

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300318

研究課題名（和文） 発がんにおける microRNA の発現異常の意義とその分子機構の解明

研究課題名（英文） Significance and Molecular mechanisms of abnormal expression of miRNA in carcinogenesis.

研究代表者

伊庭 英夫 (Iba Hideo)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60111449

研究成果の概要（和文）：ヒトでは現在約 1000 種以上の miRNA が知られ、中でも miR-21, miR-199a, miR-200c, miR-15/-16 等はその発現レベルが癌組織において、それが由来した正常細胞のそれと比べ異常な発現レベルを示すことが知られる。本研究では、こうした miRNA の異常発現がどのように誘導されているのかを追求して、miRNA と転写制御因子やクロマチン構造変換因子の間で形成されるいくつかの重要な発現制御ネットワークを明らかにした。また我々が開発した特定の miRNA を阻害する分子(TuD)が、こうした解析にはもちろん、将来のがん治療にもたいへん有効であることを示した。(288)

研究成果の概要（英文）：

There have been reported to be about 1000 species of miRNA in human, among them, such miRNAs as miR-21, miR-199a, miR-15/-16 and miR-200c are expressed at aberrant levels in cancer tissues. In this research, we demonstrated how these aberrant expression were induced and maintained, and found in several cases, stable gene regulatory net works have been formed among the miRNA, transcription factors and SWI/SNF chromatin remodeling factors. We further show the RNA decoy molecules that we developed for the inhibitor of specific miRNA activity (designated TuD) is very effective for the analysis of molecular mechanisms and for future therapeutic application for cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：発現制御、上皮 - 間充織変換、Cdx1、miR-200c、miR-199a、miR-15/-16、Brm

1. 研究開始当初の背景  
microRNA (miRNA) は RNA 干渉により、細胞質内で標的 mRNA の発現を転写後レベルで

抑制する 20-24nt 程の non-coding RNA であり、これまでヒトでは 1000 種以上がクローニングされている。十数種類の miRNA につい

ては癌部で miRNA の発現異常が観察されることから癌の有効な遺伝子診断マーカーととらえられつつある。しかし、このような miRNA の発現異常がそれぞれどのような分子機構で引き起こされるのかはもちろん、異常な発現亢進が発がんやその進展の原因となっているのか、または結果であるのかについてすら、多くの場合わかっていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではこうした発癌に伴う miRNA の発現異常が生じる分子機構とそれが及ぼす生物学的効果を解明し、新しい治療標的を同定してその治療法を開発することを目標とする。具体的には、すでに我々の研究蓄積があるほとんどすべての癌種で発現亢進が見られる miR-21 を対照において、癌抑制活性が期待される miR15/16、癌種によって発現動態が著しく変動する miR-199a、上皮形質の維持に必須でその不活性化が、上皮-間充織変換を誘導すると報告される miR-200 の 3 種の miRNA をそれぞれ代表例として選び、これらを中心として形成される遺伝子発現ネットワークを解析する。

## 3. 研究の方法

種々のヒトがん細胞株をもちいて、miRNA のプロモーターの同定と各 miRNA の標的遺伝子群を同定する。その成果を総括し対象の miRNA が形成する発現制御ネットワークを解明するとともに、発現異常の機構に関する作業仮説を立てる。我々はこれまでに *in situ* hybridization による miRNA の高感度検出法を開発してきたが、この感度を増強する方法論を開発しながら、各種ヒトがん病理検体中の対象 miRNA やその標的タンパク質の動態と発現様式を精査して、作業仮説を検証する。また解析には従来の分子生物学的手法に加えて、我々が開発した新規のデコイ RNA (TuD と名付けた) による特定の miRNA 分子の活性抑制法を使用する。そしてヒト培養癌細胞株での解析を進め、その造腫瘍性の評価は、マウス xenograft モデルも利用したい。

