasawara S, Maesawa C, Tomisawa Y, Iwaya T, Nishizuka S, Matsuo T, Yamamoto M, Masuda T, Wakabayashi G. Expression of markers of progenitors in thyroid cancer. 第66回日本癌学会総会, 2007, 10 横浜
 3. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawa S, Wakabayashi G, Masuda T : Down-regulation of miRNA-138 is associated with overexpression of hTERT protein in anaplastic thyroid carcinoma. 第66回日本癌学会総会 ; 2007 ; 横浜
 4. 前沢千早, 櫻井英一, 赤坂季代美, 増田友之. 悪性黒色における癌精巣抗原PRAMEの発現に関わるmiR-211の役割. 第97回日本病理学会総会 ; 2008 ; 金沢.

6. 研究組織

(1)研究代表者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10326647

(2)研究分担者

若林 剛 (WAKABAYASHI GO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 50175064

(3)連携研究者