

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670510

研究課題名(和文) 転写因子LMO1が制御するmicroRNAの同定による神経芽腫治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of microRNA regulated by LMO1, a neuroblastoma oncogene

研究代表者

佐伯 宣久 (Saeki, Norihisa)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：80466200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究において、LMO1遺伝子のコピー数の増加は予後の悪い高リスク群症例に多く見られ、同遺伝子がコードする転写調節因子LMO1は神経芽腫細胞の細胞増殖を促進する機能を持つがん遺伝子であることが明らかになっている。LMO1発現抑制下での神経芽腫培養細胞の遺伝子発現解析及びmicroRNAを疑似した合成RNA (microRNA mimic)の神経芽腫培養細胞への導入実験の結果から、LMO1は細胞増殖抑制機能を持つmicroRNAの発現を間接的に抑制することにより、がん促進的に機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Overall survival for the high-risk (HR) group of neuroblastoma (NB) patients still remains at 40 to 50%, necessitating the establishment of a curable treatment. LIM domain only 1 (LMO1) gene encoding a transcriptional regulator is an NB-susceptibility gene with a tumor-promoting activity. Previously we conducted chromatin immunoprecipitation and DNA sequencing analyses on NB cell lines and identified 3 protein-coding genes regulated by LMO1. In this study, we extended our analyses to capture microRNA genes directly or indirectly regulated by LMO1. Using microarrays, we conducted a comparative gene expression analysis on an NB cell line SK-N-SH; between the cells with and without LMO1 suppression, and identified 18 microRNAs indirectly down-regulated by LMO1. They included 7 microRNAs of the let-7 family, whose cell proliferation inhibition activity was observed. Target genes of the LMO1-regulated microRNAs and their relevant pathways may be a potential therapeutic target.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：神経芽腫 がん遺伝子 転写調節因子 治療標的分子 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は白血病、脳腫瘍について頻度の高い小児がんである。神経芽腫患者は腫瘍細胞のゲノム構成や進展度などから低リスク群と高リスク群に分けることができるが、高リスク群は高頻度に転移を起こすとともに、その40-50%は治療後に再燃(手術・化学療法などにより治療に向かった病態が再度悪化すること)し、これらに対する有効な治療法がないことから、その予後は悪く(5年無再発生存率は50%以下)、新たな治療標的分子の同定が重要な課題となっている。

このような中、代表研究者らの研究により、転写調節因子をコードする LMO1 (LIM domain only 1) 遺伝子の一塩基多型と遺伝子コピー数が神経芽腫の特に高リスク群と関連すること、さらに LMO1 遺伝子が神経芽腫においてがん促進的に機能していることが明らかとなった (Wang, Saeki et al. Nature 2011)。この発見は、転写調節因子 LMO1 が発現を制御する遺伝子 (LMO1 標的遺伝子) を同定することにより、神経芽腫の特に高リスク群症例においてがん促進的に機能する分子経路を明らかにすることができること及びこの分子経路の中に新規の治療標的分子を見いだせる可能性があることを示唆するものであった。

そのため代表研究者は、神経芽腫細胞において転写調節因子 LMO1 が発現を制御する遺伝子 (LMO1 標的遺伝子) を同定するために、クロマチン免疫沈降 - DNA シークエンシング (ChIP-Seq、培養細胞内で DNA に結合している転写因子をそのまま DNA 上に架橋・固定し、この転写因子に対する抗体で免疫沈降して転写因子が結合している DNA 断片を回収し、その塩基配列を高速シークエンサーで解読すること) を実施し、ゲノム上に相当数の LMO1 結合領域を同定し、タンパクをコードする標的遺伝子に対象を絞ってさらに解析を進めたところ、LIMS1 (LIM and senescent cell antigen-like domains 1) を LMO1 標的遺伝子として同定した。LIMS1 タンパクは細胞膜において ILK タンパクと複合体を形成して様々ながん促進的シグナル伝達を行うことが他のがんでは報告されており、ILK タンパクの阻害剤を神経芽腫培養細胞に投与したところ、細胞増殖が強く抑えられることがわかった (Saeki et al. *Oncol lett* in press)。

## 2. 研究の目的

先行研究では同定する LMO1 標的遺伝子の対象をタンパクをコードする遺伝子に絞って解析を行った。近年、microRNA (タンパクをコードしない RNA の一種で、転写さ

れた mRNA の 3'UTR に結合することにより、標的となる遺伝子の発現を制御している) が、がんでは重要な機能を持つことが明らかとなっていることから、本研究では、LMO1 が発現を制御している microRNA 遺伝子 (LMO1 標的 microRNA 遺伝子) を同定することにより、神経芽腫においてそれらの microRNA 遺伝子の発現量の上昇あるいは低下を介して、LMO1 により活性化されるがん促進的分子経路を明らかにし、その分子経路を構成する分子の中に新たな創薬・治療標的分子を探索する。

## 3. 研究の方法

(1) 先行研究で実施したクロマチン免疫沈降 DNA シークエンシングで得られている LMO1 結合 DNA 断片の塩基配列を解析し、LMO1 の発現制御を受ける microRNA をゲノム網羅的に明らかにする。

(2) shRNA による LMO1 の発現抑制下での培養細胞のマイクロアレイあるいは定量 PCR による遺伝子発現解析により、直接的あるいは間接的に LMO1 による発現制御を受けている microRNA を同定する。

(3) 同定した microRNA について、それぞれの microRNA を疑似した合成 RNA (microRNA mimic) あるいは発現抑制用の合成 RNA を神経芽腫培養細胞に導入して細胞増殖への影響を調べる。

