

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790533

研究課題名 (和文) 細胞死を制御するマイクロ RNA の同定とその癌化における役割

研究課題名 (英文) Identification of microRNAs regulating apoptosis
and elucidation of their role in carcinogenesis.

研究代表者

辰巳 直也 (TATSUMI NAOYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60512960

研究成果の概要 (和文): がん細胞で高発現し抗アポトーシス機能を果たしている WT1 遺伝子が、抗癌剤ドキソルビシン処理によるアポトーシス誘導時に、その濃度依存的に発現抑制をうけることを見出した。次に、抗癌剤誘導性アポトーシス時に発現が亢進し、WT1 の発現を抑制することによりアポトーシス経路を活性化しうる microRNA (miRNA) の同定を試みた。低分子 RNA クローニング法により、抗癌剤処理により発現誘導をうける低分子 RNA を 22 種同定し、それらのなかから miR-A (仮称) が WT1 を標的としアポトーシスを制御しうることを明らかにした。さらに miR-A は肺癌患者の予後マーカーになりうることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文): We found that the expression of WT1 was suppressed in Doxorubicin (Dox)-induced apoptosis in a concentration-dependent manner. Cloning of small RNAs expressed in DOX-treated gastric cancer cells revealed twenty-two miRNAs that increased in their expression levels during this process. Among them, we identified miR-A as a miRNA that could target WT1 and regulate apoptosis. Moreover, we showed that the expression of miR-A could be a prognostic factor for non-small cell lung cancers.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：microRNA、WT1 遺伝子、アポトーシス、癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞死 (アポトーシス) の制御機構の破綻は、癌、免疫、神経変性などをはじめとする様々な疾患の直接的な原因となりうる。近年の研究報告から、アポトーシス制御機構にはタンパクをコードする遺伝子のみならず、microRNA (miRNA) などタンパクに翻訳されない低分子 RNA が重要な機能を果たして

いると考えられるようになった。さらに複数の癌で miRNA の発現異常が報告されており、miRNA と癌発症との関連が注目されるようになった。

(2) われわれはこれまでに、ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 が白血病をはじめ種々の固形癌で高頻度に過剰発現し、抗アポトーシス機能

など癌遺伝子様機能を果たすことにより癌化に深く関与することを明らかにしてきた。しかし、癌細胞で高発現する WT1 の発現調節機構は未だ不明なままである。

2. 研究の目的

種々の癌細胞において過剰発現し抗アポトーシス機能を果たす WT1 遺伝子の発現を調節する分子機序のひとつとして「miRNA による WT1 発現調節機能」を明らかにすること、およびその調節機構の破綻がアポトーシス経路や、がん化に及ぼす役割について miRNA 欠損マウスを用いて明らかにしていくこと、を目的として行った。

3. 研究の方法

(1) ドキソルビシン(DOX)によるアポトーシス誘導時の miRNA 発現プロファイル。
抗癌剤 DOX 処理(2 μ M, 12時間)によってアポトーシスを誘導した AZ-521 胃癌細胞株、および未処理の AZ-521 胃癌細胞株から、microRNA を含む 18-25 塩基の長さの低分子 RNA を変性ポリアクリルアミドゲルで泳動分離した後に抽出した。抽出した RNA の 5' 側および 3' 側に RNA アダプターを結合させて逆転写し、アダプタープライマーを用いて PCR で増幅し、低分子 RNA-cDNA ライブラリーを作製した。作製した低分子 RNA-cDNA ライブラリーを TA クローニングベクターに挿入し、塩基配列を解読することにより、それぞれの細胞における microRNA クローニング頻度を明らかにした。次に、抗癌剤処理によるアポトーシス誘導した細胞株においてクローニング頻度が増加した miRNA のなかから、in silico 解析により WT1 3' UTR 配列と高い相補性を有する miRNA を選択し、WT1 調節性 miRNA 候補とした。

(2) WT1 遺伝子を標的とする miRNA の同定。
EGFP-WT1 3' UTR レポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより、WT1 を直接の標的とする miRNA の同定を試みた。
EGFP-WT1 3' UTR reporter plasmid を作製するため、WT1 mRNA の stop codon (TGA) を含むその上流 57 塩基、stop codon より下流の 3' UTR のなかの EcoR1 site までの 837 塩基、合計 894 塩基を pEGFP-C3 vector の EcoR1 site に挿入した。このベクターを制限酵素により線形化し、エレクトロポレーション法で HT-1080 細胞に導入し、G-418 により薬剤選択し、stable clone を樹立した。これら stable clone に WT1 調節性 miRNA 候補を発現するベクターをリポフェクション法により導入し、20 時間後に EGFP 活性をフローサイトメトリーで解析した。
次に、WT1 調節性 miRNA 候補を発現するベクターを WT1 発現癌細胞に導入し、内在性 WT1

