

平成 22 年 2 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年 ～ 2008 年

課題番号：19590416

研究課題名 (和文)

シンテニック遺伝子トラップ法によるヒト肺がんホモ欠失領域中のがん抑制 RNA の探索

研究課題名 (英文) Investigation of tumor suppressive RNAs in homologous deleted chromosomal regions in human lung cancers by syntenic gene trapping

研究代表者 安田 純 (Yasuda Jun)

独立行政法人理化学研究所・RNA 機能研究チーム・チームリーダー

研究者番号：00281684

研究成果の概要：ヒト肺がんでは染色体異常を高頻度に認める領域に、進化的に保存されている機能性 RNA として miR-107 および-185 を見出した。これらの合成模倣体をヒト肺がん培養細胞に導入したところ、増殖抑制効果を認めた。これは細胞周期の G1 期での停止によるものであり、細胞自爆死によるものではなかった。発現プロファイル解析によって、miR-107 および 185 による細胞周期停止の分子機構はそれぞれ異なることが示された。本研究は肺がん発がんにおいて、進化的に高度に保存されている機能性 RNA が重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・ 実験病理学

キーワード：シンテニー、肺がん、マイクロ RNA、染色体欠失、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

がんは体細胞での遺伝子変異と変異クロソンの増殖の繰り返しによる多段階発がん過程をへて発症する。中でも p53 遺伝子を代表とするがん抑制遺伝子の失活が発がんに大きく寄与することは知られている。がん抑制遺伝子の失活機構には点突然変異によるタンパク質レベルでの機能不全のみならず、プロモーター領域のメチル化による発現低下、染色体欠失による遺伝子そのものの消失などがある。特に染色体の特定の領域の両アレルが欠失するホモ欠失は、その欠失領域が小

さいため比較的容易にがん抑制候補遺伝子を絞り込むことが可能であり、事実 *p16*, *p15*, *SMAD4*, *CBP*, *FHIT*, *RASSF1A* などのがん抑制遺伝子がこのようなアプローチで単離同定されてきた。しかし、すべてのホモ欠失のマッピングから候補がん抑制遺伝子の単離同定が可能だったわけではない。事実、ホモ欠失上にある構造遺伝子の機能解析や、臨床検体での点突然変異など他の構造異常の探索によっても発がんとの関連を見出すことのできない場合も多かった。一方理研ゲノム科学総合研究センターでのマウストランスク

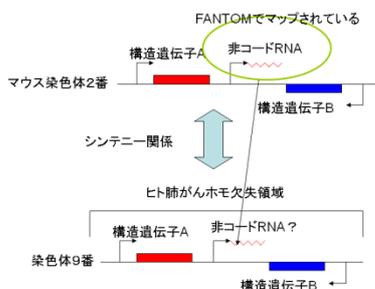
リプトーム解析は、11万を超える完全長 cDNA クローン (FANTOM クローン) や数百万個の CAGE タグマッピングに基づき、予想以上に広い範囲のゲノムが実際に細胞内で転写されていること、非常に多くの非コード RNA (ncRNA) が転写されていること、miRNA のような一部の ncRNA は切断・修飾を受けた後それ自体で機能しうることが示され、いわゆる RNA 大陸という概念が提唱されている。特にこれまでのがん抑制遺伝子探索がタンパク質をコードした構造遺伝子にのみ注意が集まっており、ncRNA に対してはそれほど注意が払われていなかった。

2. 研究の目的

ncRNA が未知のがん抑制遺伝子としてがん細胞のホモ欠失領域に存在しうると考えられる。ヒトゲノムからも非常に多くの転写産物が出ていることが内外の研究からも明らかにされており、トランスクリプトーム解析において先行しているマウスの結果をヒトゲノムからの転写活性の解析に応用することは理にかなっている。理化学研究所 ゲノム科学総合研究センターで実施されたマウストランスクリプトーム解析の結果を利用してマウスとヒトのゲノム間で近傍遺伝子の位置関係がよく保存されている部分 (シンテニー) からヒト染色体のがん特異的ホモ欠失領域にありうる非コード RNA を推定検出し、発がん抑制機構を有するか検討をすすめる。

3. 研究の方法

シンテニック遺伝子トラップ法



ヒト肺がん細胞で検出された18箇所のホモ欠失領域についてマウスとシンテニーを構築する領域をマウス側で確定する。理研ゲノム総合科学センター遺伝子構造機能研究グループによって同定された ncRNA のうち、ホモ欠失領域に対応する領域に存在するものを抽出する。また、プロモーター領域のみ保存されていると考えられるゲノム領域についても検討対象とする。相応するヒト RNA の存在の探索、同定されたマウス ncRNA の機能解析を行い、最終的にヒト肺がん発症との関連を追求する。

