

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590369

研究課題名（和文）遺伝子改変マウスにおけるマイクロRNAの抗腫瘍作用と心臓・平滑筋での機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of microRNA function on heart and smooth muscles and its anti-tumor effect using genetically modified mice

研究代表者

岩本 隆司（IWAMOTO TAKASHI）

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：60223426

研究成果の概要（和文）：マイクロRNAと呼ばれる小さなRNAはヒトの疾患に関連していることが解ってきているがその詳細は不明である。本研究では腸管に腫瘍を多発する家族性腸管腺腫症モデルマウスにマイクロRNAを過剰発現させることにより腸管腫瘍の発症が抑制されること、またその抑制にはマイクロRNA間の原癌遺伝子を介した相互作用、および一連の癌抑制性マイクロRNAの生合成に必須の分子の抑制が絡んでおり、それらの間には複雑なフィードバック機構が働くことを示した。さらにこれらのマイクロRNAを心臓に発現させると拡張型心筋症様の症状がおこる事実を見出し、その分子機構の一部を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Although accumulating evidence has shown that microRNAs are involved in many human diseases, the molecular mechanisms are still unknown. In this project, we reveal that strong expression of certain microRNAs suppresses the intestine tumor development in the model mice of familial adenomatous polyposis and that cooperation of miRNAs plays pivotal roles in inhibiting protooncogene expression. We further show that key components for biogenesis of a subset of tumor suppressor microRNAs are downregulated in the transgenic tumors. These data indicate the complicated feedback inhibition between microRNAs and molecules for their biogenesis. This project also demonstrates that their strong expression in mouse heart induces cardiomyopathy, partially clarifying its molecular mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、実験病理学

キーワード：マイクロRNA, トランスジェニックマウス、癌、拡張型心筋症

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロRNAとは？

今世紀に入り microRNA (以下 miRNA) とよばれる 21-22 塩基の non-coding RNA の存在が多くの生物種で報告されてきている。miRNA はもともと線虫において標的遺伝子の mRNA の 3' 末非翻訳領域に結合し、そのタンパクへの翻訳を抑制して発生や分化を調節する分子として発見された。一方、哺乳類でも、当時で既に 500 種以上の miRNA が同定されたが、その生理的作用は不明な点が多かった。我々は複数の miRNA のトランスジェニックマウス (以下 TGM) や miRNA の生合成に必須の分子である DGCR8 の欠損マウスを作成して、それまでに幾つかの大変興味ある知見を得てきていた。

(2) miR-143 と miR-145

① miR-143 および miR-145 と発癌との関連の経緯 miR-143 と miR-145 はヒトでは第 5 染色体上に約 2 kB 上に近接して存在しているが、現在まで幾つかの報告がこれらとヒトの癌との関連を示唆してきている。最初に Michael らが miR-143/145 が共に腸管ポリープ・大腸癌組織では正常粘膜組織に比べ発現が低下している実験結果を示した (*Mol Cancer Res.*, 1, p882-p891, 2003)。続いて、Calin らはそれらが Myelodysplastic syndrome でしばしば欠損する染色体の領域の近傍に存在することを報告し (*PNAS*, 101, p2999-p3004, 2004)、その後多くの癌細胞でこれらの miRNA の発現が低下していることが明らかになってきた。これらの事実は miR-143/145 が広く癌抑制遺伝子として標的タンパクの発現を抑制しており、何らかの原因で miRNA の発現が低下することが、悪性を誘起する可能性を示唆した。その後培養細胞レベルでの miR-143/145 の gain-of-function や loss-of-function の実験で、それらが細胞の増殖を抑制することが判ってきた (*Oncol Rep.*, 16, p845-p850, 2006; *Cancer Sci.*, 98, p1914-p1920, 2007; *Oncogene*, 28, p1385-p1392, 2009)。

② miR-143/miR-145 の生合成と癌 miRNA は メッセンジャー RNA と同様に RNA ポリメラーゼ II により転写され通常数千塩基以上の pri-miRNA として作られ、その後核内で Drosha/DGCR8 により 70 塩基程度のヘアピン構造を持つ pre-miRNA となり細胞質において成熟型の miRNA となる。一方、そのこ

