

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08088

研究課題名(和文) 大腸癌の予後因子miR124-5pが染色体形成因子SMC4に及ぼす分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism effect of colon cancer prognostic factor, miR-124-5p on the chromosome formation molecule SMC4

研究代表者

柴山 良彦 (Yoshihiko, SHIBAYAMA)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90593822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：SMC4の機能を明らかにするため、遺伝子編集により形質転換した細胞を作成することを計画した。gRNAを挿入したCRISPR/Cas9ベクターあるいはCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドをトランスフェクションしたが、形質転換は認められなかった。そこでレンチウイルスベクターによる遺伝子導入を行い、Puromycinによる細胞選別を行ったところ、耐性細胞を効果的に選別できたが、Cas9の発現が得られなかった。これらの結果からSMC4 gRNAを含むCRISPR/Cas9の導入は困難と判断し、siRNAを導入する実験を行い、SMC4を効果的に抑制できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the function of SMC4, transformed cell deficits SMC4 gene was planned to produce using genome editing technology. The CRISPR/Cas9 vector plasmid involves gRNA or CRISPR/Cas9 knockout plasmid were transfected into the cells using the lipofection method. However, transformed cells were not produced. Next, we employed the lentiviral vector, transformed cells were obtained by selection with puromycin. However, the resistant cells expressed no Cas9. From these results, we estimated that the production of CRISPR/Cas9 including SMC4 gRNA was difficult. We performed an experiment to transfect siRNA of SMC4 into the cells, and the siRNA transfection showed excellent knockdown effect of SMC4 mRNA expression.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：大腸がん 染色体 コンデンシン マイクロRNA 遺伝子編集

1. 研究開始当初の背景

多くの癌細胞には染色体数の異常や部分的な欠損、増幅が認められる。このような異常は染色体不安定性 (chromosomal instability: CIN) と呼ばれ、大腸癌では約 85% に CIN が存在し、染色体分離の制御機構に異常があることにより生じることが知られている。CIN を生じる原因として紡錘体チェックポイントにかかわる BUB1、BUBR1、有糸分裂のチェックポイントを制御する hZw10、hZwilch、hRod、中心体形成に関わる AURKA や PLK1 の発現亢進、大腸癌の多くで欠損が認められる APC 遺伝子の異常とする説などが報告されている。しかし CIN を生じる詳細なメカニズムについて明確な結論は得られていない。

染色体凝集は高度に組織化された動的過程であり、2 つの重要な役割がある。第一は、姉妹染色体分体は互いのもつれをほどいて隣り合って並び、分裂装置が引き離す際にはすぐに分離できるように染色体を形成すること、第二に 2 つの娘細胞に分離される時、比較的もろい DNA 分子が壊れないように凝集された状態を保護することである。

染色体の凝集にはコンデンシンと呼ばれる一群の蛋白質が関与している。コンデンシンは ATP 加水分解のエネルギーを利用して 2 本のクロマチンをらせん状に巻き、分裂期染色体の 2 つの姉妹染色体分体を形成する。コンデンシンは長いループ状のクロマチンを巻き上げ、クロマチンの凝集構造の保持に重要な役割を担っている。Structural maintenance of chromosome 4 (SMC4) はコンデンシンを構成する分子の 1 つであり、SMC2、NCAP と複合体を形成している。コンデンシンを枯渇させると染色体は凝集するが、その過程は異常になることが報告されている。このように SMC4 は染色体形成に重要な役割を担っているが、大腸癌における機能や、癌の性質に及ぼす影響はほとんどわかっていない。

研究者らは切除不能大腸癌患者における血漿および腫瘍組織中における microRNA (miRNA) と腫瘍の悪性化に関与している EZH2: Enhancer of zeste homolog 2 MFGE8: Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 の発現と生存率との関係について調べた。分析した RNA 発現量と生存率の関係を調べたところ、miRNA-124-5p が相関していることを応募者らは見出した。MicroRNA-124-5p (miR-124-5p) の機能はほとんど知られていないが、miR-124-5p は大腸癌細胞において細胞増殖を抑制すること、SMC4 の発現を抑制すること、および miR-124-5p が血漿・腫瘍組織中において発現が低い場合は予後不良である可能性を報告した。

MiR-124-5p の機能はほとんど不明であり、応募者らは大腸癌細胞において細胞増殖を抑制する効果を報告した。一方、Chen らは

miR-124-5p は laminin, beta 1 (LAMB1) を神経膠腫細胞において抑制することにより、腫瘍抑制的に作用することを報告している (Neuro Oncol. 2014;16:637-51)。miR-124-5p が相補的に結合する可能性のある mRNA は研究計画の表 1 に示した遺伝子など多数存在するが、その詳細な機能は不明である。それぞれの遺伝子発現は組織により異なるため、腫瘍細胞の癌腫や異形度により miR-124-5p が細胞の機能に及ぼす影響は変化している可能性はあるが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

マイクロ RNA 124-5p (miR-124-5p) は染色体の凝集に關与する複合蛋白質コンデンシンを構成する分子の 1 つ SMC4 を標的とし、染色体不安定性、さらには細胞の癌化を促進する。本研究は両分子の関連遺伝子を同定し、それぞれの発現と変異の分子機構を解明することにより、マイクロ RNA を標的とした抗がん薬の創出およびバイオマーカー開発への道を拓く

