

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570201

研究課題名(和文)RAS、JUNおよびE2F制御下にある細胞周期関連マイクロRNA群の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of cell cycle-associated microRNAs

研究代表者

吉田 健一 (Yoshida, Kenichi)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：20345036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAはヒトで約1,000種類あまり知られており、がんや生活習慣病など重篤な疾患の発症や病態と密接に関与していると報告されている。本研究は、5種類の細胞周期関連マイクロRNAについて、標的遺伝子の同定とエピジェネティクスによる発現制御機構の解明を目指した。得られた知見は、がんの診断だけでなく、エピジェネティック治療やマイクロRNAの医療への応用を加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miRNA) has been shown to be involved in regulation of the etiology of serious illness such as cancer and metabolic diseases. It is estimated that human cells have approximately more than 1,000 kinds of miRNAs. In this study, we focused on five miRNAs that could be associated with cell cycle regulation and aimed to reveal functional aspects including target gene identification and epigenetic regulation of miRNAs. It is expected that the results obtained from this study would be useful not only for diagnosis of cancer but also for epigenetic therapy and for promotion of microRNA-based medicine.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

従来、タンパク質をコードする mRNA に大きな関心が払われてきたが、最近ではタンパク質をコードしないいわゆるノンコーディング RNA がさまざまな細胞の機能に深く関与していることが明らかとなりつつある。特に、22 個程度のヌクレオチドから構成される小さな RNA であるマイクロ RNA は線虫の発生段階特異的に発現変動する RNA として発見されたことを起源とする。その後、マイクロ RNA は線虫、ショウジョウバエからヒトに至る様々な生物種で発見されている。このようにマイクロ RNA は生物種間で長期にわたって保存され、重要な役割を担っていることが解明されてきた。

マイクロ RNA は、ヒトで現在約 1,000 種類あまり知られており、標的 mRNA の分解やタンパク質の翻訳抑制を介して多彩な細胞機能の制御に影響を与えていることから、ますます注目されつつある。近年ヒトにおいては、がんや生活習慣病など重篤な疾患の発症や病態と密接に関与している事実が次々と報告されている(引用文献)。

以前の研究において、がん原遺伝子であり MAP キナーゼ経路を介して細胞の増殖やストレス応答に主導的な役割を演じている RAS ならびに転写因子として細胞の成長、増殖、分化、死といった運命決定制御のハブとして機能する JUN や E2F ファミリー (E2F1 ~ E2F6) にユニークな発現制御を受けるいくつかの細胞周期関連マイクロ RNA 群を同定した(引用文献)。興味深いことに、これらマイクロ RNA 群の発現制御機構や細胞制御における機能は詳細に解明されていないのが現状である。したがって、これらマイクロ RNA の細胞機能制御における新たな知見を増やし、マイクロ RNA の重要性を確立することに貢献することを本研究では企図した。

2. 研究の目的

本研究は、申請者ががん原遺伝子 RAS ならびに転写因子である JUN や E2F による発現制御を受ける細胞周期関連マイクロ RNA として見出した 5 種類のマイクロ RNA について、エピジェネティクスを中心とした発現制御機構の解明を目指した。加えて、これらマイクロ RNA 群が標的とする新奇遺伝子群を同定することでエピジェネティクスと細胞周期に対するフィードバック制御機構を解明し、オンコ・マイクロ RNA として位置づけることを目的とした。これら諸目的の解決を通して、マイクロ RNA による細胞機能制御の全貌解明に貢献することを企図した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト肺がん細胞株 A549 およびヒト肺由来線維芽細胞株 TIG-1 は、1% 非必須

アミノ酸、1% 抗生物質 抗菌性物質 (インビトロゲン) および 10% ウシ胎仔血清を含む Earle's MEM (最小必須培地、インビトロゲン) で培養した。ヒト骨肉種細胞株 U2OS は 1% 非必須アミノ酸、1% 抗生物質 抗菌性物質 (インビトロゲン) および 10% ウシ胎仔血清を含む McCoy's 5A 培地 (インビトロゲン) で培養した。培養は 37℃、CO₂ 濃度 5% のインキュベーターで行った。