ろ RNA ヘリカーゼ p68/p72 が miR-143/145 をはじめとする癌抑制性マイクロRNA の生合成に必須であることが解ってきていた (Fukuda et al., *Nat Cell Biol* 9: 604-611, 2007)。我々は miR-143/145 が培養細胞で発現が低い性質を利用して、これらと GFP 遺伝子の融合遺伝子を複数作成し、レトロウイルスを用いて NIH3T3 細胞に導入することにより、pri-miRNA から pre-miRNA へのプロセッシングを可視的にモニターできることを示した (Tsutsui et al., *BBRC*, 372:856-861, 2008)。その後、この系を用いた東京大学大学院分子病理学の宮園浩平博士らとの共同研究により miR-143/145 の生合成過程に癌抑制遺伝子 p53 が関与しているという意外な事実が明らかになった。(Suzuki et al., *Nature*, 460:529-533, 2009)。実際 miR-143/145 を含む幾つかの癌抑制機能をもつと推測される miRNA (miR-16, miR-206 など) は人の大腸癌細胞やファイブロブラストで p53 の発現誘導により発現が増強し、逆に p53 の DNA 結合ドメインの変異はこれらの miRNA の発現を抑制することが判った。驚いたことに、これらの発現増強は pri-miRNA の転写ではなく pre-miRNA へのプロセッシングの亢進によるものであった。すなわち、これらの miRNA のプロセッシングには p53 が RNA ヘリカーゼ p68 を介して Drosha/DGCR8 と会合することが必要であった。

今まで p53 により転写制御される癌抑制性 miRNA として miR-34a が知られていたがこの研究により p53 は転写以外のパスウェイで miRNA による癌抑制機構に介入していることが初めて証明された。また同時にこの研究で miR-143 の標的遺伝子として癌遺伝子 K-Ras, miR-145 のそれとして細胞周期因子 CDK6 がそれぞれ新たに同定された。すなわち miR-143/145 が大腸癌をはじめとする多くの発癌過程で癌遺伝子や癌抑制遺伝子と複雑なネットワークを形作る可能性が浮かび上がってきたのである。

(3) miR-143/miR145 と血管平滑筋

miR-143 と miR-145 の生体における生理的機能は長らく不明であった。しかし、この研究を始めたころに、それらは血管平滑筋や腸管平滑筋および胎生期の心臓に発現しており、SRF を介して平滑筋を分化誘導していること (Cordes et al., *Nature*, 460, p705-p710, 2009)、miR-143/145 欠損マウスは正常に発育するがストレス下での血管新生が抑制されること (Xin et al., *Genes Dev.*, 23, p2166-p2178, 2009)、ゼブラフィッシュで

は miR-145 のノックダウンで心臓の浮腫や腸管の形成不全がおこること (Zhen et al., *PNAS* 20;106(42):17793-8,2009) が次々と明らかになった。しかしその分子メカニズムに関しては各レポートで統一した見解はみられず更なる解析が必要と思われた。

(4)研究の準備状況

上記のように発癌に miR-143 あるいは mir-145 が関与している可能性が示唆されてきたが生体の生理的な環境下での発癌過程における評価は全くなされていなかった。実験開始時点では、生体の器官形成や発達に対する機能も全く不明であった。そこで我々は生体での機能解析を試みるため miR-143 および miR-143/145 を全身に発現するトランスジェニックマウス (TGM) を作成した。

我々がこれらのマウスに以下に示す特徴を見出していた。

i) miR-143-TGM を腸管腫瘍発症モデルである APC^{min} マウスと交配させたところ有意に小腸腫瘍の発症が抑えられた。

ii) miR-143/145 を共に全身に強発現する miR-143/145-TGM は加齢とともに心筋線維の肥厚を伴う心肥大が認められた。この現象は我々にとっては驚きであったが、この頃、心血管系に関連する報告が上述したように複数のグループから相次いでなされた。

2. 研究の目的

それまでの miRNA に関する多くの研究は培養細胞への合成 miRNA の導入により検証していた。

(1) そこで生体での機能を解析するために miR-143 を過剰発現させた個体を作り、腸管腫瘍発症モデルである APC^{min} マウスでの影響を分子レベルで解析して、miR-143 の生体に自然発症する腫瘍への効果を検討する。

(2) miR-143/145 を全身に強発現する TGM が如何なるメカニズムで心肥大を発症するかを解明し、ヒトの心疾患との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) miR-143-TGM と APC^{min} マウスを交配し、発症した腫瘍とコントロール APC^{min} マウスの腫瘍を病理組織学的に観察しどのような変化があるかを検討する。

(2) miR-143 の標的産物やヒト大腸癌の発症に重要な分子の発現をウエスタンブロット法やノザンブロット法、リアルタイムPCR法により解析する。更にこれらで得られた知見がヒト培養大腸癌細胞でも再現されるかを検討する。