## 4. 研究成果

本研究では、miR-199a が形成する遺伝子制御ネットワークの重要な骨格を解明した。すなわち一般に miR-199a-5p、-3p と Egr1 の発現が高い細胞株では、Brm の発現が低く (タイプ1)、逆に miR-199a-5p、-3p と Egr1 の発現が低い細胞株では、Brm の発現が高い傾向があることを示し (タイプ2)、こうした発現様式により多種の上皮由来のがん細胞株を大きく 2 種に分類することが可能であることを示した。さらに Brm が miR-199a-5p と -3p の標的であること、miR-199a-2 遺伝子は転写因子 Egr1 により活性化されるが、一方 Egr1 の発現は Brm により負に制御されることを示して、miR-199a/Brm/Egr1 が形成する double negative

feedback loop による分子スイッチにより上記の上皮由来細胞が 2 種のタイプに分かれていることが示された。

一方 miR-15/16 の miRNA クラスターは、慢性白血病で欠失や発現低下が見られる癌抑制活性をもつ miRNA である。我々は、腸の特異的なマーカーである Cdx1 と Cdx2 に注目して、Cdx1 の exogenous な発現が Cdx2 を post-transcriptional に抑制すること、またこの抑制には、Cdx1 の発現により発現誘導される miRNA 中の miR-9, miR-15/16, miR-22 によることを示した。すなわち、miR-9, miR-15/-16, miR-22 は Cdx2 mRNA の 3' -UTR 領域の 2~3ヶ所に結合し、その発現を協調して抑制するのである。この結果 Cdx1, Cdx2 という同じファミリーに属する転写因子のホメオスタシスの維持の機構の一側面を明らかにした。

LNA を含むプローブを利用した miRNA の *in situ* hybridization 系は、研究分担者 稲田 準教授を中心に改良を進めたが合成したプローブのロットにより、大きくシグナルの感度が影響を受けることがわかった。残念ながらいまだに安定した検出法の確立には至っていない。その結果 miR-199a-3p や -5p の検出には困難が伴ない、マウス個体実験の遂行には至らなかった。

また miR200c は上皮癌である HCT116 細胞で高レベル発現しているが、その活性を TuD-miR200c の発現ユニットを搭載したレンチウイルスベクターで導入したところ、2 週間をかけて上皮-間充織変換をおこし、間充織の性質は、その後も安定して持続した。また 2' O-Methyl 化 RNA を 2 本アニールすることにより TuD の構造を模した合成修飾 RNA (Synthetic TuD, S-TuD と名付けた) を作製して、これが既法の miRNA 阻害剤と比べて著しく低い濃度で高い阻害効率を示すことを明らかにした。実際に S-TuD-miR200c を合成し、これを Transfection 法で HCT116 細胞に導入することにより 10 日間で部分的に間充織細胞を誘導させることに成功した。TuD や S-TuD は、本研究で多くの miRNA の標的遺伝子の同定に使用され、基礎研究の重要な tool として確立したと共に、今後の癌治療においても極めて有用であることが示された。

## 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 9 件)

1. Tagawa, T., Haraguchi, T., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Inada, K., and Iba, H. Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumor cells. *Biochem. J.*, 447:449-455(2012) 査読有り

2. Kurashima, Y., Amiya T., Nochi T., Fujisawa

K., Haraguchi T., Iba H., Tsutsui H., Sato S., Nakajima S., Iijima H., Kubo M., Kunisawa, J., and Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature Communications.*, 3:1034. doi:10.1038/ncomms2023. (2012) 査読有り

3. Ishizaka, A., Mizutani, T., Kobayashi, K., Tando, T., Sakurai, K., Fujiwara, T., and Iba, H. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- $\kappa$ B RelA/p50 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 287:11924-11933 (2012) 査読有り

4. Haraguchi, T., Nakano, H., Tagawa, T., Ohki, T., Ueno, Y., Yoshida, T., and Iba, H. A potent 2'-O-methylated RNA-based microRNA inhibitor with unique secondary structures. *Nucleic Acids Res.*, 40: e58 (2012) 査読有り

5. Hikichi, M., Kidokoro, M., Haraguchi, T., Iba, H., Shida, H., Tahara, H., and Nakamura, T. MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Molecular Therapy* doi:10.1038 (2011) 査読有り