(2) 試薬

5'-アザ-2'-デオキシシチジン (以下 5-Aza-CdR、シグマ) およびトリコスタチン A (TSA、和光純薬工業) は 10 mM となるようにジメチルスルホキシド (以下 DMSO) に溶解し、-30℃ 冷蔵庫に暗所保存した。

(3) 定量的リアルタイム RT-PCR

RNA は mirVanamiRNA Isolation Kit (ライフテクノロジー) を用いて回収後、デオキシリボヌクレアーゼ I (インビトロゲン) 処理し、以下 あるいは によって発現量を解析した。マイクロ RNA は TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (アプライドバイオシステムズ) を製造元のプロトコールに従って逆転写し、TaqMan microRNA Assay (アプライドバイオシステムズ) を製造元のプロトコールに従って実施した。PCR 反応液には総量 20 µl 中に TaqMan MicroRNA Assay Primer と TaqMan Universal PCR Mix を含み、PCR 反応は 7500 Fast Real-Time PCR Systems (アプライドバイオシステムズ) を用いて 9600 Emulation にて実施した。サイクルパラメーターは、95℃ 10 分間変性後、95℃ 15 秒間と 60℃ 1 分間を 40 サイクル行った。Cycle threshold (Ct) 値は、発光基底ラインより上の閾値に到達した発光強度でのサイクル数と一致するように決定した。マイクロ RNA のプライマーは、miR-494 (Assay ID 002365)、miR-483-5p (Assay ID 002338)、miR-345 (Assay ID 002186)、miR-139-3p (Assay ID 002313) および miR-370 (Assay ID 002275) を用いた。また、マイクロ RNA の発現レベルは内在性コントロールとして RNU6B (アプライドバイオシステムズ) で補正した。データ解析は比較 Ct 法を用いた。PDE 2A は、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (アプライドバイオシステムズ) で製造元のプロトコールに従って逆転写し、Taqman Gene Expression Assay (アプライドバイオシステムズ) を製造元のプロトコールに従って実施した。PCR 反応液には総量 20 µl 中に Taqman Gene Expression Assay Primer と Taqman Universal PCR Mix (アプライドバイオシステムズ) を含み、PCR 反応は 7500 Fast Real-Time PCR Systems (アプライドバイオシステムズ) を用いて

7500 Standard にて実施した。サイクルパラメーターは、95 10分間変性後、95 15秒間と60 1分間を40サイクル行った。Ct値は、発光基底ラインより上の閾値に到達した発光強度でのサイクル数と一致するように決定した。PCRに使用したプライマー(アプライドバイオシステムズ)は、1から4すべてのバリエーションに共通のプライマー(Assay ID: Hs00159935_m1)、バリエーション3のみを検出するプライマー(Assay ID: Hs03681546_m1)である。また、mRNAの発現レベルは内在性コントロールとしてGAPDH(アプライドバイオシステムズ)で補正した。データ解析は比較Ct法を用いた。

(4) ゲノムDNA抽出とバイサルファイトシークエンシング

ゲノムDNA抽出のため、細胞にLysis Buffer(1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, 10% SDS, 4M NaCl, 20mg/ml Proteinase K)を添加後、37°Cで24時間インキュベートし、イソプロパノールを1ml加えた。次いで、MethylEasy XceedRapid DNA Bisulphite Modification Kit(Human genetic signatures)を製造元のプロトコールに従って、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。プライマー配列は、Methprimer(<http://www.urogene.org/methprimer/>)を用いて設計した。PCRはTaKaRa EpiTaq HS(for bisulfite-treated DNA)で実施した。PCR産物はプラスミドヘサブクロニング後、シーケンスを決定した。データ解析はQUantification tool for Methylation Analysis(QUMA、<http://quma.cdb.riken.jp/>)を用いた。

