

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300359

研究課題名(和文) miRNA分子スイッチによる発がん抑制バリアーの選択機構

研究課題名(英文) Mechanism for the selection of anti-cancer networks by tumor-suppressive miRNAs

研究代表者

土屋 直人 (Tsuchiya, Naoto)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30322712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：当研究グループで同定した、がん抑制的miR-101とmiR-22の機能解析を通して、がん細胞内に存在する新たながん抑制ネットワークを明らかにした。miR-101による細胞増殖抑制は、細胞周期のM期進行に重要な遺伝子の発現抑制を介しており、この抑制によりp53シグナル経路の活性化を伴うことを明らかにした。また、miR-22の解析から、p53の機能が失活したがん細胞の細胞周期亢進に必須の因子を同定することに成功した。この因子の発現を抑制することで、p53変異・欠損細胞の増殖を特異的に抑制できることを示した。これらの成果はがん治療薬開発における新しいシーズ・分子標的の提案を可能とする。

研究成果の概要(英文)：By detailed analysis of miR-101 and miR-22, we successfully found novel intra-cellular networks, which are deeply involved in the regulation of cancer cell proliferation. miR-101 was defined as a novel regulator for G2 checkpoint of cell cycle through the repression of several microtubule regulators, and resulted in its function as an inducer of p53-dependent apoptosis. We also confirmed that expression of miR-101 is frequently down-regulated in human cancers.

We identified NEK9 as a crucial regulator for cell cycle progression in p53-inactivated cancer cells through the target screening of miR-22. Knockdown of NEK9 was caused to repress cell proliferation only in p53 mutant and deficient cells both in vitro and in vivo. NEK9 KD was indicated to induce prolonged inhibition of G1 to S progression of cell cycle leading to express senescence-like features of cancer cells. Our findings might provide a novel strategy for cancer therapy targeting mutant p53.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト発がん過程では、Genetic および Epigenetic な変異が多段階的に蓄積することが知られている。細胞傷害性ストレスに暴露された正常細胞において、これらの変異が、がん抑制遺伝子やがん遺伝子に生じることは、細胞の形質転換を惹起する最も大きな要因の一つである。一方、正常細胞には、細胞傷害性ストレスに対しての防御機能、いわゆる発がん抑制機構が存在し、pre-mature senescence や細胞死 (apoptosis) を誘導することで、細胞の悪性転換を防御している。発がん抑制機構の誘導に関しては、がん抑制因子 p53 による標的遺伝子の選択的な活性化が必須である。しかしながら、如何にして p53 が選択的に標的遺伝子を活性化し、2 つの異なる表現型 (細胞周期停止と細胞死) へとダメージを受けた細胞を導くかに関する分子機構については、未だ決着がつかない。

近年、新たな遺伝子発現制御分子として、マイクロ RNA (miRNA) をはじめとする non-coding RNA が注目されている。特に、約 22 塩基で構成される miRNA の機能異常は、様々なヒトがん種において認められ、発がんとは深く関連していることが示唆されている。我々は、大腸発がんの極めて初期段階で生じる遺伝子発現制御異常に関する研究を通じて発がんの分子機構の解明を目標に研究を行ってきた。その課程で、マイクロ RNA (miRNA) の制御因子の一つである SND1 が、大腸がん抑制因子 APC の発現を転写後レベルで制御する新しい分子機構を見出し報告した (Tsuchiya et al. Cancer Res. 2007)。また、大腸発がんに関連する miRNA のスクリーニングとして miR-34a を単離し、その機能について報告した (Tazawa et al. PNAS 2007)。さらに、最近、機能的 miRNA スクリーニング法を確立し (Izumiya et al. Carcinogenesis 2010)、網羅的遺伝子解析を組み合わせて、大腸がんの新規がん抑制遺伝子として、miR-22 を単離した。

## 2. 研究の目的

我々が同定した miR-34a と miR-22 は、がん抑制因子 p53 の標的遺伝子であり、がん細胞の増殖を強く抑制する。miR-34a は、p53 依存的に細胞老化様の細胞周期停止を引き起こす。一方、miR-22 はアポトーシスを選択的に誘導することができる。miR-34a は p53 を活性化する多くの刺激で発現誘導されるのに対して、miR-22 はアポトーシスが誘導される刺激にのみ応答する。細胞傷害性ストレス応答における細胞周期停止とアポトーシスの択一的選択は、発がん抑制機構として重要である。本研究では、miR-34a および miR-22 遺伝子の p53 による発現制御機構を詳細に解析し、発がんストレス応答に対する miR-34a と miR-22 の役割分担を明らかにする。2 つの異なる表現型の択一的な選

択の分子機構の解明を介して、発がん抑制ネットワークを理解する。加えて、miR-101 の解析も行い、p53 ネットワーク制御における miRNA の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