6. Sakurai, K., Furukawa, C., Haraguchi, T., Inada, K., Shioyama, K., Tagawa, T., Fujita, S., Ueno, Y., Ogata, A., Ito, M., Tsutsumi, Y., and Iba, H. microRNAs miR-199a-5p and -3p target the Brm subunit of SWI/SNF to generate a double-negative feedback loop in a variety of human cancers. *Cancer Research* 71:1680-1689 (2011) 査読有り

7. Yoshikawa, K., Ogata, A., Matsuda, C., Kohara, M., Iba, H., Kitade, Y., and Ueno, Y. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjug. Chem.* 22:42-49. (2011) 査読有り

8. Ogata, A., Furukawa, C., Sakurai, K., Iba, H., Kitade, Y., and Ueno, Y. Biaryl modification of the 5'-terminus of one strand of a microRNA duplex induces strand specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20:7299-7302. (2010) 査読有り

9. Tando, T., Ishizaka, A., Watanabe, H., Ito, T., Iida, S., Haraguchi, T., Mizutani, T., Izumi, T., Isobe, T., Akiyama, T., Inoue, J., and Iba, H. Requiem protein links RelB/p52 and the

Brm-type SWI/SNF complex in a non-canonical NF $\kappa$ B pathway. *J. Biol. Chem.* 285:21951-21960. (2010) 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

国際学会

1. Iba, H. Molecular switches formed by miR-199a and Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF chromatin remodeling factor, determine inflammation status in cancer cells. Innate Immunity Society (IEIS) meeting, 東京, 2012年10月25日

2. Kobayashi, K., Sakurai, K., Haraguchi, T., Iba, H. Identification of essential factors of SWI/SNF dependent-NF- $\kappa$ B activation and their roles in carcinogenesis. 第71回日本癌学会学術総会 札幌, 2012年9月20日

3. Iba, H. et al. : SWI/SNF complex catalytic subunit, Brm, as a key epigenetic regulator in cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会 札幌, 2012年9月19日 (シンポジウム)

4. Haraguchi, T., and Iba, H. Two methods for microRNA inhibition-TuD RNA expression vector & 2'-O-methylated RNA-based microRNA inhibitor, S-TuD. The 10<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium, 淡路, 2012年6月1日

5. 原口健、中野春男、吉田哲郎、伊庭英夫: Development of S-TuD, a novel 2'-O-methylated RNA based microRNA inhibitor with unique secondary structures. 第34回日本分子生物学会学術総会 横浜, 2011年12月13日~16日

6. Iba, H. miRNA as an epigenetic switch. The 18<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research (第18回東アジアシンポジウム), Shanghai, 2011年12月8日(招待講演)

7. 原口健、中野春男、吉田哲郎、伊庭英夫: A potent 2'-O-Methylated RNA based microRNA inhibitor with unique secondary structures. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋, 2011年10月3日~5日

8. Mizutani, T., Ishizaka, A., and Iba, H. HIV-1 promoter is negatively regulated by hnRNPA1 in Tat independent manner. 日本ウイルス学会学術集会 (IUMS Sapporo) 札幌, 2011年9月11日

9. 伊庭 英夫 Development and application of Tough Decoy (TuD) RNAs, which achieve strong and long-term suppression of specific microRNA activity. IBC's 3<sup>rd</sup> Annual

Asia TIDES 2011 年 3 月 3 日 東京

10. 伊庭 英夫 Cancer epigenetics and miRNA  
(癌のエピジェネティクスとマイクロ RNA) 第  
69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/div-host-parasite/Version1.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 伊庭 英夫

( Hideo Iba )

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60111449

(2) 研究分担者 原口 健

( Takeshi Haraguchi )

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10549455

(3) 研究分担者 小原 道法

( Michinori Kohara )

東京都医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：10250218

(4) 研究分担者 稲田 健一

( Kenichi Inada )

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：70246081

(5) 研究分担者 水谷 壮利 (H22-23 年度)

( Taketoshi Mizutani )

東京大学・医科学研究所・助教