4. 研究成果

(1) ヒト肺がん検出された染色体コピー数異常領域とシンテニーを示すマウス染色体領域の同定および同領域中の ncRNA 発現情報の FANTOM database からの抽出研究分担者および諸外国の研究に基づき、ヒト肺がんにおけるホモ欠失領域及び遺伝子増幅領域の情報を文献的に確認した。これらのホモ欠失領域に存在する構造遺伝子を指標に、理研ゲノム総合科学センターのマウス FANTOM データベースの情報などから相応する領域を同定した。さらに同領域にマップされている ncRNA を抽出した。特にその中でも miRNA に注目し、最終的に6つの候補癌抑制 miRNA を生物情報学的に同定した。これら6種の miRNA のうち、4種類について各種のヒト組織由来の RNA において発現を確認した (図1)。

Fig. 1

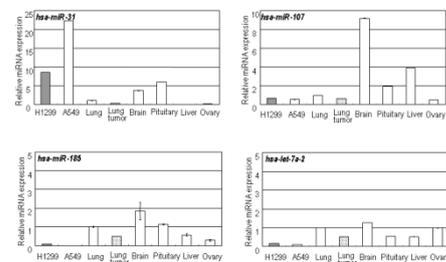


図1 肺がん染色体異常領域にマップされた miRNA の発現パターン。

(2) 染色体異常領域にマップされたヒト ncRNA のがん抑制能の検討

上記6種の miRNA の模倣体を A549 および H1299 という、2つのヒト肺がん細胞株に導入し、主に細胞増殖能を解析した。結果として miR-107、miR-185 の2つの miRNA が増殖抑制能を示した。

Fig. 2

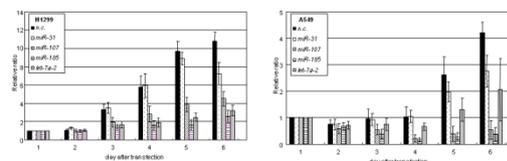


図2 miR-107, -185 による増殖抑制 この増殖抑制の程度は肺がんでは既に知られ

ている癌抑制 miRNA である Let-7 による増殖抑制効果とそん色ない程度のものであった。2種の miRNA が導入され、増殖が抑制された細胞株は形態学的には大きな変化は示さなかった。

Fig. 3

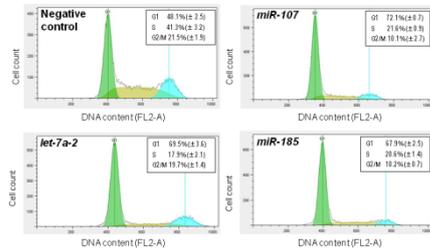


図 3 miRNA による細胞周期制御

さらにこの細胞増殖の抑制の原因を探るため、FACS による細胞周期の解析を行ったところ、どちらの miRNA も細胞周期を G1 期でブロックしていることが明らかとなり、癌抑制 miRNA として機能していることが判明した。一次構造の異なる 2つの miRNA がよく似た機能を示したことから、これらの miRNA がどのように細胞周期の進行を抑制しているのかを解明するためにこれら miRNA が発現抑制していると考えられる構造遺伝子を遺伝子発現プロファイル解析によって同定することを試みた。

Fig. 4

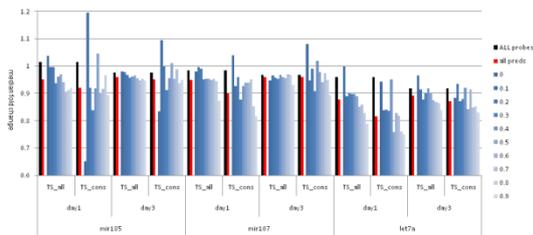


図 4 miRNA 標的の影響

これら 2つの miRNA の合成模倣体をそれぞれ細胞に導入し、しばらく培養したのちに RNA を抽出、Agilent 社製マイクロアレイによって発現プロファイルを解析した。一方でヒトゲノムにコードされているすべての mRNA のうち、これら 2種の miRNA の標的となりうる候補を Target Scan, Miranda などの解析ソフトウェアを用いてリストアップした。その結果、発現抑制を認めた遺伝子に占める標的候補の割合が統計的に有意に高いことを生物情報学的解析によって示した。

さらに我々は、これら抑制を受けた遺伝子のうち、細胞周期に関連する分子が有意に選択されているかを Entrez データベース上で解析から確認することを試みた。

cell cycle phase (304)
cell cycle process (519)
cell cycle (635)
M phase (248)
cell division (197)
mitotic cell cycle (279)
M phase of mitotic cell cycle (203)
mitosis (201)
DNA metabolic process (665)
DNA replication (190)

表 1. miR-107 によって抑制されている GO の例

実際、miR-107 によって多数の細胞周期制御関連の遺伝子が発現抑制を受けていることが今回の研究から明らかとなった。しかし、miR-185 に関してはそのような関係性は得られなかった。これらの miRNA は互いに異なる細胞内シグナルを伝達し最終的に細胞周期の進行を G1 期で抑制することを確認した。

multicellular organismal process (2482)
multicellular organismal development (1739)
organ development (900)
system development (1265)
anatomical structure development (1576)
developmental process (2503)
anatomical structure morphogenesis (831)
tissue development (234)
cell differentiation (1404)
cellular developmental process (1404)

