

## 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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700873

研究課題名（和文）新規 miRNA 阻害ベクターライブラリーを用いたがん細胞増悪化関連 miRNA の探索

研究課題名（英文）Screening for microRNA which is related to cancer progression by using novel microRNA inhibitory vectors.

研究代表者

原口 健（HARAGUCHI TAKESHI）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10549455

研究成果の概要（和文）：我々が開発した miRNA を阻害する Decoy RNA, TuD (Tough Decoy) RNA の発現ベクターを改良し、これを用いて癌性質に関わる miRNA を探索することが本研究の目的であった。本研究において実際に我々は TuD RNA 発現ベクターを改良することができた。この改良型 TuD RNA を発現するユニットを搭載したレンチウイルスベクターが、導入された培養細胞内において 100 日以上に渡り、miRNA 阻害効果を維持することができることを示した。さらにこのベクターを用いることにより、癌細胞において上皮-間充織転換を誘導することができた。これにより改良型 TuD RNA 発現ベクターが、癌細胞における miRNA の機能を解析する上で有用なツールであることを実証した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is improvement of miRNA inhibitory vector “TuD RNA; Tough Decoy RNA” which we developed previously and search miRNAs that are related to cancer progression by using improved TuD RNA vector. In this project, we improved TuD RNA expression vector. We transduced improved TuD RNA expression lentivirus vector into cancer cells and observed that its miRNA inhibitory effects has been maintained for more than 100 days after transduction. Furthermore, improved-type TuD RNA expression lentivirus vector which targeted miR-200c induced epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. These results showed that improved-type TuD RNA was a powerful tool for miRNA research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：RNA 干渉・microRNA・inhibitor・がん

## 1. 研究開始当初の背景

(1) microRNA (miRNA) は 20～25 ヌクレオチド程度の小さな非コード RNA である。miRNA は

多くの生物種に存在し、ヒトにおいては当時 800 近く報告されていた。また 1 つの miRNA が抑制する遺伝子は 1 つではなく多くの標的

遺伝子をもっているため、ヒトコード遺伝子の1/3以上がmiRNAの標的であると予想されていた。そのためmiRNAは多くの標的遺伝子の発現を抑制することにより遺伝子ネットワークを形成し、発生、分化、癌形成などにおいて機能していることが報告されていた。

(2)miRNAの機能解析において、特異的に阻害する技術が不可欠である。miRNAの機能を阻害する方法として、2'-O methyl RNA、locked nucleic acidやantagomir、microRNA spongeベクター等が報告されていた。しかしこれらには、効果が一過的であり、また不十分であるといった問題があった。そこで我々は効果的にmiRNAの機能を阻害する手法として、特異な2次構造をもつ1本鎖RNAであるデコイRNA(Tough Decoy RNA;TuD RNAと名付けた)を開発した。さらにこのTuD RNAが従来の阻害法と比べて、はるかに高い阻害効果を持つことを報告していた(*Nuc. Acids. Res.* 37(6) : e43, 2009)。

(3)がん細胞と正常細胞間でmiRNAマイクロアレイを行った報告などから、多くのmiRNAについてがん細胞において発現異常が見られることが分かっていた。そのためがん細胞の増悪化にmiRNAが関与していることが予想されていた。一例として、当時、miR-200 familyの発現低下が上皮-間充織転換を誘導することが示されていたが(*Genes Dev.* 22: 894-907 2008)、実証例はまだ少なかった。

## 2. 研究の目的

(1)我々がこれまでに開発した、特定のmiRNAを阻害するデコイRNAであるTough Decoy RNA(TuD RNA)を発現するベクターを改良する。改良型TuD RNA発現ベクターが標的miRNAを阻害することにより、がん細胞の性質を変化し得るかどうかを調べる。

(2)改良型TuD RNA発現ベクターを利用して、発現低下することにより発がんやがんの増悪化を誘導するmiRNA分子種を探索する。これによりがんの分類、予後の予測等の診断への応用や、当該miRNAの導入による治療の可能性を追求する。

## 3. 研究の方法

(1)我々が開発したTuD RNAは約120ヌクレオチドからなる特異な2次構造をもつ1本鎖RNAである。そこで我々はTuD RNAの改良を目指し、まずTuD RNAの2次構造について検討を行った。さらに発現に用いるプロモーターとして、shRNA発現プロモーターとして高い活性が報告されていたh7SKプロモーター

ーを選択した。さらに転写開始点直後の配列がh7SKプロモーターの活性に影響を増強するとの報告があることから、TuD RNAの配列を、その2次構造を保ったまま、一部改変した。このh7SKプロモーター駆動TuD RNAと、従来法であるmU6プロモーター駆動TuD RNAを比較検討した。