4. 研究成果

(1) 5種類のマイクロRNA

本研究では細胞周期関連マイクロRNAとしてmiR-494、miR-483-5p、miR-345、miR-139-3pおよびmiR-370に着目した。興味深いことに、それらは特定の染色体すなわち11あるいは14q32に位置する。さらに、それらはA549細胞においてE2F1~E2F6をそれぞれ一過性に発現させた際、ユニークな発現変動のパターンを示したマイクロRNAを含む。具体的には、miR-483-5pは活性型E2F(E2F1~E2F3)により発現上昇を示した。一方miR-139-3pは抑制型E2F(E2F4~E2F6)により発現が抑制された。加えて、miR-370は抑制型のE2F5およびE2F6により発現が抑制された。最後に、miR-345は活性型E2F(E2F1およびE2F3)により発現上昇を示すとともに、抑制型E2F(E2F5およびE2F6)により発現が抑制された。

(2) イン・シリコ解析による標的遺伝子探索

miR-494はA549細胞の増殖を抑制し老化を誘導し得ることを見出した(引用文献)。イン・シリコ解析による標的遺伝子探索と機能的な解析を実施した結果、miR-494はIGF2BP1、JUNDおよびPTENを標的遺伝子とすることが予想され、実験的にそれらのmRNAレベルを抑制することを解明した(引用文献)。この結果から、イン・シリコ解析によるマイクロRNAの標的遺伝子探索は有効であると言える。そこで、マイクロRNAの標的遺伝子探索に着手した。

マイクロRNAの標的遺伝子を探索する目的で、代表的なデータベースを用いた系統的なイン・シリコ解析を実施した。マイクロRNAのデータベースとしてはSanger miRBase(<http://mirbase.org/>)を参照し、標的遺伝子探索にはTargetRank、TargetScan、MicroCosm Targets、miRDBおよびPicTarの5つのアルゴリズムを用いた。まず、個別のアルゴリズムによって予測される標的遺伝子を同定し、さらに複数のアルゴリズムに共通した候補遺伝子を絞り込んだ。結果、miR-483-5pの標的遺伝子としてはTargetRank、MicroCosm TargetsおよびmiRDBに共通して4遺伝子が同定され、とりわけp44MAPK3は細胞増殖制御の観点から注目すべき標的遺伝子候補である。一方、miR-139-3pの標的遺伝子としてはデータベース間に共通して多くは予測されなかった。また、miR-370の標的遺伝子としては、4つのデータベースに共通した候補遺伝子としてSH3BP2のみが同定された。miR-345の標的遺伝子としては、TargetRank、TargetScan、MicroCosm TargetsおよびmiRDBに共通の候補として20遺伝子が同定され、RPA1が細胞周期S期におけるDNA複製開始に参与する遺伝子であるので細胞増殖制御の観点から興味深い。同様に、3つのデータベースに共通の遺伝子として、AKT2、EPS8、E2F3およびE2F6が同定され、これらについては下記に機能的な解析結果について記載する。

(3) レポーターアッセイによるmiR-345標的候補遺伝子の解析

3つのデータベースに共通のmiR-345標的候補として同定したAKT2、EPS8、E2F3およびE2F6については、レポーターアッセイによりmiR-345が制御し得る可能性をさらに検証した。この際、miR-345の標的遺伝子として報告されているCDKN1Aもコントロールとしてレポーターアッセイに供した。各mRNAの3'-UTR内においてmiR-345と相補鎖を形成し得る配列はTargetScanで予測した。AKT2では3カ所、E2F3とE2F6は2カ所存在したため、よりミスマッチが少ない配列を選択した。それらの配列はレポーターであるpGL3-Promoterプラスミド(プロメガ)のホ

