

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成28年 6月 15日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014~2015

課題番号：26670815

研究課題名(和文) 遺伝子プロモーター活性を指標とした生細胞分離技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel gene promoter activity detection system for cell isolation and characterization.

研究代表者

小崎 健一 (KOZAKI, Ken-ichi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50270715

交付決定額(研究期間全体)(直接経費)：2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新たな生細胞分離法の確立を目指して、目的とする細胞で特異的に発現する遺伝子プロモーター配列を蛍光レポーター系ベクターへ組み込み、遺伝子の転写活性を指標とした Gene Promoter Activity Detection (gPAD) システムの作成・検証を行った。具体的には、癌における上皮-間葉転換(EMT)異常の指標である間葉系マーカー ビメンチン(VIM)のプロモーター活性を指標とした gPAD システムを構築後、cell-based reporter system による機能的スクリーニングを実施した。VIM/gPAD を胃癌細胞株 MKN1 へ導入後、328 種類の miRNA からスクリーニングを実施し、癌 EMT 誘導性 miRNA-544a を同定した。さらに miR-544a が上皮系マーカー *CDH1* と Wnt シグナル抑制因子 *AXIN2* を標的とすることで Wnt および TGF $\beta$  シグナル経路を活性化して EMT を促進することを示した(Yanaka Y et al., 2015, Carcinogenesis)。以上により gPAD システムを応用した創薬スクリーニングの実施例とその有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：We established a novel gene promoter activity detection (gPAD) system and utilized it in a cell-based drug screening, in which promoter sequences of marker genes were connected with fluorescent reporter genes and inserted in stable cell clones. Concretely, we established a gPAD system with a promoter sequence of *VIM* gene that encodes mesenchymal marker vimentin in order to evaluate alteration of epithelial-mesenchymal transition (EMT) program in cancer cells and then performed functional screening using the cell-based reporter system. We established such *VIM* gPAD system within MKN1 colon cancer cells, performed screening from 328 species of miRNAs, and then identified a novel EMT-inducing microRNA miR-544a. miR-544a was shown to promote EMT through targeting *CDH1* gene, encoding an epithelial marker E-cadherin, and targeting *AXIN2* gene, encoding a Wnt signaling inhibitory factor, and thus to activate Wnt and TGF $\beta$  signaling pathways (Yanaka Y et al., 2015, Carcinogenesis). As above, an example and usefulness of gPAD system in drug screening were shown.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発現制御、遺伝子、癌、発生・分化、移植・再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

癌や発生学、再生医療分野における研究の飛躍的な進展によって、不均一な細胞集団から特定の細胞形質を有する生細胞を単離する技術の必要性が急速に高まっている。また、近年のセルソーターや遺伝子解析機器等の技術的な進歩により、一細胞単位での細胞の分離とそのオミックス解析も可能となった。しかし、生細胞の分離に関しては、抗原抗体反応による従来法での分離が不十分あるいは不可能な細胞も多く、新たな生細胞分離法の確立が待望されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、「人体のあらゆる細胞を自由自在に単離できる」新たな生細胞分離法の確立を目指して、目的とする細胞で特異的に発現する遺伝子プロモーター配列を蛍光レポーター系ベクターへ組み込んだ Gene Promoter Activity Detection (gPAD) システムの作成・検証を行った。従来の抗原抗体反応による生細胞分離法では、マーカーとしうる抗原分子が細胞表面に局在し、それに対する特異的抗体が作成可能な分子に限られるため、分離可能な細胞も限定されていた。しかし、本研究で確立を試みた gPAD システムは、遺伝子の転写活性を指標とした蛍光レポーター系であるので、限られた表面抗原やその特異抗体に依存せず、全ての遺伝子での応用が可能であるので、本研究の達成は医学生物学における研究領域全般へ大きく貢献する可能性を含んでいると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、癌における上皮-間葉転換 (EMT) 異常との関連性が指摘されている上皮系マーカーである E-カドヘリン (CDH1) や間葉系マーカー遺伝子として知られているビメンチン (VIM) のプロモーター配列等を genomic PCR 法により単離、それら配列における転写活性を確認後、単離したプロモーター領域を蛍光レポーター系ベクターへ組み込んだ gPAD システムの作成・検証を行った。さらに独自の cell-based reporter system による機能的スクリーニングを実施した。

## 4. 研究成果

VIM/gPAD システムについては、胃癌細胞株 MKN1 へ導入後、独自の cell-based reporter system による 328 種類の microRNA (miRNA) 配列の機能的スクリーニングを実施したところ、新規癌 EMT 誘導性 miRNA である miR-544a を同定した。さらに、CDH1 と AXIN2 が miR-544a の直接的標的分子であり、miR-544a が TGF- $\beta$  経路ならびに WNT 経路を活性化し、EMT を促進させることを明らかにし、gPAD システムの創薬における機能的スクリーニング・モデルとしての有用性が明らかとなった (Yanaka et al., Carcinogenesis, 2015)。