### miR-22 の解析

#### miR-22 標的遺伝子の同定

がん抑制遺伝子 p53 の変異の有無によって、miR-22 が誘導する表現型が異なることから、p53 変異細胞と野生型細胞を用いて、miR-22 の標的遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に探索した。

#### 細胞増殖アッセイ

様々ながん細胞に標的遺伝子の siRNA を導入し、細胞数を継時的にカウントした。また、2 次元のコロニー形成能及び足場非依存性増殖における、標的遺伝子の役割を解析した。

#### マウスモデル

ヒト大腸がん細胞株 (p53 野生型及び変異型) をマウスへ移植し、標的遺伝子の siRNA を 2 日おきに投与し、細胞増殖能の変化を観察した。

#### 組織染色

ヒト肺がん検体の組織マイクロアレイを用いて、NEK9 と p53 の免疫染色を行った。ヒト検体の使用に関しては、国立がん研究センターの倫理審査委員会の承認を得て行い、各々の患者さんからは、同意を得た検体を使用した。

### miR-101 の機能解析

#### 標的遺伝子探索

miR-101 をがん細胞株へ導入後、mRNA の発現プロファイルをマイクロアレイで作成し、複数の細胞株で共通に変化する遺伝子群を抽出した。ネットワーク解析も行い、miR-101 によって変動する細胞内シグナル伝達経路を同定した。

#### 臨床検体の発現解析

臨床検体の発現解析は、共同研究機関である NCI と協力して、肺腺がん 91 症例について、Nano-spring で行った。また、日本人の肺腺がん症例については、NCC の検体を用いて行った。これらの研究は、倫理審査委員会の承認を経て実施された。

#### 細胞周期の解析

miR-101 を導入した後に、FACS を用いて、細胞周期の各 phase の細胞をソートし、その分画から RNA 及びタンパク質を抽出して解析を行った。

## 4. 研究成果

### miR-22 標的遺伝子 NEK9 の同定とその機能

がん抑制的 miRNA である miR-22 は、p53 野生型のがん細胞には、細胞死を強く誘導する一方、p53 変異型のがん細胞には細胞周期停止を誘導する。これまでの解析から、miR-22 による、p53 変異細胞の細胞周期停止には、

CDKやHDACなどの細胞周期制御因子は関与していないことが示唆されていた。このことは、miR-22がp53変異がん細胞の増殖に必須な因子を標的としている可能性を示している。そこで、miR-22のp53変異細胞の標的遺伝子を探索し、p53変異がん細胞の増殖に必須な因子の同定を試みた。

P53野生型細胞株であるHCT116と変異型であるSW480、さらにHCT116のp53ノックアウト細胞へmiR-22を導入し、mRNA発現アレイ解析を行った。変異型とノックアウト細胞で共通して発現が低下する遺伝子を抽出し、さらに、p53野生型細胞では、miR-22によって発現低下を示さない遺伝子を選別した。さらに、細胞周期制御因子を抽出した後に、データベースを用いて、miR-22の標的となる遺伝子を選別したところ、6種類の遺伝子が候補となった。これらを、siRNAでノックダウンし、p53変異がん細胞の増殖を検討したところ、NEK9 (NIMA-related kinase 9) が候補として同定された。NEK9のノックダウンによって、様々なp53変異がん細胞の増殖を抑制することができるが、野生型のがん細胞では、NEK9のノックダウンによる影響はほとんど認められなかった。マウス移植がんモデルにおいても、NEK9のsiRNA投与により、p53変異がん細胞の増殖は抑制されたが、野生型は抑制しなかった。さらに、詳細な解析から、NEK9が、細胞周期のG1期からS期への進行に必要な因子であることを明らかにした。興味深いことに、ヒト肺がん症例の免疫染色の結果、肺腺がんでは、NEK9とp53変異型タンパク質の両者が発現している症例は、予後不良であった。これらの結果から、NEK9の機能はp53変異がん細胞の細胞周期制御を介した増殖亢進に関連していることを見出した(論文投稿中)。

miR-101は、当研究グループで確立した機能スクリーニング法により、がん抑制的に機能するmiRNAとして単離した(Tsuchiya et al Cancer Res. 2011)。その詳細な機能を解析し、細胞周期のG2期制御の新しいシグナル伝達経路を明らかにした。

miR-101を導入した複数の細胞株を用いて、mRNAの発現アレイを行い、miR-101によって影響を受ける細胞内ネットワークの解析を行った。その結果、細胞株間で共通して、ATM依存性のDNAダメージチェックポイント経路が、有意に影響を受けることを見出した。その経路を詳細に解析すると、miR-101によってp53の下流遺伝子の発現が上昇していた。事実、miR-101を導入すると、p53の蓄積と共に、Ser15のリン酸化が誘導されること、さらに、下流遺伝子のアポトーシス制御因子の発現が有意に上昇していた。一方、細胞周期の解析から、miR-101を導入すると、G2期の細胞集団が増加し、その後に細胞死が誘導されることが示唆された。この現象に関連するmiR-101の標的遺伝子をマイクロアレイを用いて検索し、複数の微小管制御因子を同定