タルルシフェラーゼ遺伝子3'-UTR内に挿入した。また、miR-345と相補鎖形成において100%一致する配列も同様にホタルルシフェラーゼ遺伝子3'-UTR内に挿入した(詳細はFukuiら、2013を参照)。ルシフェラーゼアッセイは既報の方法に準じた(引用文献)。簡単に説明すると、A549細胞へのRNA(mature miR-345あるいはネガティブコントロールRNA)とレポータープラスミドの同時トランスフェクションはAttractene(キアゲン)を使用し、0.4 µgのホタルルシフェラーゼレポータープラスミドと0.6 ngの*Renilla*ルシフェラーゼレポータープラスミドおよび6 pmolのRNAを2 µlのトランスフェクション試薬と共に60 µlのEarle's MEM中で室温15分間インキュベート後、10%ウシ胎仔血清を含むMEM 500 µl中の細胞に添加した。トランスフェクション24時間後に100 µlのPassive Lysis Buffer(プロメガ)を24ウェルプレートのそれぞれのウェルに添加し、Dual Luciferase Reporter Assay Kit(プロメガ)によりルシフェラーゼアッセイを実施した。発光強度の測定にはGloMax 20/20n Luminometer(プロメガ)を用いた。実験は少なくとも3回実施した。トランスフェクション効率を一定にするために、ホタルルシフェラーゼ活性値は*Renilla*ルシフェラーゼ活性値で標準化した。miR-345で得たルシフェラーゼ活性はネガティブコントロールRNAで得たルシフェラーゼ活性で相対化し、さらに親ベクターであるpGL3-Promoterで得られた活性値を1として際の相対値を算出した。結果、pGL3-Promoterと比較してmiR-345はpGL3-Promoter-miR-345由来のレポーター活性を約20%にまで抑制した。イン・シリコ解析で予測されたmiR-345の標的候補遺伝子AKT2、EPS8、E2F3およびE2F6の3'-UTR由来のmiR-345結合配列を有するレポーター活性はpGL3-Promoterと比較して有意($P < 0.01$, $n=3$)に抑制された(詳細はFukuiら、2013を参照)。コントロールであるpGL3-Promoter-CDKN1A由来の活性もmiR-345により有意に抑制された。

以上より、データベース検索で得たマイクロRNA標的候補のいくつかは実験上でも標的である可能性が示された。したがって、miR-345はCDKN1Aに加えAKT2、EPS8、E2F3およびE2F6を標的とすることでA549細胞の増殖や老化誘導に関与する可能性が高い。

(4) miR-483-5p安定発現A549細胞の樹立と機能解析

miR-483-5p発現プラスミド(pmR-ZsGreen1-miR483-5p)を構築するため、miR-483-5pの配列を含むゲノム領域をヒトゲノムDNA(プロメガ)からPCRにて増幅しpmR-ZsGreen1(タカラ)の緑色蛍光タンパク質遺伝子の下流に挿入した。miR-483-5p

安定発現A549細胞作製に先立ち、pmR-ZsGreen1-miR483-5p由来のmiR483-5pが機能的であることを確認するため、pmR-ZsGreen1-miR483-5pとルシフェラーゼレポータープラスミドであるpGL3-Promoter-miR-483-5pをA549細胞に共発現させ、pGL3-Promoter-miR-483-5p由来のルシフェラーゼ活性が有意に減少することを確認した。この際使用したpGL3-Promoter-miR-483-5pは上述したpGL3-Promoter-miR-345の作製法に準じた。miR-483-5p安定発現細胞株はpmR-ZsGreen1-miR483-5pあるいは親ベクターであるpmR-ZsGreen1をLipofectamine Plus(インビトロゲン)でA549細胞にトランスフェクションし、24時間後G418(インビトロゲン)を800 µg/mlの濃度で培地に添加することで作製した。これら細胞株を用いたWST-1アッセイ(ロシュ)により細胞増殖を測定した結果、3つのmiR-483-5p安定発現細胞株はコントロール細胞より増殖が抑制される傾向を示すことが判明した。