従来の細胞分離法の多くは、抗原抗体反応を用いているが、ターゲットとしうる抗原分子が細胞表面に局在し、且つ、特異抗体が作製可能な分子に限られるため、分離可能な細胞が限定されるという問題点があった。本研究で確立した gPAD システムでは、自らの転写活性により発現する蛍光シグナルを指標として選別を行うため、目的とするあらゆる遺伝子においてシステムを構築することが可能である。さらに、本研究の成果から、cell-based reporter system への導入により、創薬における機能的スクリーニング・モデルとしての有用性が明らかとなったことから、今後 EMT 関連マーカーならびに幹細胞関連遺伝子群について gPAD システムの構築と蓄積を推進することによって、同システムのライブラリー化を測ることによって、細胞の診断および創薬へと繋がる可能性がある。

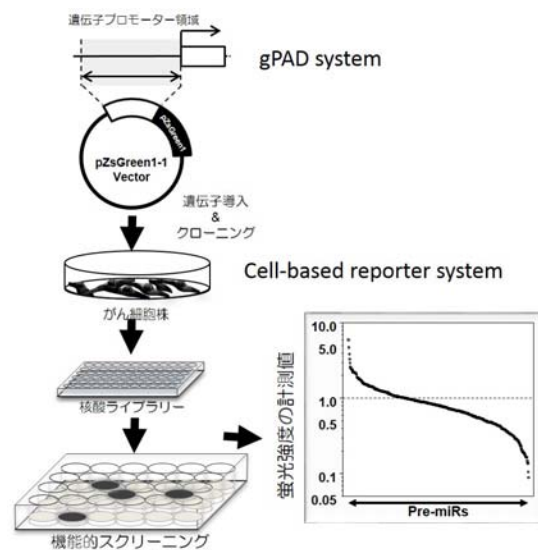


図1 gPAD systemおよび機能的スクリーニング概要

## 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 Minakuchi H., Sogawa C., Miki H., Hara E.S., Maekawa K., Sogawa N., Kitayama S., Matsuka Y., Clark G.T., Kuboki T.: Sleep bruxism frequency and platelet serotonin transporter activities in young adult subjects, *Sleep and Breathing*, 2016; 20(1), 271-276. [Epub 2015 Nov 2]. (査読有)
- ② Sogawa C., Ikegame M., Miyazaki I., Ara T., Imamura Y., Okusha Y., Ohyama K., Asanuma M., Sogawa N., Yamamoto T. and Kozaki K., Changes in metallothionein isoform expression in the bone of ovariectomized rats. *Journal of Hard Tissue Biology*, 2016; 25(1), 21-26. (査読有)
- ③ Yanaka, Y., Muramatsu, T., Uetake, H., Kozaki, K. and Inazawa, J.: miR-544a induces epithelial-mesenchymal transition through the activation of WNT signaling pathway in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 36: 1363-1371, 2015. [Epub 2015 Aug 11]. (査読有)
- ④ Fujiwara, N., Inoue, J., Kawano, T., Tanimoto, K., Kozaki, K. and Inazawa, J.: MiR-634 activates the mitochondrial apoptosis pathway and enhances chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.*, 75: 3890-3901, 2015. [Epub 2015 Jul 27]. (査読有)
- ⑤ 小崎健一: 核酸医薬への応用を目指した癌関連 microRNA の統合的スクリーニング. 岡山歯学会雑誌, 34 : 1-10, 2015. (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

1. 村松智輝, 谷中淑光, 原園陽介, 小崎健一, 稲澤譲治: miR-655 と miR-544a は EMT レポーターシステムにより同定された EMT 抑制 miRNA である. 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋), 2015 年 10 月 10 日.
2. 十川千春, 大山和美, 十川紀夫, 小崎健一: ニコチンによるノルアドレナリント

ランスポーター発現調節機構の解明. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (新潟市) 2015 年 9 月 13 日.

3. 十川紀夫, 十川千春, 大山和美, 文学方, 小崎健一: ヒスタミン H3 受容体アイソフォームの発現について. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋), 2015 年 3 月 19 日.
4. 村松智輝, 小崎健一, 井元清哉, 山口類, 津田均, 森下真紀, 河野辰幸, 宮野悟, 稲澤譲治: 高転移腫瘍における統合的解析から同定された新規治療標的経路ハイプシシカスケードの解析. 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2014 年 9 月 27 日.
5. 谷中淑光, 小崎健一, 稲澤譲治: 細胞ベースのリポーターアッセイを用いた胃癌で vimentin を発現上昇させる miRNA の探索, 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2014 年 9 月 26 日.
6. 藤原直人, 井上純, 河野辰幸, 小崎健一, 稲澤譲治: 新規癌抑制性 microRNA としての Mi-634 の同定. 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2014 年 9 月 26 日.
7. 井上純, 山本信祐, 藤原直人, 河野辰幸, 小村健, 小崎健一, 稲澤譲治: マイクロ RNA を基盤とした NRF2 活性化癌に対する診断・治療法の確立. 第 73 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2014 年 9 月 25 日.
8. 十川千春, 秦泉寺紋子, 大山和美, 宮脇卓也, 森田克也, 十川紀夫, 小崎健一: NNC05-2090 の抗アロディニア効果とその他の薬理作用について. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (福岡), 2014 年 9 月 26 日.

[図書] (計 0 件)

[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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

<http://www.hsc.okayama-u.ac.jp/mdps/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小崎 健一 (KOZAKI Ken-ichi)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50270715

(2)研究分担者

十川 紀夫 (SOGAWA Norio)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：30236153  
十川 千春 (SOGAWA Chiharu)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：10253022