

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19045

研究課題名(和文)患者由来XGマウスを用いたIGBP1関連miRNAの肺癌治療における機序の検討

研究課題名(英文)Lung cancer treatment trial using IGBP1 related miRNA by Patient derived Xenograft mouse.

研究代表者

坂下 信悟(SAKASHITA, Shingo)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40620638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌において、IGBP1は癌の進行に関与しており、miRNAによって制御されている事が知られている。今回我々は、miRNA34b、とmiRNA3941がIGBP1と関連している事を解明し、これらのmiRNAを用いた治療が、肺癌細胞株において有用である事を示した。特に、miRNA3941はIGBP1の制御に非常に特異的であった。miRNA3941に関してはacute lymphoblastic leukemiaで報告があるものの、固形がんに関する報告はなく、今回の我々の報告は、世界で初めての報告となった。

研究成果の概要(英文)：In lung adenocarcinoma, IGBP1 is related to cancer progression and controlled by some microRNAs. We revealed that miRNA34b and 3941 were related with IGBP1 and treatment using these miRNA were effective in vivo using lung cancer cell line. Especially, miRNA3941 is more specifically related to IGBP1. There are also a limited number of reports indicating that miR 3941 is associated with malignant tumors such as acute lymphoblastic leukemia (ALL). The present report is a first to have indicated a biological effect of miR 3941 in solid tumors.

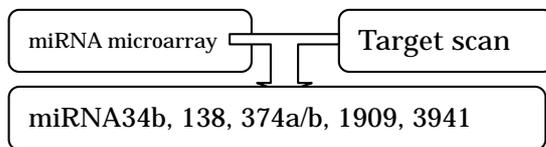
研究分野：診断病理学

キーワード：肺腺癌

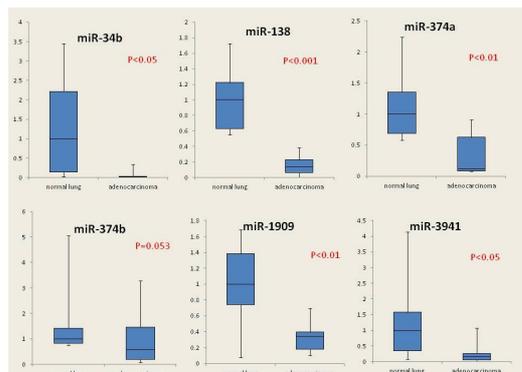
1. 研究開始当初の背景

当研究室で注目している IGBP1 (Immunoglobulin-binding protein 1) は PP2Ac (Protein phosphatase A Catalytic unit) と結合する事で抗アポトーシス機能を果たす事が知られている。我々の先行研究にて、肺癌細胞株においてもこの結合による抗アポトーシス機能が働いている事、肺癌の外科材料に対する免疫組織化学的検討にて、肺腺癌の進行により IGBP1 の蛋白発現が上昇する事が確認され、次に、我々は何故 IGBP1 が高発現しているかに注目した。

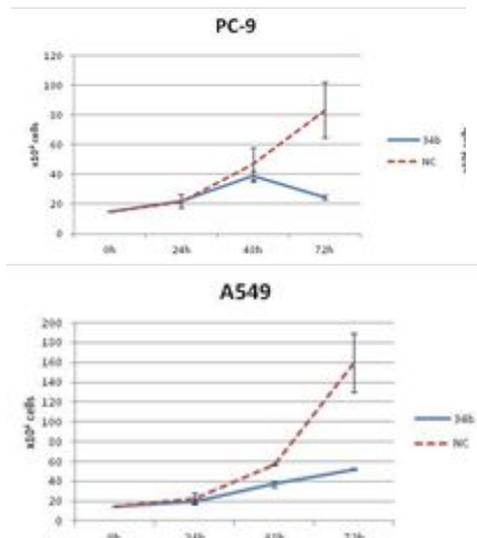
文献的に IGBP1 の発現が microRNA によって制御されている事が推察されていたが、それ以上の詳細な検索はされていなかったため、我々は、IGBP1 高発現の原因として miRNA に注目し、IGBP1 高発現の miRNA と IGBP1 低発現の miRNA を miRNA array を用いて比較する事によって、miR34b、138、374a/b、1909、3941 の miRNA を候補 miRNA として同定した。