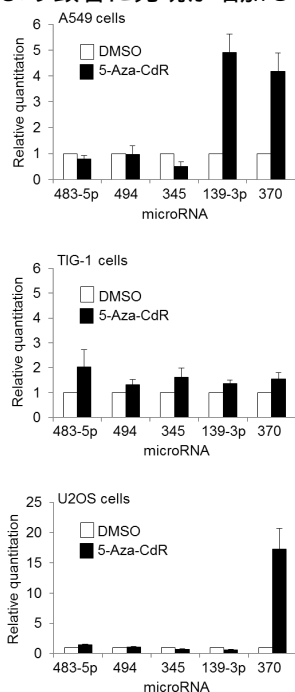
(5) miR-483-5pはp44MAPK3に加えp42MAPK1の発現を制御する可能性がある

p44MAPK3は細胞増殖に関与するmiR-483-5pの標的候補遺伝子としてイン・シリコ解析で得られた。解析を進める途上、p44MAPK3はmiR-483-5pの標的遺伝子であると報告された(引用文献)。しかしながら、p42MAPK1はmiR-483-5pの標的遺伝子ではないと結論付けられている。一方、本研究ではmiR-483-5pがp44MAPK3に加えp42MAPK1の発現を制御する可能性を見出した。具体的には、miScript miRNA Mimic Syn-hsa-miR-483-5p(キアゲン)をルシフェラーゼレポータープラスミドであるpGL3-Promoter-miR-483-5pとともにA549細胞に共発現させ、pGL3-Promoter-miR-483-5p由来のルシフェラーゼ活性が有意に減少することを確認した。次いで、miR-483-5p(200 pmol)を2日間連続してLipofectamin 2000(インビトロゲン)でA549細胞にトランスフェクションし、24時間後細胞を回収してタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析に供した。結果、miR-483-5pはp44MAPK3に加えp42MAPK1の発現を抑制した(未発表データ)。

(6) マイクロRNAの発現制御におけるエピジェネティクスの関与

5つのマイクロRNA(miR-483-5p、miR-494、miR-345、miR-139-3pおよびmiR-370)の発現制御におけるエピジェネティックな修飾の関与を調べる目的で、まずA549細胞に脱メチル化剤5-Aza-CdRを72時間投与し、発現変化を解析した。結果、コントロールであるDMSO投与と比

較して、miR-139-3p および miR-370 の顕著な発現量増加を検出した。5-Aza-CdR を投与した A549 細胞においては、miR-139-3p だけでなく miR-139-5p の発現レベルも上昇した。一方、ヒト肺由来繊維芽細胞 TIG-1 では 5-Aza-CdR 投与により発現変動を示すマイクロRNA は検出されず、ヒト骨肉腫細胞株 U2OS においては、miR-370 のみ 5-Aza-CdR 投与により顕著に発現が増加した（下図）。



さらに、A549細胞において5-Aza-CdRの72時間投与後、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を 24 時間連続投与し、5つのマイクロRNAの発現変化を解析した。結果、miR-139-3p および miR-370 は 5-Aza-CdR の単独投与時よりさらに顕著な発現上昇を示した。

興味深いことに、miR-139-3p は環状 AMP の分解に関わる PDE2A 遺伝子のイントロンに存在しており、PDE2A 遺伝子の4つのバリエーションの中で少なくともバリエーション3の発現量は5-Aza-CdR投与で上昇した。5-Aza-CdRを投与したU2OS細胞においてPDE2A遺伝子バリエーション3の発現量は変化しなかった。これらの結果より、miR-139-3p はPDE2A遺伝子の4つのバリエーションの中で少なくともバリエーション3と共発現している可能性が高く、しかも共通のエピジェネティックな制御を受けていると推察される。

ここまでの発現解析から、miR-139-3p を含む2つのマイクロRNAは、がん細胞においてDNAメチル化により発現が抑制されている可能性が高く、DNAメチル化を含むエピジェネティクスの関与を詳細に調べることで、エピジェネティクス制御機構の検出や解除によりがん細胞の診断や予防的治療に

