

## 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 5月30日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790221

研究課題名（和文）腸管上皮幹細胞における癌抑制型 miRNA の発現制御および機能解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of tumor suppressor miRNA in intestinal stem cells

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

腸管上皮組織は優れた幹細胞システムによって維持された臓器であり、小腸では陰窩底部に存在する幹細胞が絶えず絨毛部へ腸管上皮細胞を供給することが知られている。近年の研究の進展により腸管上皮組織は幹細胞、癌幹細胞研究のモデル系として注目されているが本研究では癌抑制miRNAの代表例であるLet-7に着目し、miRNA の発現制御を軸に腸管上皮幹細胞維持から腫瘍の発生までの分子機構を解明することを目的とした。

その結果、小腸上皮組織ではLet-7抑制分子であるLin28が陰窩底部に特異的に発現しLet-7の発現を抑制していることを明らかになった。またLet-7-GFPモニタリング遺伝子組換えマウスの解析から陰窩底部ではpri-Let-7のプロセシングが抑制されていることが示唆された。この発現の意義を明らかにするべくin vitro, in vivoでの解析を進めてきた結果、興味深いことにラット小腸部由来IEC-6細胞株におけるLin28Aの過剰発現により、細胞増殖、遊走能の亢進が確認され、接触阻害能が低下することが明らかになった。またLin28A過剰発現細胞では標的分子であるlet-7の発現が低下しており、さらに下流のLet-7標的であるc-mycの発現が強く誘導されていた。また一方、腸管上皮細胞特異的プロモーター制御下でLin28Aを過剰発現する遺伝子改変マウスの作成を進めた結果、一部の系統において小腸腺癌の形成が認められたことから、その解析を進めている。

以上の結果よりマウス小腸組織では陰窩底部位特異的にLin28が発現しておりLet-7のプロセシングを抑制することでc-mycの発現を増強しており、腸管上皮幹細胞の増殖、発癌過程におけるその悪性化に寄与している可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The intestinal epithelium is the most rapidly self-renewing tissue in adult mammals. The self-renewing epithelium of the small intestine is ordered into crypts and villi.

In this study, we focused on the expression and role of tumor suppressor miRNA, Let-7, in mouse small intestine. As a result, we found expression of Let-7 family miRNAs were down-regulated in the crypt region. While expression of Lin28A, which is strong inhibitor of Pri- and Pre-let-7 processing, was only detected at crypt region, Lin28A-mediated inhibition of Let-7 was speculated. To examine the processing of Let-7 in vivo, we use Let-7-GFP transgenic mice, in which processing of pri-miRNA were visualized by GFP expression. We found that processing of pri-let-7 was inhibited in crypt region. To examine the role of Lin28A-mediated down-regulation of Let-7 in intestinal stem cells, we use in vitro and in vivo analysis. Interestingly, we found that forced expression of Lin28A in rat crypt cell-derived cell line, IEC-6 cells, enhanced cell proliferation,

migration activity and decreased contact inhibition of the cells. We observed that overexpression of Lin28 in IEC-6 cells potentially depletes levels of multiple mature miRNAs in the let-7 family, leading to a concomitant increase in protein abundance of c-Myc, a let-7 target.

To investigate Lin28A function in vivo, we generated a transgenic mouse strain that expresses Lin28A in intestinal epithelium cells. Since some of the Lin28A transgenic mouse displays adenocarcinoma in small intestine, we are now examining the molecular mechanism of the phenotype.

