

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790555

研究課題名(和文) 「microRNA 調節化学予防法」の開発

研究課題名(英文) Development of “microRNA-regulating chemoprevention”

研究代表者

友杉 充宏 (TOMOSUGI MITSUHIRO)

京都府立医科大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：60533429

研究成果の概要(和文)：

miR-34a は癌抑制的に働く microRNA である。既知の癌予防食品成分から miR-34a 発現を調節している物質を見つけるため、様々な食品成分を使用し、RB 失活癌細胞に対して G1 期における細胞周期停止を促す物質の探索を行った結果、いくつかの食品成分を見いだした。

これらの候補物質の中から、リアルタイム PCR を用いて実際に miR-34a 発現量を測定することで、miR-34a 発現上昇を誘導する物質としてフラボンを見いだした。また、miR-34a ターゲットタンパク質の減少をウエスタンブロットで確認し、miR-34a 発現上昇との関係を検証した。

これらの結果から、食品成分による生体内 microRNA の調節は可能であると考えられる。さらに、フラボンによる癌細胞増殖抑制効果における miR-34a の関与の程度を調べることで、「microRNA 調節化学予防法」の実現が充分期待出来る。

研究成果の概要(英文)：

miR-34a is a tumor suppressor microRNA. I searched for the food components that regulated miR-34a expression. As a result from flow cytometry analysis, several kinds of materials inducing G1 arrest were found, using RB inactivated cancer cells.

Real-time PCR specified flavone that induced miR-34a expression from candidate materials. In addition, decrease in target proteins of miR-34a was confirmed by Western blot analysis.

These results suggested that food component could control expression of microRNA in vivo. The research of miR-34a regulated by flavone might realize “microRNA-regulating chemoprevention”

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：癌、microRNA、予防法開発、細胞周期停止、RB

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の根絶が叫ばれ続けながら、実際の死亡率減少の達成が難しい今現在において、斬新かつ有効な癌予防法の開発は目下の急務である。

近年、microRNA という全く新しい概念に属する分子群が、種々の病態において極めて重要な役割を持つことが明らかにされてきた。microRNA とは細胞内に存在する長さ 20~25 塩基程度の 1 本鎖 RNA のことであり、標的となる遺伝子の発現を翻訳抑制する機能を有すると考えられているノンコーディング RNA の 1 種である。最近では発癌制御に関与し、重要な機能を果たすことがわかってきている。

今日までの分子を標的とした癌予防法において、発癌に密接に関与する microRNA をターゲットとする癌予防に関する研究報告は皆無である。これらのことから、最も重要な癌抑制遺伝子である p53 により活性化される microRNA である miR-34a を標的とした新規癌予防法に関する研究を行うことが新たな癌予防戦略として重要であると考えた。

2. 研究の目的

1. の背景から、本研究では癌抑制的に働く microRNA の発現を調節する新規癌予防物質を、食品成分から同定することで、より有効な癌予防物質を見だし、全く新規な視点からの癌予防法の開発を目的とした。

あらゆる悪性腫瘍の約半数において失活しているとされている最も代表的な癌抑制遺伝子 p53 により発現が上昇する microRNA である miR-34a を活性化する因子を食品由来成分から探索する。

癌により p53 が失活すると、本来発現が増強されている miR-34a の発現が低下し、細胞周期調節機構 RB/E2F 経路の不活性化がおり、細胞増殖が促進され発癌に至る。そこでその段階において探索した食品由来の癌予防物質により miR-34a の発現を上昇させることで RB/E2F 経路の再活性化を促し、発癌予防を行う。

3. 研究の方法

「miR-34a 発現上昇を促す食品成分のスクリーニング」

miR-34a に依存した G1 期における細胞周期停止を効率よく見極めるため、p53 および RB 失活癌細胞（ヒト前立腺癌細胞 DU145）を用いることでスクリーニングを行った。その方法として WST-8 アッセイによる細胞増殖抑制効果を調べた後、当該効果の詳細をフローサ

イトメトリーによって解析した。

「miR-34a ターゲットタンパク質の解析」

細胞周期解析結果から、細胞周期停止関連タンパク質の挙動および、miR-34a ターゲットタンパク質の挙動をウエスタンブロット分析によって調べた。

「リアルタイム PCR」

ウエスタンブロット分析結果から、量的変化をみせたタンパク質の mRNA 解析を行った。また、実際の miR-34a 発現量も測定した。

「miR-34a プロモーターの構築」

miR-34a 発現上昇を促す新たなスクリーニング方法確立のため、microRNA がプロモーターレベルで発現調節を受けていることを利用し、miR-34a プロモーター予測配列を増幅させ、ルシフェラーゼ上流に組み込んだレポータープラスミドを作製した。これを用いたルシフェラーゼアッセイによって、ルシフェラーゼの活性値を減少させる物質の探索を開始した。

