

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591905

研究課題名(和文) 肺癌に関わるmiRNAクラスターの標的遺伝子群の同定と肺癌発症機構の解析

研究課題名(英文) Direct target genes of miRNAs involved in lung cancer

研究代表者

大内田 守 (Ouchida, Mamoru)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80213635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性の肺癌細胞で高発現しているmiR-17-92クラスターは、癌悪性化の原因解明の鍵となると考えられているが、その標的遺伝子についてはあまり報告されていない。我々は、そのクラスターの中でもmiR-19aに焦点を当て、miRNAの標的遺伝子予測ソフトを使用して標的遺伝子候補を抽出し、ルシフェラーゼアッセイ、pull-downアッセイ、ウエスタンブロット法によって標的遺伝子としての可能性を評価した。その結果、4つの遺伝子をmiR-19aの標的遺伝子として同定することができた。さらに、これらの遺伝子は肺癌細胞の生存率、コロニー形成能、遊走能、浸潤能を抑制することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Lately, miR-17-92, which is highly expressed in malignant lung cancer cells, is considered the key miRNA for tumorigenesis. However, its direct targets remain under reported. We identified the FOXP1, TP53INP1, TNFAIP3, and TUSC2 genes as miR-19a targets, using luciferase, pull-down, and western blot assays. The four miR-19a target cDNA expression vectors suppressed cell viability, colony formation, migration, and invasion of lung cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：microRNA 標的遺伝子 肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) miRNA は約 20~23 塩基の non-coding RNA であり、標的とする遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する部分的に相補的な配列 (miRNA 結合配列) と結合することにより、蛋白質合成を抑制的に制御している。肺癌や悪性リンパ腫においては、miR-17-92 クラスター (第 13 染色体) の過剰発現が報告されており、癌遺伝子としての機能が示唆されている。これまで我々は miRNA 異常による肺癌発症機構の解明に向けて、プロテオミクス解析による miR-17-92 の直接的な標的蛋白の同定を進めてきた。2 次元電気泳動法により検出されたスポットのうち、肺癌細胞で発現量に有意な変動が認められたスポットを液体クロマトグラフィー質量分析計にて解析し、標的蛋白質候補を同定している。

(2) 一方、疾患発症機序の解明、治療法の開発の為に、miRNA の標的遺伝子を検出する新規の実験法が必要であると考え、申請者らは miRNA の標的遺伝子 mRNA を同定する新しい方法 (IVPD 法) を開発し、国内・国際特許出願を行なった。

## 2. 研究の目的

肺癌では、microRNA(miRNA)のクラスター miR-17-92の過剰発現が発癌に関わることが報告されているが、その標的遺伝子に関してはほとんど解明されていない。申請者らは、これまで miRNA の標的遺伝子の新規同定技術の開発を行っており、この miRNA の標的遺伝子の同定技術を用いて、肺癌に関わる miRNA の標的遺伝子群の同定を行うこと、それによる肺癌発症の分子機序を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

これまでにプロテオミクス解析により検出された miR-19a の新規標的候補遺伝子、お

よび、miRNA 標的遺伝子検索プログラムソフトにて新たに同定された新規の標的候補遺伝子について、mRNA 3' 非翻訳領域における miRNA 結合配列の確認、Luciferase reporter assay、IVPD 法、Western blotting 法を行うことにより、標的遺伝子の絞り込みを行い、miR-19a の新規標的遺伝子を同定する。肺癌細胞株を用いて、得られた miR-19a の新規標的遺伝子の機能解析、細胞癌化機構への関わりを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) miR-17-92 クラスターが高発現している肺癌細胞株に miR-19a、20a、92-1 に対する anti-miRNA Locked Nucleic Acid (LNA) をそれぞれ導入した後に、2次元電気泳動と質量分析型を用いて、コントロールに比し発現上昇を示す蛋白の検出と同定を行った。これらの蛋白をコードする遺伝子の中から、その mRNA の 3' 非翻訳領域上に、対応する miRNA 結合配列を持つ遺伝子を標的候補遺伝子として選択した。miRNA が細胞内で確かに当該遺伝子を制御しているかどうかを明らかにするために、当該遺伝子の miRNA 結合配列を持つ Luciferase レポータープラスミドを作成して Luciferase アッセイを行い、miRNA により発現抑制を受ける遺伝子を絞り込んだ。

(2) miRNA の標的遺伝子 mRNA を回収する IVPD 法の最適条件 (反応条件、洗浄条件等) を検討した。HEK293 細胞から細胞抽出液を作成し、ビオチン修飾 miR-19a と結合反応させ、miRNA-mRNA 複合体をアビジンビーズで回収した。回収された RNA より cDNA を作成した。miRNA 標的遺伝子検索プログラムソフトで選択される遺伝子群のうち癌化に関わる遺伝子に絞り PCR 用のプライマーを作成した。このプライマーで上記の cDNA を増幅することで、miR-19a に結合していた mRNA を見いだした。得られた遺伝子の miRNA 結合配列を挿入したルシフェラーゼプラスミドを作成した。anti-miR-19a