表 2. miR-185 によって抑制されている GO の例。

また、両方の miRNA によって共通に抑制される遺伝子群を検討したが特に細胞周期制御や細胞増殖調節因子がいくつか認められた。

SMG6
FUNDC2
MUC20
BCL2L11
CCNE1
CDK6
RASSF5

RUNX3
VEGFA
XRCC3
TUBGCP3
TPD52
RAB1B
MAP9
RAPGEF1
CDK5R1

表3 2つのmiRNAによって共通に抑制されていた遺伝子の代表例

今回の研究においてはこれらの遺伝子のうち、どれが抑制されることが細胞周期開道をG1で停止させているのかについては検討を行わなかった。その根拠の一つとして、miRNAは多数の標的を同時に抑制することによってその機能を発現すると考えられており、1つ1つの遺伝子の発現の制御が細胞周期制御に必須か否かを確認することは困難であると考えられたからである。

そこで最終的にこれらのマイクロアレイ解析の結果が確かなものであるか否かをRT-PCR解析およびイムノブロット法によって確認した。

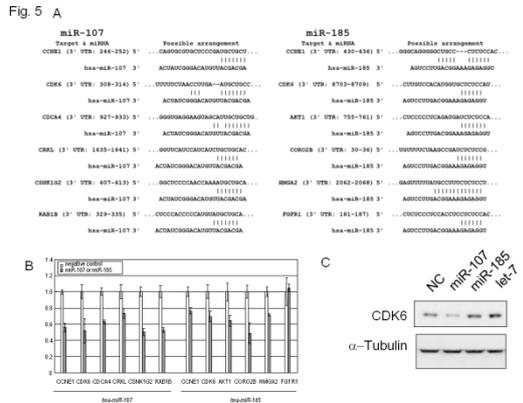


図5 想定される標的とそのRT-PCRおよびイムノブロット

今回6つの遺伝子についてRT-PCRによって発現低下を確認し、さらにそのうちの一つについてはタンパク質レベルでも発現低下を確認した。miRNAによって確かに細胞周期制御関連の遺伝子の発現が抑制されていた。

今回の研究によって、ヒト肺がんでは認められる染色体の異常領域に存在する種間で保存されている機能性RNAが癌化に関与していることが明らかとなった。また、文献的にも指摘されていたことだが、実際に細胞内においてmiRNAの標的は多数にのぼり、その配列特

異性は統計学的に有意な偏りを示す程度に強いものであることも確認された。また、多くの抑制的miRNAが細胞周期制御にかかわることも示された。我々の研究によって、miRNAをはじめとする機能性RNAが実際の癌細胞において重要な役割を果たしていることが示された。またそれらの多くは進化的に保存されている可能性があることも示された。

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)

① Takahashi, Y., Forrest, A. R., Maeno, E., Hashimoto, T., Daub, C. O., Yasuda, J. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines. PLoS One, 4, e6677, 2009, 査読あり

② 安田純, miRNA 概論—最近の知見、実験医学(増刊号 RNAの機能解明と医療応用)、26、1515-1520、2008、査読なし

③ 林崎良英, 安田純, RNA 新大陸とその臨床的意義、実験医学(増刊号 RNAの機能解明と医療応用)、26、1474-1480、2008、査読なし

〔学会発表〕(計 4件)

① 前野恵美, 林崎良英, 安田純 悪性黒色腫の転移に關与するmiRNAのスクリーニングと機能解析. 81回日本生化学会大会・31回日本分子生物学会年会合同大会. 2008年12月11日、神戸市

② 高橋由香里, 橋本健洋, Forrest A., Daub C., 前野恵美, 林崎良英, 安田純 ヒト肺がん染色体コピー数異常領域に存在するmiRNAの機能解析. 81回日本生化学会大会・31回日本分子生物学会年会合同大会. 2008年12月10日、神戸市

③ 安田純, 前野恵美, 高橋由香里, 橋本健洋, Daub C., 林崎良英, 安田純 Identification of tumor suppressive miRNAs: two different approaches. 67回日本癌学会総会、2008年10月30日、名古屋市

④ 安田純 short RNA in Cancer Research. 67回日本癌学会総会、2008年10月29日、名古屋市

〔図書〕(計 1件)

① 安田純, 癌のmiRNA-基礎的知識から臨床への展望まで、篠原出版、癌の基礎から臨床へ-ベンチからベッドサイドへ、2008、9-18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 純 (Yasuda Jun)

独立行政法人理化学研究所・RNA 機能研究チーム・チームリーダー

研究者番号： 00281684

(2) 研究分担者

前野 恵美 (Maeno Emi)

独立行政法人理化学研究所・RNA 機能研究チーム・研究員

研究者番号： 20462731

高橋 由香里 (Takahashi Yukari)

独立行政法人理化学研究所・RNA 機能研究チーム・特別研究員

研究者番号： 90469908

(3) 連携研究者

河野 隆志 (Kohno Takashi)

国立がんセンター・生物学部・室長

研究者番号： 80280783