3. 研究の方法

Bioinformatics を利用して SMC4 および miR-124-5p 関連遺伝子を予測した。MicroRNA が相補的に結合する mRNA を予測する microRNA.org は miR-124-5p の標的には SMC4 の他に LRP1B、GBAS、TAOK1、AZI2 が高い相補性を有すること (mirSVR score: -2.27 ~ -2.46) を予想している。microRNA.org は LRP1B が最も高い相補性を有することを予測している。

SMC4 の機能を解析するため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集を利用してノックアウト細胞の作成を計画した。リポフェクション法に用いるベクターは、市販の CRISPR/Cas9 All in-one ベクターに gRNA をライゲーションして組み込んだのち、コンピテントセルに導入した。カナマイシン存在下培地でスクリーニングしたコンピテントセルをピックアップし、培養した。採取したプラスミドは PCR アンプリコンをシーケンサーでベクターに組み込まれたことを確認した。精製したベクターはリポフェクション法によりトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は Puromycin により選別し、標的遺伝子のミスマッチを確認した。また遺伝子導入について GFP の発現を蛍光顕微鏡、ウエスタンブロット法で確認した。またゲノム DNA を抽出し、マーカー遺伝子の存在を、特異的プライマーを用いて確認した。

RNA 干渉の実験では合成 RNA をリポフェクション法によりトランスフェクションし、発現に及ぼす影響はリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法により確認した。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 ベクター (System

Biosciences)に、DNA2.0およびCRISPRdirectを利用して設計したgRNAを挿入し、リポフェクション法によりトランスフェクションしたが、形質転換は認められなかった。そこでCRISPR-Cas9ノックアウトプラスミドおよびHDRプラスミド(サンタクルズバイオテクノロジー)を、また、Activationプラスミドをリポフェクション法によりトランスフェクションした。Puromycinにより選別後、限界希釈法により100個程度の単一コロニーを作成したが、Cas9、GFPのマーカは蛍光顕微鏡、ウエスタンブロットング法で確認できなかった。さらにレンチウイルスベクター(SIGMA)をPolybrene存在下、HeLa、HEK293に感染させ、Puromycinによる細胞選別を行った。この方法ではPuromycinによる効果的な選別が行われ、ベクターが導入されたと考えられた。しかしながら、ゲノム編集によるDNAへの変異導入によるミスマッチが確認できず、GFPの発現も確認できなかった。そこで導入されたマーカ遺伝子をPCRで確認したところ、Puromycin耐性遺伝子は導入されていたが、cas9、GFP遺伝子は導入されておらず、レンチウイルスベクターのPuromycin耐性遺伝子のみが導入されていた。これらの結果からSMC4 gRNAを含むCRISPR/Cas9の導入は困難と判断し、siRNAを導入する実験ではSMC4のmRNA発現は 0.03 ± 0.01 、 0.12 ± 0.02 (平均値 \pm 標準誤差、それぞれHeLa、HEK293細胞)まで低下することを確認できた。

Bioinformaticsの解析ではmiR-124-5pはLRP1B(LDL receptor-related protein 1B)に相補的に結合することを予測している。そこで、miR-124-5pがLRP1Bの発現に及ぼす影響も調べた。miR-124-5p前駆体の導入により、LRP1B mRNAの発現は有意に抑制された。HeLa: Vehicle 1.00 ± 0.33 , siRNA LRP1B 0.33 ± 0.09 , miR-124-5p mimic 0.30 ± 0.11 ; HEK293: 1.00 ± 0.12 , 0.18 ± 0.05 , 0.18 ± 0.04 ; A549: 1.00 ± 0.24 , 0.24 ± 0.04 , 0.19 ± 0.02 ; WiDr: 1.00 ± 0.05 , 0.58 ± 0.03 , 0.60 ± 0.04 ; COLO201: 1.00 ± 0.06 , 0.62 ± 0.05 , 0.70 ± 0.05 ; n = 8、それぞれVehicle、siRNA LRP1B、miR-124-5p mimicの相対値を示す。平均値 \pm 標準誤差)。これらの結果からmiR-124-5pはLRP1Bの発現を低下させることが示唆された。

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 1件)

柴山良彦

最新臨床大腸癌学 - 基礎研究から臨床応用へ - 大腸癌の発癌機序: 概論(分子機構、多段階発癌機序含めて) 日本臨床増刊、2015年4月増刊号、109-115、2015。(査読あり)

[学会発表](計 4件)

坂東芳則 柴山良彦 原友貴 久保儀忠 井関健

マイクロRNA-101-5pがRAP1Aの発現に及ぼす効果

日本薬学会北海道支部会、札幌市、2017

原友貴 柴山良彦 坂東芳則 久保儀忠 井関健

マイクロRNA-124-5pがLRP1Bの発現に及ぼす効果

日本薬学会北海道支部会、札幌市、2017

柴山良彦 久保儀忠 井関健

マイクロRNA-124-5pがLRP1Bの発現に及ぼす影響

日本薬学会年会、仙台市、2017

柴山良彦 小林正紀 井関健

MicroRNA-124-5p suppresses the expression of low density lipoprotein receptor-related protein 1B

第89回日本薬理学会年会、横浜市、2016

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴山良彦 (SHIBAYAMA, Yoshihiko)

北海道医療大学薬学部 薬剤学(製剤学)教授

研究者番号: 90593822

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

井関健 (ISEKI, Ken)

北海道大学大学院薬学研究院 臨床薬剤学
講座 教授

研究者番号： 40203062

(4)研究協力者

()