(LNA)の存在下、非存在下でルシフェラーゼアッセイを行うことにより細胞内でmiRNAが作用する遺伝子を絞り込んだ。

(3)HEK293細胞にmiR-19a mimic RNAを導入してmiR-19aを増加させて蛋白発現解析を行ない、コントロールRNA導入細胞に比して蛋白量が減少するものを標的遺伝子として絞り込んだ。さらに、anti-miRNA Locked Nucleic Acid(LNA)を導入してmiR-19aをノックダウンさせて蛋白発現解析を行ない、コントロールLNA導入細胞に比して蛋白量が上昇するものを絞り込んだ。最終的に、miR-19aの標的遺伝子として4種類の遺伝子(*FOXP1*, *TP53INP1*, *TNFAIP3*, *TUSC2*)を同定した。

(4)肺癌細胞13株を用いて、miR-19aの発現量を検討した。その中で、最もmiR-19a高発現肺癌細胞と低発現肺癌細胞株を選んで、miR-19a mimic RNAおよびアンチセンスmiR-19a LNA(Locked Nucleic Acid)を導入し、確かにmiR-19aが細胞増殖の促進に関わる事、miR-19a量の変動に伴い新規標的遺伝子の蛋白質が変動する事を確認した。miR-19aの新規標的遺伝子4種のcDNA発現ベクターを作成し、miR-19a高発現肺癌細胞と低発現肺癌細胞株にTransient Transfectionにより遺伝子導入を行った。そのTransientな遺伝子導入細胞を用いて、細胞増殖能、コロニー形成能に及ぼすmiR-19aの標的遺伝子の効果・影響を検討した。その結果、新規標的遺伝子4種の導入はコロニー形成を抑制する事が明らかになった。しかし、細胞の遺伝子導入効率が非常に悪くTransient Transfection系では評価が難しいので、G418選択することにより、安定したcDNA発現ベクター導入株を単離した。

(5)樹立したそれぞれの株を用いて、増殖能、遊走能、浸潤能について確認したところ、4遺伝子とも肺癌細胞の増殖、遊走の抑制を示した。浸潤については、*TNFAIP3*, *TUSC2*は浸潤抑制能を示したが、*FOXP1*, *TP53INP1*は細胞により異なる結果を示した。以上の結果を

まとめると、我々が同定したmiR-19aの新規標的遺伝子である*FOXP1*, *TP53INP1*, *TNFAIP3*, *TUSC2*は、癌細胞において遺伝子ごとに浸潤抑制能に違いはあるものの、4遺伝子とも増殖抑制能と遊走抑制能を示した。よって、miR-19aが異常な高発現をすることにより、*FOXP1*, *TP53INP1*, *TNFAIP3*, *TUSC2*の蛋白発現が抑制され、癌の悪性化が進行すると考えられた。本研究のデータに関して論文作成と投稿を行ない、PLOS ONEに出版された。

#### 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)

Yamamoto K, Ito S, Hanafusa H, Shimizu K, Ouchida M. Uncovering Direct Targets of MiR-19a Involved in Lung Cancer Progression. PLOS ONE 10(9):e0137887 (2015). 査読有

Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, Shimizu K. Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a quantitative proteomic approach. PLOS ONE 7(8), e44095 (2012) 査読有

Itani S, Kunisada T, Morimoto Y, Yoshida A, Sasaki T, Ito S, Ouchida M, Sugihara S, Shimizu K, Ozaki T. MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). J Cancer Res Clin Oncol. 138(9), 1501-1509 (2012). 査読有

[学会発表](計 10 件)

山本久美子、伊藤佐智夫、清水憲二、大内田守. 肺癌におけるmiR-19a新規標的遺伝子の機能解析. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会. 2015年12月1-4日、神戸

Kumiko YAMAMOTO, Sachio ITO and Mamoru OUCHIDA. Analysis of the function of miR-19a target genes in human lung cancer cells. 第37回日本分子生物学会 2014年11月25-27日、横浜

Kumiko YAMAMOTO, Sachio ITO, Mamoru OUCHIDA. Identification and analysis of miR-19a target genes in lung cancer cells. 第87回日本生化学会大会、2014年10月15-18日、京都

Yamamoto K, Ito S, Hanafusa H, Miyake Y, Katayama H, Ouchida M. Target genes of miR-19a in human lung cancer cells. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸

伊藤 佐智夫、山本 久美子、大内田 守、片山 博志. Identification of direct targets of MicroRNA-29a in Esophageal cancer cell lines. 第72回日本癌学会、2013年10月3-5日、横浜

山本 久美子、伊藤佐智夫、実盛好美、花房裕子、片山博志、大内田守. Identification and analysis of miR-19a target genes. 2013年9月11-13日 第86回日本生化学会大会、横浜

伊藤佐智夫、花房裕子、山本久美子、大内田守. Identification of direct targets of microRNA-29a in esophageal cancer cells. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日、福岡

大内田守、神崎浩孝、伊藤佐智夫、実盛好美、花房裕子、田丸聖治、清水憲二. Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a quantitative proteomic approach. 第35回日本分子生物学会年会。2012年12月11-14日、福岡

山本久美子、伊藤佐智夫、花房裕子、大内田守. Search and identification of target genes for miR-19a. 第35回日本

分子生物学会年会。2012年12月11-14日、福岡

Yamamoto K, Ito S and Ouchida M. Identification of target genes for miR-19a by *in vitro* pull-down method. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19-21日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

大内田 守 (OUCHIDA Mamoru)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：80213635

### (2) 研究分担者

岡 剛史 (OKA Takashi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：50160651

伊藤 佐智夫 (ITO Sachio)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30335624