## 4. 研究成果

(1) 先行研究で実施したクロマチン免疫沈降 DNA シークエンシングにより、神経芽腫細胞 SK-N-SH のゲノム上に LMO1 の結合領域候補が相当数同定されていたが、本研究における解析の結果、その中に、近傍に microRNA 遺伝子が存在する結合領域候補が5か所見つかった。SK-N-SH 細胞に LMO1 発現抑制用の shRNA を導入し発現解析を行ったところ、これら5か所の近傍にある microRNA のうち、hsa-miR-3648 の発現量が低下していたことから、この microRNA は LMO1 により直接的に正の発現制御を受けることが示唆された。

しかしながら、SK-N-SH 細胞において hsa-miR-3648 の発現を抑制しても細胞増殖速度には変化が見られなかったことから、この hsa-miR-3648 は LMO1 の細胞増殖促進機能を媒介するものではないと判断された。

(2) 前述の LMO1 発現抑制下での SK-N-SH 細胞のマイクロアレイ発現解析により、LMO1 の結合領域近傍には存在してはいないが LMO1 の発現を抑制することにより発

現上昇する(すなわち LMO1 により発現が抑制されている) microRNA が複数同定された。これらは他の何らかの遺伝子を介して間接的に LMO1 による発現抑制を受けているものと推測された。

マイクロアレイ発現解析の結果をさらに定量 PCR により確認した結果、18 個の microRNA について間接的に LMO1 による発現抑制を受けているとの結論を得た。これらの microRNA を疑似した合成 RNA (microRNA mimic) を神経芽腫培養細胞に導入したところ、*hsa-miR-34a-5p*、*hsa-let-7a-5p*、*hsa-let-7b-5p*、*hsa-let-7c*、*hsa-let-7e-5p*、*hsa-let-7f-5p*、*hsa-let-7g-5p*、*hsa-let-7i-5p*、*hsa-miR-16-5p*、*hsa-miR-20b-5p* 及び *hsa-miR-409-3p* が細胞増殖を抑制することがわかった(図)。

以上の結果より、LIMS1 などのがん促進的遺伝子の発現を正に制御することに加えて、細胞増殖抑制機能を持つこれらの microRNA の発現を負に制御することにより、LMO1 はがん促進的に機能している可能性が示唆された。これらの microRNA が mRNA の 3'UTR に結合することにより発現を抑制している遺伝子を同定することにより、がん促進的に機能する遺伝子あるいはそれらの遺伝子が関連するがん促進的分子経路を同定することができるものと期待できる。

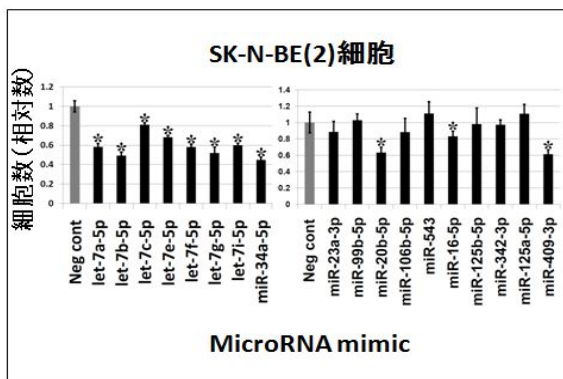


図 microRNA による細胞増殖の抑制(細胞増殖アッセイ)。RNA 導入効率のよい SK-N-BE(2)細胞を使用している。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Saeki N, Saito A, Sugaya Y, Mitsuhiro Amemiya M, Sasaki H. Tumor suppressive *let-7* family microRNAs are indirectly down-regulated by *LMO1* in neuroblastoma. *Oncol Lett* (in press, 2016). (Corresponding author) (査読あり)

Saeki N, Saito A, Sugaya Y, Mitsuhiro Amemiya M, Ono H, Komatsuzaki R, Yanagihara K, Sasaki H. Chromatin immunoprecipitation and DNA sequencing identified a LIMS1/ILK pathway regulated by an oncogenic transcription factor LMO1 in neuroblastoma. *Oncol Lett* (in press, 2016). (Corresponding author) (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

佐伯宣久. 神経芽腫において転写調節因子 LMO1 が制御する分子経路. 第 119 回日本小児科学会学術集会. 札幌 2016 年 5 月 13 日(口演発表)

佐伯宣久、斎藤聡、菅谷勇樹、雨宮光宏、小野弘恵、小松崎理絵、佐々木博己. CHIP-Seq を用いたがん促進転写調節因子 LMO1 の制御標的遺伝子同定による新たな神経芽腫治療標的分子経路の探索. 第 38 回日本分子生物学会年会. 神戸 2015 年 12 月 3 日(ポスター発表)

佐伯宣久、斎藤聡、小野弘恵、小松崎理絵、佐々木博己. がん促進転写調節因子 LMO1 の標的遺伝子探索により同定された LIMS1/ILK 分子経路は神経芽腫の新規治療標的である. 第 74 回日本癌学会学術総会. 名古屋 2015 年 10 月 10 日(口演発表)

佐伯宣久. 転写因子 LMO1 の標的遺伝子同定による新たな神経芽腫治療標的分子経路の探索. 第 118 回日本小児科学会学術集会. 大阪 2015 年 4 月 17 日(口演発表)

〔図書〕(計 0 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐伯 宣久 (SAEKI, Norihisa)  
国立研究開発法人国立がん研究センター  
研究所 主任研究員  
研究者番号: 80466200

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし