

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3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591433
 研究課題名(和文) ビオチン標識miRNAを用いたプルダウン法による食道癌関連遺伝子の同定と機能解析
 研究課題名(英文) Identification and functional analysis of esophageal cancer-related genes by pull-down method using biotin-labeled miRNA
 研究代表者
 伊藤 佐智夫 (ITO SACHIO)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：30335624

研究成果の概要(和文)：我々は食道癌予測マーカーを同定するため、食道癌臨床検体および食道癌細胞株のプロファイリングにより分化度・悪性度に関連するmiRNAの同定を行った。その結果、低分化細胞株においてmiR-29aおよびlet-7bの発現が高いことが分かった。本プルダウン法を用いてこれらのmiRNAの標的遺伝子を同定したところ、癌抑制遺伝子やアポトーシス関連遺伝子を標的として発現抑制していることが分かった。悪性度が高い食道癌細胞株においてこれらのmiRNAは高発現しており、癌の進行に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to identify possible predictive markers, We performed the identification of miRNA related to the degree of differentiation-grade and malignancy by the profiling of esophageal cancer cell lines and esophageal cancer clinical specimens. In poorly differentiated cells, miR-29a and let-7b were overexpressed. We identified target genes of these miRNAs using in vitro pull-down method, and found some candidates of target genes related to tumor suppressor and apoptosis. Our results suggest that these miRNAs are involved in esophageal cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：食道癌、miRNA

1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は特定のメッセンジャーRNA(mRNA)の3'非翻訳領域(UTR)の相補的に

結合し、mRNAの翻訳制御とRNA interferenceによる分解を誘導する。発生や分化の方向性

を決定する分子として注目され、最近の研究においては、miRNAの発現変動には発癌やアポトーシスと密接な関連があることも報告されており、疾患との関係も注目されている。食道癌を含めた原因遺伝子が同定されていない癌に関しては、発癌においてmiRNAが癌遺伝子のように作用している可能性が大いに考えられる。また腫瘍細胞において正常細胞より発現が低下しているmiRNAは癌抑制系に関与していることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では食道癌における発癌または癌抑制に関与するmiRNAを特定することを目標とすると同時に効率的な標的遺伝子の同定法を確立することにより、これまでに明らかにされていない様々な生命活動の解明に助力したいと考えた。

- (1) ビオチン化 miRNA による pull down 法の条件設定。
- (2) 食道癌臨床検体を用いたプロファイリング (癌と正常比較)。
- (3) 食道癌細胞株を用いたプロファイリング (分化度比較)。
- (4) 標的遺伝子候補の同定。
- (5) miRNA およびその標的遺伝子の機能解析。

3. 研究の方法

(1) ビオチン化 miRNA による pull down 法の条件設定。

miRNA の標的遺伝子をバイオインフォマティクスから検索すると数百から多いものでは 1000 超もの候補が上げられてくるため、物理的に標的遺伝子を捕まえる方法を考える必要がある。センス鎖 3' 末端にビオチン標識した合成 ds-miRNA を細胞抽出液と混合し RISC 複合体に取り込ませる。標的遺伝子 mRNA の 3' UTR と結合したビオチン標識 miRNA

をストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンさせる。抽出からストレプトアビジンとの結合の間において RNA と関連タンパク質の分解を極力抑える必要があるため緩衝液組成と反応条件を設定する。

(2) 食道癌臨床検体を用いたプロファイリング (癌と正常比較)。

これまでに食道癌 5 検体の miRNA の発現比較を行い、特異的に発現変動する miRNA をいくつか得ている。その変動パターンの再現性・信頼性を上げるために、追加検体を用いて 700 種類の miRNA の発現レベルの比較を行う。

(3) 食道癌細胞株を用いたプロファイリング (分化度比較)。

癌細胞の分化度の違いから悪性度が変わってくることから、分化度に関わる miRNA を同定し、その機能解析を進めることも早期発見から治療において重要と考える。各分化度の違いから発現レベルの異なる miRNA を同定する。

(4) 標的遺伝子候補の同定。

バイオインフォマティクスから候補遺伝子を選別する。ビオチン化 miRNA の pull down 法で得られた mRNA にそれら候補遺伝子が存在するか RT-PCR を用いて調べる。

(5) miRNA およびその標的遺伝子の機能解析。

(4) で選別した標的遺伝子候補について、それらの 3' UTR をルシフェラーゼレポーターベクターに繋ぎ、細胞内での miRNA による標的遺伝子の発現抑制効果を調べる。強発現している miRNA に対して、また標的分子に対しては、siRNA {(LNA を使用)} による発現抑制の検討を行う。発現抑制の評価は Real time-PCR と Western blot で行う。さらに miRNA や標的遺伝子の過剰発現もしくはノックダウンによる細胞や生体レベルでの生理活性を調べる。

4. 研究成果

食道癌臨床検体の比較では食道癌細胞で miR92a-2*, miR155*, miR193b*, miR508-3p が高発現していることが分かった。分化度の異なる食道癌細胞株間での比較では、高分化細胞株に比べて中・低分化細胞株に高発現している miRNA を同定した。それらの中で miR-29a と let-7b は中・低分化細胞株に共通して発現が高いものであった。

標的遺伝子の同定法として、ビオチン標識したセンス鎖をもつ 2 本鎖 miRNA (ds-miRNA) を合成し、この ds-miRNA を細胞導入なしに細胞全抽出液と ds-miRNA を試験管内で相互反応させる方法を構築することにした。現時点では細胞抽出用溶液と相互反応後の洗浄溶液の組成や反応条件等は検討の余地はあるが、食道癌臨床検体および食道癌細胞株のプロファイリングから発現差のみられた miR-29a を用いた pull-down 法において、いくつかの標的遺伝子候補が得られた。それら標的には ST7-L, MAPRE3, MCC の癌抑制に関わる遺伝子があり、miR-29a 高発現細胞株ではいずれのタンパク質も発現が抑制されていた。また miR-29a 低発現細胞株においても、miR29a を過剰発現させると、これらのタンパク質の発現が顕著に抑制されることが分かった。これまでの結果から、miR-29a が食道癌の悪性度進行に関与していると示唆されるため、さらなる機能解析を行っていく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, Shimizu K. Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a

quantitative proteomic approach. PLoS One. 査読有, 2012

- (2) Itani S, Kunisada T, Morimoto Y, Yoshida A, Sasaki T, Ito S, Ouchida M, Sugihara S, Shimizu K, Ozaki T. MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). J Cancer Res Clin Oncol. 査読有, 2012, pp.1501-9
- (3) Kanzaki H, Ito S, Hanafusa H, Jitsumori Y, Tamaru S, Shimizu K, Ouchida M. Identification of direct targets for the miR-17-92 cluster by proteomic analysis. Proteomics. 査読有, 2011, pp3531-9

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 伊藤佐智夫、花房裕子、山本久美子、大内田守 Identification of direct targets of microRNA-29a in esophageal cancer cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14 福岡
- (2) 大内田守、神崎浩孝、伊藤佐智夫、実盛好美、花房裕子、田丸聖治、清水憲二 Novel direct targets of miR-19a identified in breast cancer cells by a quantitative proteomic approach 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14 福岡
- (3) 山本久美子、伊藤佐智夫、花房裕子、大内田守 Search and identification of target genes for miR-19a 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14 福岡
- (4) Kumiko YAMAMOTO, Sachio ITO, Hiroko HANAFUSA and Mamoru OUCHIDA. Identification of target genes for miR-19a by *in vitro* pull-down method 第 71 回日本癌学会学術総会、2012.9.19-21、札幌
- (5) Ito S, Hanafusa H, Ouchida M, Shimizu K. Identification of direct targets of microRNA-29a in Esophageal squamous cell carcinoma. 第 34 回分子生物学会

2011, 12, 13-16 横浜.

- (6) Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Yamamoto K, Tamura S and Kenji Shimizu K. Proteomic analysis of target genes of miR-92-1 in lung cancer. 第 34 回分子生物学会 2011, 12, 13-16 横浜
- (7) Yamamoto K, Ouchida M, Ito S, Hanafusa H and Kenji S. Identification and functional analysis of miR-19a target genes in lung cancers. 第 34 回分子生物学会 2011, 12, 13-16 横浜
- (8) Sachio ITO, Hanafusa H, Mamoru OUCHIDA, and Kenji SHIMIZU. Identification of true targets of miRNA-183 in lung cancers using labeled ds-miRNA in vitro pull-down assay. 第 33 回分子生物学会 2010. 12. 7-10 神戸
- (9) Mamoru OUCHIDA, Hirotaka KANZAKI, Sachio ITO, Kumiko Yamamoto, Seiji Tamaru and Kenji SHIMIZU. プロテオーム解析による癌細胞での miR-17-92 cluster の新規標的タンパク質の同定. 第 33 回日本分子生物学会 2010. 12. 7-10 神戸
- (10) 伊藤佐智夫、大内田守、清水憲二、肺癌における標識microRNA-183 を用いた標識遺伝子の同定、第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22-24 日 大阪
- (11) 大内田守、神崎浩孝、伊藤佐智夫、清水憲二、癌細胞における miR-17-92 cluster の新規標的タンパク質のプロテオーム解析、第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22-24 日 大阪
- (12) Hirotaka KANZAKI, Mamoru OUCHIDA, Sachio ITO, Seiji TAMARU, Hiroko HANAFUSA, Yoshimi JITSUMORI, Takashi OKA and Kenji SHIMIZU, Identification of novel direct target

of miR-19a in MCF-7 breast cancer cell. The AACR 101st Annual Meeting 2010 will be held April 17-21, 2010 in Washington, DC. (USA)

〔その他〕

ホームページ等

http://molgenet.med.okayama-u.ac.jp/Molecular_Genetics/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 佐智夫 (ITO SACHIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30335624

(2) 研究分担者

岡 剛史 (OKA TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50160651

大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80213635

(3) 連携研究者