(2)miR-200cを標的とするh7SKプロモーター駆動TuD RNAを設計し、これを搭載したレンチウイルスベクターを作製した。このレンチウイルスベクターをHCT-116細胞に導入し、薬剤選択を行い、安定miR-200c阻害細胞を作製した。この細胞の形態観察を行いながら培養を100日以上続けた。この間レンチウイルスレポーターベクターを用いてmiR-200cの活性を測定を行った。さらに上皮細胞、間充織細胞の遺伝子マーカーであるE-cadherinおよびVimentinの発現を調べた。

## 4. 研究成果

(1)TuD RNAの改良を目指し、様々な検討を行った結果、h7SKプロモーターを見出した。従来法ではmU6プロモーターを用いるが、h7SKプロモーターを用いることにより、標的miRNAの阻害効果が大きく上昇することを見出した。

(2)改良した阻害法を用いてがん細胞の増悪化を誘導できるかどうかを検討した。がん細胞のEMTを抑制するmiRNAとして報告されているmiR-200 familyに対するTuD RNAを発現するレンチウイルスベクターを大腸がん上皮細胞であるHCT-116細胞に導入し、TuD-miR200安定発現細胞を作製した。この細胞の上皮、間葉細胞のマーカー遺伝子であるE-cadherin、Vimentinのタンパク質量を測定したところ、図1に示したようにレンチウイルスベクター導入から7日目にはE-cadherinの減少が見られ、11日目にはE-cadherinの大幅な減少、Vimentinの発現増強が観察された。さらにこの細胞の形態は、レンチウイルスベクター導入から11日目には元の敷石状の形態からスピンドル様の形態へと変化していた。さらに培養を続けたところ、この効果は100日以上持続することが確認された。以上より改良阻害法は高いmiRNA阻害効果を持続的に発揮し、EMTをも誘導し得ることが示された。今後のmiRNA研究においてTuD RNAが活用されていくことが期待される。

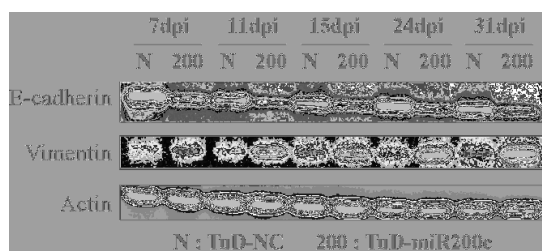


図1 改善型 TuD RNA 発現ベクターによる EMT の誘導

## 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3件)

①Haraguchi, T., Nakano, H., Tagawa, T., Ohki, T., Ueno, Y., Yoshida, T., and \*Iba, H. A potent 2'-O-methylated RNA-based microRNA inhibitor with unique secondary structures. *Nucleic Acids Research*, DOI 10.1093/nar/gkr1317, (2012)

②Hikichi M, Kidokoro M, Haraguchi T, Iba H, Shida H, Tahara H, \*Nakamura T. MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Mol Ther*. 19(6):1107-15. (2011)

③Sakurai, K, Furukawa C, Haraguchi T, Inada K, Shiogama K, Tagawa T, Fujita S, Ueno Y, Ogata A, Ito M, Tsutsumi Y, Iba H. MicroRNAs miR-199a-5p and -3p target the Brm subunit of the SWI/SNF to generate a double-negative feedback loop in a variety of human cancers. *Cancer Research*, 71: 1680-1689. (2011)

[学会発表] (計5件)

①原口 健、中野春男、吉田哲郎、伊庭英夫、Development of S-TuD, a novel 2'-O-methylated RNA based microRNA inhibitor with unique secondary structures.、第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、横浜

②伊庭英夫、原口 健、櫻井浩平、小林和善、miRNA as an epigenetic switch.、第18回東アジアシンポジウム、2011年12月7日、上海

③原口 健、中野春男、吉田哲郎、伊庭英夫、A potent 2'-O-Methylated RNA based microRNA inhibitor with unique secondary structures.、第70回日本癌学会、2011年10月4日、名古屋

④原口 健、櫻井浩平、伊庭英夫、特定の microRNA を長期間、高効率で阻害する Decoy RNA 発現レンチウイルスベクターの確立、第58回日本ウイルス学会、2010年11月9日、徳島

⑤引地美奈、木所 稔、原口 健、伊庭英夫、志田壽利、田原秀晃、中村貴史、マイクロ RNA によって制御されるウイルスの開発とその応用、第12回日本 RNA 学会年会、2010年7月27-29日、東京

[図書] (計3件)

①原口 健、伊庭英夫、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK、2'-OME RNA オリゴを基盤とした独特の二次構造を持つ新規 microRNA 阻害剤、S-TuD、2012、印刷中

②原口 健、伊庭 英夫、羊土社、実験医学、TuD RNA 発現ベクターによる特定の microRNA の高効率阻害法、2010

③原口 健、櫻井 浩平、伊庭 英夫、医学書院、生体の科学、TuD RNA 発現ベクターを用いた miRNA の活性阻害による機能解析、2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/div-host-parasite/Version1.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原口 健 (HARAGUCHI TAKESHI)  
 東京大学・医科学研究所・助教  
 研究者番号：10549455

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し