(3) 心肥大の病態解析: miR-143/145-TGM にみられる肥大心における分子の発現の変

化をマイクロアレイで網羅的に解析し、心肥大のメカニズムを生化学・分子生物学的解析および生理学的検査を用いて明らかにする。一方、これらの変化が心臓局所の miR-143/145 によるかどうかは明らかでない。そこで miR-143/145 を心筋細胞特異的に発現させるため alpha myosin heavy chain の調節領域に連結してトランスジェニックマウスを作製して解析する。

4. 研究成果

(1) miR-143-TGM における腸管腫瘍抑制の解析:

① miR-143-TGM と APC^{min} マウスを交配させると小腸では有意に腫瘍の発症が低下したが、大腸ではむしろ逆転した。

② 発症した腫瘍から RNA を抽出してノザンブロット法で miR-143 と miR-145 の発現を解析した所、意外なことに miR-143 のみならず miR-145 も miR-143-TGM / APC^{min} マウスで上昇していた。更にリアルタイム PCR の解析により、pri-miR-143/145 の発現もこれらの腫瘍で上昇していた。このことより小腸腫瘍において導入 miR-143 が内在性 miR-145 を転写レベルで発現上昇させることが明らかになった。

またこれには原癌遺伝子 c-Myc の発現低下が関与していることが示唆された。

③ miR-145 / APC^{min} マウスの小腸腫瘍のタンパクの発現をウエスタンブロット法で確認したところ、miR-143 の標的分子である ERK5 の他に癌抑制性 miRNA の生合成に必須の RNA ヘリカーゼ p68/p72, beta-catenin の下流分子である c-Myc, c-Jun, cyclin-D1 の発現が低下していた。これらの変化は大腸腫瘍では認められなかった。興味あることに最近 p68/p72 はヒト大腸癌の増殖に重要な分子であることがわかっている。

④ これらの分子の発現変化のメカニズムを調べるためにヒト大腸癌細胞 DLD-1, Lovo に合成 miR-143 と miR-145 を導入したところ、miR-143 導入により ERK5 の発現は低下した。また miR-145 の導入で p72 が、miR-143 および miR-145 の導入で c-Myc の発現が低下した。一方、ERK5 のドミナントネガティブフォーム、siRNA 共に c-Myc の発現を抑制した。

⑤ さらに p72 の 3 末非翻訳領域に miR-145 の標的配列があることを見出したので、その領域をルシフェラーゼに繋いでレポーターアッセイを行った所、miR-145 の導入で活性が低下した。一方、標的配列に変異を導入したものではその低下は解除された。

さらに p72 の 3 末非翻訳領域には他の癌抑制性 miRNA の標的配列も存在した。実際これらの標的配列をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポーターアッセイを行った所、miR-145 と同様にそれぞれの miRNA で活性

が低下した。

⑥ p68の低下のメカニズムは不明であるが、DL1細胞においてc-MycのsiRNAにより有意に発現が低下したので、c-Mycの発現低下が何等かの関与をしているのは間違いないと思われる。

⑦以上の結果より、miR-143/TGMと交配させたAPC^{Min}マウスに発症する小腸腫瘍においては内在性のmiR-145の発現が上昇し、ERK5の低下と共に大腸癌のkey分子であるp68/p72が抑制され、それがc-Mycなどのbeta-cateninのシグナル下流分子を抑制し、腫瘍の発症が抑えられたと考えられた。大変興味深いことにこのp68/p72は癌抑制性miRNAの生合成に必須の分子である。このことはこれらのmiR-143/145をはじめとする癌抑制性miRNAは複雑なfeed back機構により制御されていると考えられる(図1参照)。