した。これら、複数の標的候補をsiRNAでノックダウンすると、細胞周期のG2期停止とアポトーシスの亢進が認められた。さらに、このうち、protein Xの発現を単独で抑制した場合、p53の蓄積とSer15のリン酸化が亢進されることが解った。これまで、Xとp53の関連について、報告はなくmiR-101によって、新たな細胞内ネットワークが連結されている可能性が考えられる。また、ATM/ATRのノックダウンによっても、miR-101依存的なp53のリン酸化が抑制されること、Xのノックダウンは、ATMの活性化を誘導することから、miR-101が、Xの発現抑制を介して、p53の活性化を誘導していることを明らかにした。興味深いことに、FACSを用いて、各細胞周期の細胞をソートし、miR-101の標的遺伝子の解析を行った。その結果、G2期のみで、標的遺伝子の発現低下とp53のリン酸化が検出され、PARP-1の切断も観察されることから、miR-101は、細胞周期のG2期停止細胞死誘導となることが強く示唆された。この現象は、p53をノックダウンすると失われることから、この経路がp53依存的に生じていることも判明した。miR-101は、G2期へと細胞が収束するタイプのストレスに応答して、p53野生型の細胞でのみ、発現上昇が認められた。しかし、p53はmiR-101遺伝子の近傍には結合していなかったことから、miR-101はp53の直接の標的遺伝子ではないが、発現の活性化には、p53の存在が必要であると考えられる。miR-101によるp53依存性ストレス応答反応は、その活性化までの時間がかかることや、DNAダメージ応答反応の後に活性化されることも分かった。これらの結果を総合すると、細胞には、ストレスに対して、Rapid responseとSlow responseの2つの経路が存在し、p53依存性な、シグナルネットワークは両者を制御していること、miR-101は後者の活性化に必要な分子であると考えられる。実際に、大腸腺腫におけるmiR-101の発現を検討すると、非がん部に比べて、腺腫では発現が高く、がん部では、発現低下を示していた。したがって、生体内でも長時間のストレス応答反応は重要であり、発がん過程においては、そのシステムが破綻している可能性が示唆された(論文準備中)。

## 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)

1. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N. (2014) Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. PLoS ONE 9: e92921. (査読あり)

2. Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, Ohata H, Izumiya M, Tsuchiya N, Sato A, Sakai H, Nakagama H. (2012) miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *EMBO J.* 28:1752-63. (査読あり)

3. Atsumi Y, Fujimori H, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno J, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, Yoshioka K. (2011) Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. *PLoS One.* 6:e23432. (査読あり)

4. Izumiya M, Tsuchiya N, Okamoto K, Nakagama H. (2011) Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Sci.* 102:1615-21. (査読あり)

5. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. (2011) Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res.* 71:4628-39. (査読あり)

[学会発表](計 23 件)

1. 土屋直人 “新たながん克服医療の構築 - マイクロ RNA 変動に起因するがんの病態把握と革新的な診断法・予防法及び核酸医薬の開発 - ” 平成 25 年度医薬基盤研究所橋渡しセミナー (2013) 東京、11 月 1 日

2. Tsuchiya N. Tumor-suppressive miRNAs ~ their functions and applications ~ Seminar in Laboratory of Human Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD USA. 2013 Sep. 24

3. 土屋直人 “マイクロ RNA 変動に起因するがんの病態把握と革新的な診断法・予防法及び核酸医薬の開発” 彩都産学官連携シンポジウム 2013 年 1 月 17 日 大阪

4. Tsuchiya N. “Tumor-suppressive microRNAs in the p53 network” Seminar in Laboratory of Human Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA Nov. 2, 2012

5. 土屋直人 “マイクロ RNA : 発がん機構

の解明からマイクロ RNA 創薬へ” RNA 科学総合研究センター公開シンポジウム「RNA 科学の現状と将来」2012 年 6 月 18 日 東京理科大学

6. Tsuchiya N. “ Post-translational regulation of p21 by microRNA-22 determines p53-dependent cellular fate ” France - Japan Symposium on Cancer Research Nov. 1-2, 2011 Tokyo

7. 土屋直人 “機能スクリーニングと網羅的ゲノム解析によるがん抑制因子マイクロ RNA の同定とその機能” アジレントゲノムフォーラム 2011 年 6 月 14 日 東京