タンパクの発現をウェスタンブロッティングにて、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。

(3) 非小細胞肺癌における miR-A の発現解析。

非小細胞肺癌患者 57 名より手術時に癌組織および非癌部組織のペア検体を同意のもと得た。これらの肺癌組織およびその周辺の正常組織から TRIzol を用いて total RNA を抽出した。total RNA (1 μ g) から特異的 stem-loop RT primer を用い、miR-A 及び U6RNA の cDNA を合成した。SYBR Green 定量的 RT-PCR 法により、miR-A および U6RNA の発現レベルを測定した。MiR-A の発現レベルは U6RNA で補正した。

(4) miR-A 欠損マウスの作成。

miR-A 欠損マウスを作製するため、miR-A の上流 1.6-kb 及び下流 6.1-kb 領域を 129sv マウス ES 細胞ゲノム DNA から PCR により増幅し、それぞれを Targeting vector を作製するための 5' 側短腕、3' 側長腕とした。それら 5' 側短腕及び 3' 側長腕を pNT1.1 vector の loxP 配列で挟んだ Neo カセットの 5' 側と 3' 側 multiple cloning site にそれぞれ挿入した。作成した miR-A targeting vector をマウス ES 細胞(129sv/C57BL6)に導入し、G418 及び DT を用い positive/negative 薬剤選択を行った後、PCR スクリーニングを行い target クローンを得た。得られた target クローンを C57BL6 マウス胚盤胞にインジェクションしキメラマウスを得た。キメラマウスと C57BL6 マウスとの交配によりジャームライン伝達を確認し、F1 マウスと CAG-cre トランスジェニックマウスとの交配により Neo カセットが完全に除去された miR-A (+/-)ヘテロマウスを得た。それらの交配によって miR-A (+/+), (+/-), (-/-) マウスを得た。

4. 研究成果

(1) DOX によるアポトーシス誘導時の miRNA 発現プロファイル。

AZ-521 胃癌細胞株における WT1 タンパクの発現は、DOX の濃度依存的に、アポトーシス細胞が増加するのと相関して抑制されることを見出した。この際に、WT1 抑制因子として機能しアポトーシスに関与する miRNA を同定すべく、まず低分子 RNA クローニングによる miRNA 発現プロファイルを明らかにした。未処理の細胞から 321 クローン、DOX 処理した細胞から 367 クローンが既知の miRNA としてクローニングされ、それらの miRNA クローニング頻度を比較した。その結果、22 種の miRNA のクローニング頻度が DOX 処理した細胞において増加していることを確認した。

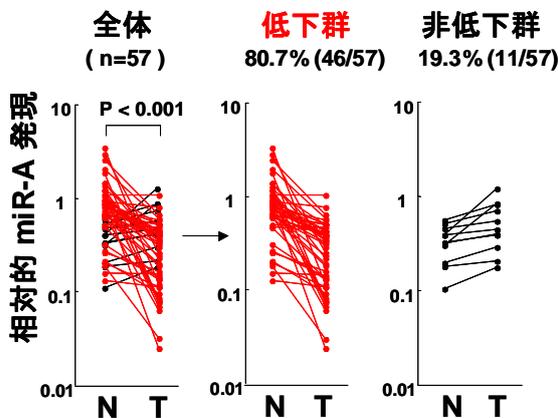
(2) WT1 を標的とする microRNA の同定

DOX 処理した細胞においてクローニング頻度が増加した 22 種の miRNA のなかから、データベース解析により、WT1 を標的とする miRNA 候補として WT1 3' UTR に高い相補性配列を有する miRNA 5 種に絞った。これらのなかから、miR-A が WT1 3' UTR を標的とし WT1 の発現を抑制すること、WT1 を発現する癌細胞にアポトーシスを誘導することを示した。さらにその効果は、miR-A の標的配列が存在する 3' UTR を欠失させた WT1cDNA の強制発現によりキャンセルされることを示した。これらの結果は、miR-A 誘導性アポトーシスは WT1 が関与するアポトーシス経路に強く依存していることを示しており、miR-A のがん化における役割をさらに検証していくことにした。