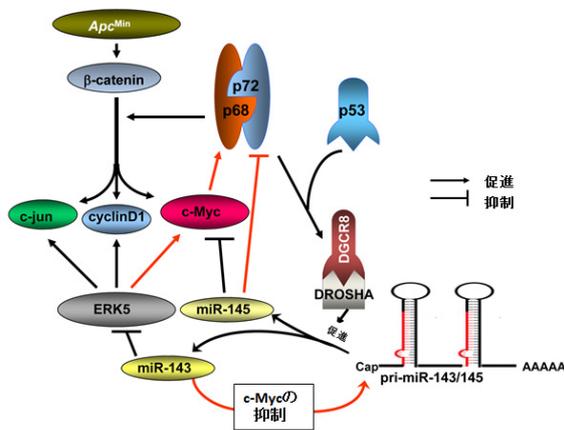


図1 PLoS One 2012 Vol7 e42137 より改変引用

(2) miR-143/145における心肥大の解析: miR-143/145TGMの心臓をcDNAマイクロアレイで解析した結果、線維化に関する遺伝子の発現が増強していたが、miR-143/145との関係を示唆する分子を絞り込むことは出来なかった。また、心筋特異的に発現するmiR-143/145の効果を検証するためalpha myosin heavy chainの調節領域に連結してトランスジェニックマウスを作製した結果、これらのTGM3系統の内強発現している1系統は生後2か月程から心室の収縮不全を起こし、早期に死亡した。これはヒト拡張型心筋症に類似した病態であった(図2参照)。

これらの心臓での分子の発現を解析した所、アンジオテンシン変換酵素1, IGF1受容体の発現が亢進していた。そこでアンジオテンシン変換酵素阻害剤であるカプトプリルを飲水投与したところ、生存率は劇的に改善した。これらの事実はmiR-143/145TGMにおける心拡大は少なくともアンジオテンシ

ン変換酵素1の発現増強による可能性を強く示唆した。

アンジオテンシン変換酵素阻害剤は末梢血管の強力な拡張作用があり降圧剤として世界中で広く使われているが、拡張型心筋症などの心疾患に効果があることも解っている。現在このマウスにおいてみられる拡張型心筋症様の病態がアンジオテンシン変換酵素を介して如何なる分子メカニズムで発症しているかを解析中である。

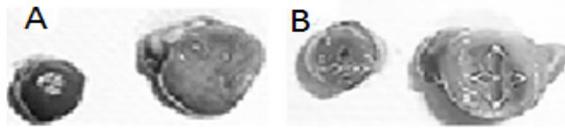


図2 TGM心室腔の顕著な拡大と心室壁の菲薄化がみられる。3ヶ月令のマウス心臓の (A)外観 (B)横断面(右:TGM, 左:野生型マウス)

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5件)

①Ouchi Y., Banno Y., Shimizu Y., Ando S., Hasegawa H., Adachi K., Iwamoto T.: Reduced adult hippocampal neurogenesis and working memory deficits in the DGCR8-deficient mouse model of 22q11 deletion-associated schizophrenia can be rescued by Igf2. *J. Neuroscience* in press 査読有

②Takaoka Y., Shimizu Y., Hasegawa H., Ouchi Y., Qiao S., Nagahara M., Ichihara M., Lee J.D., Adachi K., Hamaguchi M., Iwamoto T.: Forced Expression of miR-143 Represses ERK5/c-Myc and p68/p72

Signaling in Concert with miR-145 in Gut Tumors of *Apc^{Min}* Mice. *PLoS ONE* 7 (8): e42137, (2012). 査読有

[学会発表](計16件)

①高岡祐司, 岩本隆司, 大内靖夫, 濱口道成: miR-143 トランスジェニックマウスは内在性miR-145を誘導し・カテニンシグナルを制御することにより腸管腫瘍を抑制する、第70回日本癌学会、名古屋国際会議場(名古屋市)、(2011年10月)(口頭発表)。

②高岡祐司、清水裕子、大内靖夫、岩本隆司: 癌抑制性マイクロRNAのfeed backネットワーク、第3回日本RNAi研究会、グランドプリンスホテル広島(広島市)、(2011年、8月)(口頭発表)。

③Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T., Kato S, Miyazono K.: Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway, BMB2010, 神戸ポートアイランド(神戸市)、(2010年12月)(口頭発表)。

④Shimizu Y., Hasegawa H., Ouchi Y., Iwamoto T.: 家族性大腸腺腫症モデルマウス

におけるmiR-143 の発がん抑制機能解析、第2回日本RNAi研究会、グランドプリンスホテル広島（広島市），（2010年8月）（口頭発表）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：神経幹細胞の増殖促進剤及びその用途

発明者：大内 靖夫, 岩本 隆司

権利者：中部大学

種類：特許

番号：特願 2013-00289

出願年月日：平成25年1月10日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本隆司 (IWAMOTO TAKASHI)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：60223426

(2) 研究分担者

市原正智 (ICHIHARA MASATOSHI)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00314013

上山知己 (UEYAMA TOMOMI)

京都府立医科大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80379388

中山晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30192230

(3) 連携研究者

大内靖夫 (OUCHI YASUO)

中部大学・実験動物教育研究センター・

助教

研究者番号：70553858