4. 研究成果

「miR-34a 発現上昇を促す食品成分のスクリーニング」

様々な食品成分および、薬剤を用いて WST-8 アッセイを行った結果、数種類の細胞増殖抑制効果をもつ物質を見いだした。

さらに、それらの化合物を用いてフローサイトメトリー解析を行い、G1 期細胞周期停止を誘導する物質としてフラボンを見いだした（図 1、2）。

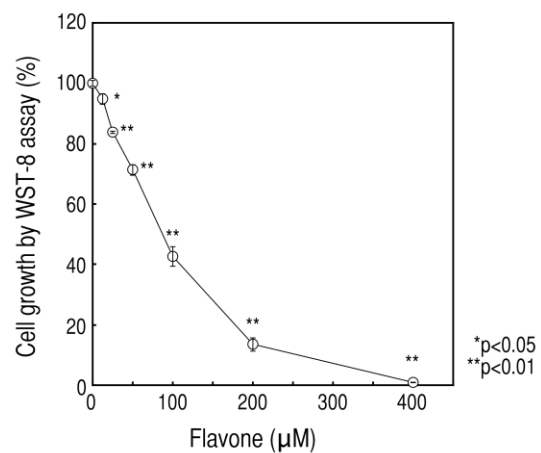


図1 WST-8 assay

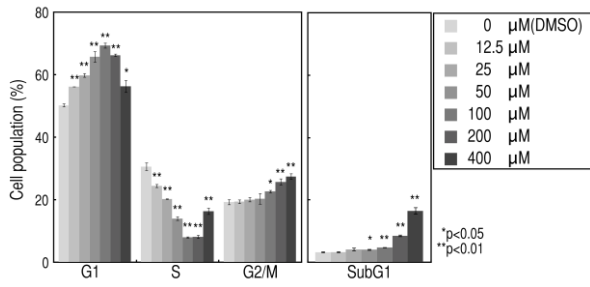


図2 Flow cytometry analysis

「miR-34a ターゲットタンパク質の解析」

G1 期における細胞周期停止に関連タンパク質の挙動をウェスタンブロット分析によって調べた。その結果、p21、p27 の上昇、CDK6 の減少が確認された (図 3)。

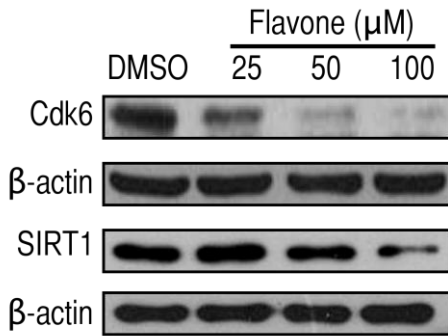


図3 Western blot (G1期細胞周期停止関連タンパク質)

また、miR-34a ターゲットタンパク質として CDK6 および SIRT1 の減少が確認された (図 4)。

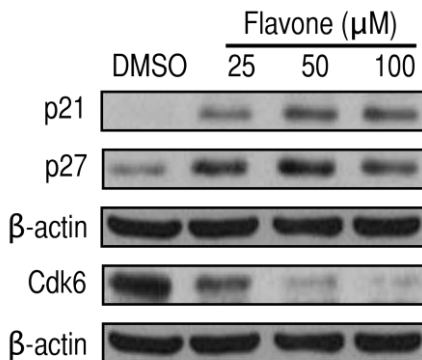


図4 Western blot (miR-34a ターゲットタンパク質)

これらの結果から、実際に生体内において miR-34a が機能している可能性が予想される。

「リアルタイム PCR」

ウェスタンブロットの結果から、量的変化を示したタンパク質の mRNA 解析を行った結果、p21 mRNA の発現上昇がみられたが、p27 は変化がなかった。また CDK6 は mRNA レベルでの減少がみられた (図 5)。

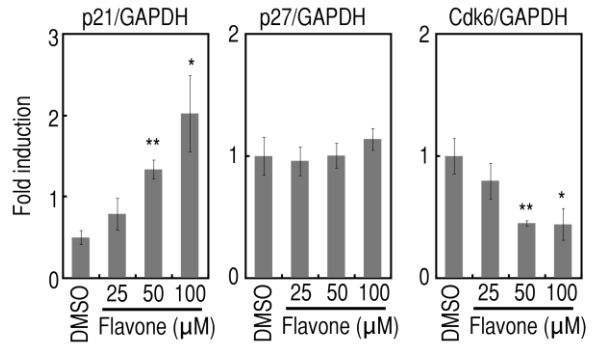


図5 Real-time PCR (G1期細胞周期停止関連mRNA)

さらに miR-34a の発現の上昇が確認された (図 6)。

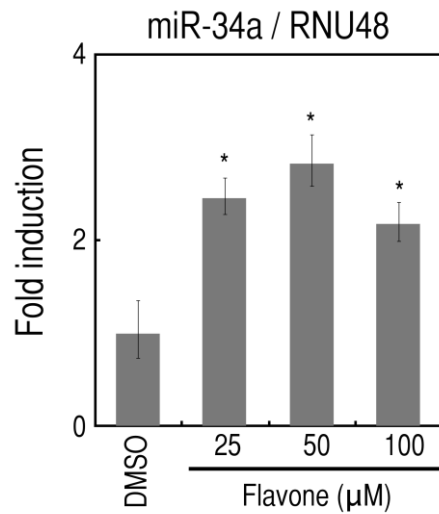


図6 Real-time PCR (miR-34a発現量測定)

今後、フラボンによる G1 期における細胞周期停止の誘導効果における、miR-34a の関与の程度を Anti-miR-34a を用いた実験を行い検証していく。

「miR-34a プロモーターの構築」

さらに、miR-34a 発現誘導成分を効率よく見いだすため、miR-34a のプロモーター予測配列をルシフェラーゼ上流に組み込み、活性化レベルを評価するためのプラスミドを構築した。miR-34a プロモーターを上昇制御す

る食品成分の探索を今後も続けていく予定である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 友杉充宏 食品成分フラボンによるRB非依存的なG1期における細胞周期停止の誘導 第10回分子予防環境医学研究会、2011年1月22日、 京都
- ② 友杉充宏 フラボンによるRB非依存的なG1期における細胞周期停止の誘導 第81回日本衛生学会学術総会、2011年3月27日、東京 (震災の為、学会誌掲載発表)

[その他]

ホームページアドレス

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友杉 充宏 (TOMOSUGI MITSUHIRO)
京都府立医科大学・医学部・プロジェクト
研究員
研究者番号：60533429

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：