8. 栗岡大輔、渡辺昌俊、河野隆志、中釜 斉、土屋直人 マイクロ RNA 標的遺伝子スクリーニングによる p53 変異がん細胞の増殖制御因子の同定 (2013) 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3 日~12 月 6 日

9. 小林知代、緒方広子、村上康文、河野隆志、土屋直人 肺がん細胞特異的なエクソソーム miRNA の同定 (2013) 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3 日~12 月 6 日

10. 藤原優子、西田百代、渡辺昌俊、河野隆志、中釜 斉、土屋直人 がん抑制的 miR-101 による p53 依存的チェックポイントの活性化機構 (2013) 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3 日~12 月 6 日

11. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Yamada Y, Okusaka T, Kohno T, Yokota J, Tsuchiya N. Comprehensive analysis of plasma exosomal miRNAs in patients with cancer. (2013) 第 72 回日本癌学会総会、横浜、10 月 3 日~10 月 5 日

12. Tsuchiya N, Nakagama H, Kohno T, Yokota J. Activation of G2 checkpoint by miR-101 induces p53-dependent apoptosis. (2013) 第 72 回日本癌学会総会、横浜、10 月 3 日~10 月 5 日

13. Tsuchiya N, Fujiwara Y, Nakagama H, Kohno T, Yokota J. MiR-101 as a molecular switch for sequential activation of p53-dependent G1 and G2 checkpoints in response to ribosomal stress. (2013) *Frontiers in Basic Cancer Research.* National Harbor MD. USA Sep. 18~23

14. Kobayashi T, Ogata-Kawata H, Murakami Y, Yokota J, Tsuchiya N. miRNA profiles in exosomes derived from lung cancer cells. (2012) 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12.11-12.14

15. Kimura Y, Fujiwara Y, Murakami Y, Yokota J, Nakagama H, Tsuchiya N. Cell cycle regulation by miR-532 through disruption of multiple cyclin-CDK complexes. (2012) 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12.11-12.14

16. Kurioka D, Watanabe M, Yokota J, Nakagama H, Tsuchiya N. Down-regulation of tumor-suppressible miR-22 by mutant p53 in the regulation of cell cycle. (2012) 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12.11-12.14

17. Nishida M, Fujiwara Y, Watanabe M, Yokota J, Nakagama H, Tsuchiya N. Selective Activation of p53 network by miR-101 induces apoptosis in colon cancer cells. (2012) 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12.11-12.14

18. Tsuchiya N, Yokota J, Nakagama H. Regulation of apoptosis by p53 - miR-22 - p21 axis in response to genotoxic stresses. Cell Symposia, Hallmarks of Cancer, San Francisco, CA, USA Oct. 29 -31, 2012

19. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Yamada M, Yokota J, Nakagama H, Tsuchiya N. Exosomal microRNAs as diagnostic biomarker for detection of early stages of colon cancers. (2012) 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、9.19-9.21

20. Tsuchiya N, Yokota J, Nakagama H. Cell cycle regulation by miR-101 via selective modulation of p53 network. (2012) 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、9.19-9.21

21. Tsuchiya N. Post-translational regulation of p21 by microRNA-22 determines p53-dependent cellular fate France - Japan Symposium on Cancer Research Nov. 1-2, 2011 Tokyo

22. Tsuchiya N, Kurioka D, Ogata-Kawata H, Watanabe M, Nakagama H. Mechanisms for the induction of p53-independent cell cycle arrest by tumor-suppressor miR-22. がん抑制因子 miR-22 による p53 非依存的細胞周期停止の分子機構 (2011) 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、10.3-10.5

23. Ogata-Kawata H, Tsuchiya N, Izumiya M, Yamada Y, Nakagama H. Identification and detection of exosomal microRNAs from colon cancer provide potential diagnostic biomarkers 大腸がん特異的 exosomal microRNA の同定と診断マーカーとしての検討

(2011) 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、10.3-10.5

〔図書〕(計 2 件)

1. 緒方(川田)広子、土屋直人 (2013) 血中エクソソーム中の microRNA によるがんの診断 細胞工学 Vol. 32 No. 1 85-90

2. 土屋直人、中釜齊 (2012) がん抑制的 miRNAs - 効率な単離法から機能解析まで - 遺伝子医学 MOOK 23号 126-132

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：膵臓癌の検査方法及び検査キット  
発明者：土屋直人、緒方広子、奥坂拓志、中釜齊

権利者：(独) 国立がん研究センター

種類：

番号：特願 2012-144524

出願年月日：平成 24 年 6 月 27 日

国内外の別：国内・PCT

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 直人 (Tsuchiya, Naoto)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：3 0 3 2 2 7 1 2

(2) 研究分担者

該当なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし

( )

研究者番号：