Taken together, our results suggested that crypt specific Lin28A expression regulates cell proliferation of intestinal stem cells, and may contribute to malignant progression of intestinal tumors.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：miRNA, 腸管上皮幹細胞、幹細胞、腸管系腫瘍、Let-7、Lin28

#### 1. 研究開始当初の背景

miRNAは18-25塩基からなる低分子RNAであり、主に標的mRNAの3'非翻訳領域に結合しタンパク質産生を抑制し、多様な生命現象において重要な役割を担っている。中でもLet-7は癌抑制型miRNAの代表例であり様々な癌において発現が低下し癌抑制的に作用することが知られている。近年、このLet-7の発現をRNA結合タンパク質Lin28が強力に抑制し、癌の悪性化だけではなく、iPS細胞の形成に必要な分子であることが報告されLet-7-Lin28制御系の生理機能が世界的に注目を浴びている。一方、腸管は優れた幹細胞システムによって維持された臓器であり、小腸では陰窩底部に存在する幹細胞が絶えず絨毛部へ腸管上皮細胞を供給し非常に早くターンオーバーすることが知られている。また近年の研究の進展により、小腸ではLgr5, CD133など分子を幹細胞が発現していることが明らかになり幹細胞、癌幹細胞研究のモデル系としても注目されている。しかし、腸管上皮幹細胞におけるmiRNAの機能解析はこれまで前例がなく、また大腸癌などの様々な癌においてLet-7の発現低下、Lin28の発現上昇という逆相関関係が報告されつ

つあるも、その分子機構、生理的意義についても不明であった。

#### 2. 研究の目的

本研究はLet-7-Lin28制御系という近年注目されている癌抑制型miRNAの発現抑制機構に着目し「miRNAのプロセッシング制御と組織幹細胞の未分化性維持」という新たな観点からの腸管上皮幹細胞の未分化性維持および腸管系腫瘍の発生の分子機構の解明を試みることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

マウス小腸組織におけるLet-7/Lin28s制御系の詳細な発現を明らかにするため、Let-7 family miRNAの発現解析をReal-time PCR, in situ hybridizationを用いて解析した。一方、Lin28A, Bに関してもin situ hybridization, western blotting, immunohistochemistryを用いて解析し、Crypt-Villusでの発現パターンの解析を行った。またマウス個体レベルでのLet-7のプロセッシングを解析するため、本学で作成したLet-7-GFPモニタリング遺伝子組換えマウ

スを用いて腸管における GFP の発現を共焦点顕微鏡を用いて解析を行った。

次にラット小腸由来細胞 IEC-6 細胞をモデルとして Lin28A, B の過剰発現をレトロウイルスベクターを用いて行い、その細胞増殖、接触阻害、遊走能における機能を解析した。

また標的 miRNA である Let-7 の発現を Real-time PCR にて解析を行い、またその下流遺伝子の発現を RT-PCR, western blotting を用いて解析した。

一方、マウス個体レベルでの Lin28 の機能を明らかにするため、腸管上皮細胞における過剰発現に良く用いられる Villin promoter を用いて腸管上皮細胞特異的 Lin28A 過剰発現マウスの作成を行い、その腸管組織の形成の解析を行った。

#### 4. 研究成果

その結果、マウス小腸上皮組織では Let-7 抑制分子である Lin28 が陰窩底部に特異的に発現し Let-7 の発現を抑制していることを明らかになった。また Let-7-GFP モニタリング遺伝子組換えマウスの解析から陰窩底部では pri-Let-7 のプロセッシングが抑制されていることが示唆された。

一方、Lin28A, B を過剰発現したラット小腸由来細胞 IEC-6 細胞を用いて、その機能を解析した結果、興味深いことに Lin28A の過剰発現により、細胞増殖、遊走能の亢進が確認され、接触阻害能が低下することが明らかになった。また Lin28A 過剰発現細胞では標的分子である let-7 の発現が低下しており、さらに下流の Let-7 標的である c-myc の発現が強く誘導されていた。また一方、腸管上皮細胞特異的プロモーター制御下で Lin28A を過剰発現する遺伝子改変マウスの作成を進めた結果、一部の系統において小腸腺癌の形成が認められたことから、その解析を進めている。以上よりマウス小腸組織では陰窩底部に特異的に Lin28 が発現しており Let-7 のプロセッシングを抑制することで c-myc の発現を増強しており腸管上皮幹細胞の増殖、発癌過程におけるその悪性化に寄与している可能性が考えられた (図1)。