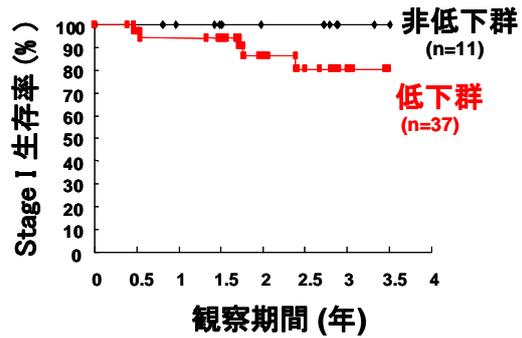
(3) 非小細胞肺癌における miR-A の発現低下
非小細胞肺癌患者臨床検体における miR-A の発現量を SYBR Green real-time RT-PCR により測定した。57 症例の肺癌組織およびその周辺の正常組織における miR-A の発現量を解析した結果、肺癌組織における miR-A の発現レベルは、正常組織に比べて有意に低下しており ($P < 0.001$)、57 症例のうち 46 症例 (80.7%) が、癌組織における発現が低下していた。残りの 11 症例 (19.3%) においては変化がなく、むしろ癌で少し発現が上昇していた (図 1-A)。さらに、肺癌組織において miR-A の発現が低下していた群 (低下群) と低下していなかった群 (非低下群) の stage I 患者の予後を比較したところ、有意差は認めなかったが、低下群の生存率は非低下群に比べて低い傾向にあった (図 1-B)。これらの結果は、miR-A の発現低下が肺癌発症や進展に関与している可能性を示すとともに、miR-A は肺癌患者の予後マーカーになりうることを示している。

図 1. 非小細胞肺癌における miR-A の発現低下

1A



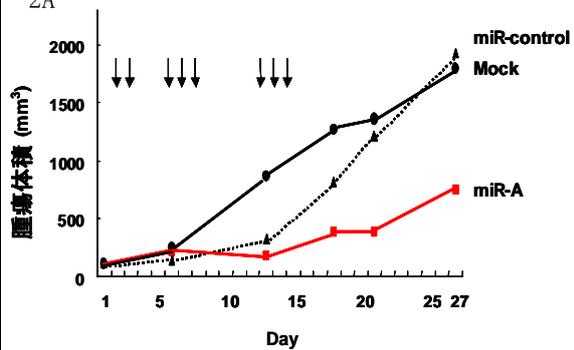
1B



(4) miR-A による in vivo 抗腫瘍効果
miR-A の in vivo 抗腫瘍効果を検討するため、HT-1080 細胞を nude mouse の腹側皮下に移植し、腫瘍生着後 miR-A 発現ベクター、miR-control ベクター、Mock ベクターを腫瘍内に投与し、週に 2 回腫瘍径を測定し腫瘍体積を算出した。3 週間経過観察した結果、miR-A は miR-control 及び Mock に比較して腫瘍の増殖を抑制した (図 2)。

図 2 miR-A による in vivo 抗腫瘍効果

2A



(5) miR-A 欠損マウスの作成。

miR-A の in vivo における機能、癌化への役割を解析するため、miR-A 欠損マウスを作成した。miR-A ヘテロ欠損マウス同士の交配により得られた miR-A (+/+), (+/-), (-/-) マウスは、PCR genotyping の結果、メンデルの法則に従っており、miR-A (-/-) マウスは見た目に正常に発育することが確認できた。また SYBR Green real-time RT-PCR により、miR-A の発現は、miR-A (+/-) ヘテロ欠損マウスにおいては野生型の約 50% に低下し、miR-A (-/-) マウスにおいては完全に消失していることを確認した。

今後、miR-A 欠損マウス表現型解析をとおり、miR-A による WT1 を含む標的遺伝子の発現調

節機構が制御する生命現象を明らかにするとともに、miRNA による制御機構ががん化において果たす役割を明らかにしていく。これらの解析によって得られる知見は、新たなヒト疾患発症機序の解明に繋がる可能性がある。

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 1 件)

福田茉莉、尾路祐介、中塚伸一、岡芳弘、坪井昭博、保仙直毅、西田純幸、辰巳直也、青笹克之、杉山治夫

ウィルス腫瘍遺伝子 WT1 の腫瘍血管内皮細胞における発現. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 24 日. 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰巳 直也 (TATSUMI NAOYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60512960