資することができると思われる。そこで、DNAメチル化およびヒストンアセチル化がマイクロRNA群の発現制御にいかに関与しているか解明する目的で、まずmiR-139-3pの宿主遺伝子であるPDE2A遺伝子の発現制御領域についてCpG配列の有無をデータベースで検索した。カリフォルニア大学サンタクルズ校のゲノム解析データベース Human Genome Browser (<http://genome.cse.ucsc.edu/>)において、PDE2A遺伝子バリエーション2と3の転写開始点近傍に約1.1 kbpのCpGアイランドを確認した。バイサルファイトシーケンシング法によるDNAメチル化解析では、まず細胞から抽出したゲノムDNAの非メチル化シトシンをウラシルに変換した。PCR増幅し、DNAメチル化の有無を確認したCpGは、CpGアイランドの5'領域では32カ所、3'領域では30カ所である。A549細胞において、CpGアイランドのメチル化は認めず、代わりにCpGアイランドから約2 kbp上流に存在しているCpGアイランドショアの高メチル化を認めた。以上より、PDE2A遺伝子の発現はCpGアイランドよりCpGアイランドショアのDNAメチル化により制御される可能性が示唆された。DNAメチル化の有無を確認したCpGは、CpGアイランドショアでは12カ所である。

PDE2A遺伝子とは無関係にmiR-139は発現している可能性もある。まず、miR-139の上流約1 kbp領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作製し、A549細胞でルシフェラーゼアッセイを実施した。結果、miR-139上流領域を挿入したレポータープラスミドのルシフェラーゼ活性はコントロールと比較して増加した。次いで、miR-139上流のメチル化状態を確認するため、miR-139およびその上流領域をバイサルファイトシーケンシングによりメチル化解析を実施した。結果、A549細胞において、miR-139上流に存在する8つのCpG配列のうち、単一のCpG配列が高度にメチル化されていた。このことから、A549細胞では、miR-139上流において高度にメチル化された単一のCpG配列がmiR-139の発現に関与している可能性がある。

今後、マイクロRNAとエピジェネティクスの関連を更に解明することで、がんの診断だけでなく、エピジェネティック治療やマイクロRNAの医療への応用も加速することが期待される。

<引用文献>

- Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 12, 861-874, 2011.
- Ohdaira H, Sasaki T, Yoshida K. A subset of microRNAs potentially acts as a convergent hub for upstream

transcription factors in cancer cells. *Oncol Rep.* 24, 1371-1381, 2010.
Ohdaira H, Sekiguchi M, Miyata K, Yoshida K. MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. *Cell Prolif.* 45, 32-38, 2012.
Wang L, Shi M, Hou S, Ding B, Liu L, Ji X, Zhang J, Deng Y. MiR-483-5p suppresses the proliferation of glioma cells via directly targeting ERK1. *FEBS Lett* 586, 1312-1317, 2012.

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3件)

Fukui S, Kawakami C, Saigusa S, Yoshida K. DNA methylation analysis of miR-139 and its host gene PDE2A in human lung cancer A549 cells. 15th IUBMB 24th FAOBMB-TSBMB International Conference, 21-26 October 2014, Taipei, Taiwan.

Kitagawa H, Yoshida K. Regulation of ERK1 and ERK2 by microRNA-483-5p in human lung cancer cell line A549. 15th IUBMB 24th FAOBMB-TSBMB International Conference, 21-26 October 2014, Taipei, Taiwan.

福井櫻優里、川上知里、三枝聡、吉田健一
「ヒト肺癌細胞株 A549 における PDE2A 遺伝子 CpG アイランドシヨアの DNA メチル化と miR-139 発現の関連性」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド

[図書](計1件)

Fukui S, Sekiguchi M, Miyata K, Ohdaira H, Yoshida K. MicroRNA as a modulator of cell proliferation and senescence: Role in lung cancer cells. In. Series. Tumor dormancy, quiescence, and senescence - Aging, cancer, and noncancer pathologies, Volume 1. Springer, 2013, 324 pages (269-280).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 健一 (YOSHIDA, Kenichi)

明治大学・農学部・教授

研究者番号 : 20345036