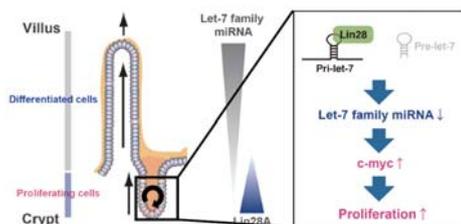


図1 小腸組織における Let-7/Lin28 制御系の機能

#### 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2件)

① Iguchi-Ishiguro H, Ouchi Y, Watanabe S, Numabe Y., "Analysis of syndecan-1 gene promoter during mouse tooth development." Arch Oral Biol. 2011 Nov 29. [Epub ahead of print]

② Ouchi Y, Baba Y, Koso H, Taketo MM, Iwamoto T, Aburatani H, Watanabe S., " $\beta$ -Catenin signaling regulates the timing of cell differentiation in mouse retinal progenitor cells." Mol Cell Neurosci. 2011 Apr;46(4):770-80. Epub 2011 Feb 24.

[学会発表] (計11件)

① 大内靖夫, 清水裕子, 安藤章太, 坂野祐哉, 岩本隆司 "Deficiency of DGCR8 gene, a potential gene for 22q11 deletion syndrome, decreases adult neurogenesis in the mouse hippocampal dentate gyrus" 日本分子生物学会年会 (BMB2011), パシフィコ横浜 (横浜市), 2011年12月13日, (ポスター発表)

② 山本純矢, 大内靖夫, 岩本隆司 "The heterochronic gene Lin-28 regulates cell proliferation and neural expansion during early development in zebrafish" 日本分子生物学会年会 (BMB2011), パシフィコ横浜 (横浜市), 2011年12月13日, (ポスター発表)

③ 高岡祐司, 清水裕子, 大内靖夫, 岩本隆司, "癌抑制型 MicroRNA のフィードバックネットワーク" 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 (名古屋), 2011年10月, (口頭発表)

④ Yamamoto J, Ouchi Y, Iwamoto T, "The heterochronic gene Lin-28 regulates cell proliferation and neural expansion during early development in zebrafish, 17th Japanese medaka and zebrafish meeting, toray human resources development center, Mishima, Sept, 2011, (ポスター発表)

⑤ 大内靖夫, 清水裕子, 安藤章太, 水野麻衣, 岩本隆司, "22q11 欠損症候群モデルマウスにおける DGCR8 遺伝子の欠損は成体マウス海馬歯状回に内在する神経幹細胞の増殖を低下させる", 第34回日本神経科学大会, パシフィコ横浜 (横浜), 2011年9月,

(口頭発表)

⑥ 大内靖夫, 清水裕子, 安藤章太, 坂野祐哉, 岩本隆司, ” DGCR8 遺伝子ヘテロ欠損型統合失調症モデルマウス海馬歯状回における神経幹細胞の解析”, 第3回日本RNAi研究会, グランドプリンスホテル広島 (広島), 2011年, 8月 (口頭およびポスター発表)

⑦ Ouchi Y, Mano H, Watanabe S. ”Analysis of the Role of Pax6 Targeting miRNA During Mouse Retinal Development”, 2011 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., May., 2011

⑧ Ouchi Y, Asaeda Y, Mizuno M, Takaoka Y, Iwamoto T, ”Functional analysis of the RNA-binding protein Lin28 gene in mouse intestinal stem cells”, 日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸ポートアイランド (神戸市), 2010年12月, (ポスター発表)

⑨ 山本純矢, 大内靖夫, 岩本隆司, ”Zebrafishを用いたRNA結合タンパク質 Lin28 の機能解析”, 日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸ポートアイランド (神戸市), 2010年12月, (ポスター発表)

⑩ Shimizu 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

⑪ Ouchi Y, Simizu Y, Mizuno M, Iwamoto T, ”Altered brain microRNA biogenesis affects neural stem cell proliferation in mouse hippocampal dentate gyrus.”, 第8回幹細胞シンポジウム2010, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県), 2010年5月, (ポスター発表)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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