これらの候補 miRNA についてはヒト肺癌切除術材料を用いた検討で、肺腺癌で発現が落ちている事が確認されていた。



また、miRNA34b については細胞株を用いた治療実験で、治療効果が確認されていた。



2. 研究の目的

この研究の目的は、IGBP1 の発現が、我々がそれらの候補 miRNA によって本当に制御されているのかを確認し、miRNA を用いた治療可能性を細胞株、患者由来の Xenograft マウスを用いた治療実験により明らかにする事であった。

3. 研究の方法

(1) 候補 miRNA と IGBP1 との結合の確認
ルシフェラーゼレポーターアッセイ

Origene Technologies (Rockville, MD) より、IGBP1 の 3' -untranslated region (UTR) の配列を含んだ firefly luciferase reporter plasmid (MirTarget-IGBP1-3' UTR, cat no #SC204862) を購入した。また miR-3941 の標的配列に変異を挿入した pMirTarget-IGBP1-3' UTR-Mut を作製するため、WT clone をテンプレートとして IGBP1 3' UTR 変異配列を増幅し、pMirTarget plasmid の SgfI と MluI の制限酵素配列間に挿入した。

細胞株は A549 を用いておこなった。すなわち、pMirTarget-IGBP1-3' UTR または pMirTarget-IGBP1-3' UTR-Mut と miRNA mimic または negative control RNA duplex (NC duplex, ThermoFisher Scientific) をそれぞれ FuGene HD transfection reagent (Promega, Madison, WI) 、 lipofectamin RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) を用いて、96 ウェルプレートに播種した細胞株にコトランスフェクションした。内因性コントロールとして pRL-TK (Promega) も同時にトランスフェクションした。

A549 は計 48 時間培養した後に、luciferase activity を dual-luciferase reporter assay kit (Promega) とマイクロプレートリーダー (Varioskan LUX, ThermoFisher scientific) を用いて計測した。

(2) miRNA のトランスフェクションによる IGBP1 の制御

：miRNA mimic と IGBP1-specific siRNA のトランスフェクション

IGBP1 の制御には候補 miRNA を用いたものと、IGBP1 そのものを knock down する二つの方法を用いて比較した。すなわち、miRNA については miRNA mimic (ThermoFisher Scientific) 、 IGBP1 については IGBP1-specific siRNA (siIGBP1) を用い。(配列は後述)。それに加えて scrambled RNA (Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex, ThermoFisher scientific) と lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) を Opti-MEM/ reduced serum medium (ThermoFisher Scientific) を 6 ウェルプレート上で混合した。室温で 20 分反応させた後に、それぞれ antibiotics-free の RPMI 培地、DMEM/F12 培地で懸濁した細胞株を混合液に加えて 37 °C、5%CO2 の条件で 24 時間から 72 時間培養した。miRNA mimic の最

終濃度は 30nM である。なお細胞株は PC-9 い
および A549(濃度は 6 万/ml)を用いた。

si IGBP1 の配列

5' -GAUCCUGAGAGAAAGAGACUCUUA-3'

: IGBP1 mRNA 発現の検討

RNA 抽出

mirVana miRNA isolation kit
(ThermoFisher Scientific)を用いて total
RNA を抽出した。メーカー提供のプロトコル
に従った。それぞれの mature miRNA の分析
のために、TaqMan MicroRNA Reverse
Transcription Kit (ThermoFisher
Scientific) およびそれぞれの miRNA に特異
的な primer(TaqMan microRNA assay,
ThermoFisher Scientific)を用いて total
RNA を逆転写した。内因性コントロールとし
て、U6 snRNA を使用した。

Real-timePCR

GeneAmpVR 7300 Sequence Detection System
(ThermoFisher Scientific)による miRNA の
リアルタイム RT-PCR (real-time RT-PCR)を
TaqMan Universal PCR Master Mix II
(ThermoFisher Scientific)を用いて施行し
た。IGBP1 の mRNA の評価では、Highcapacity
cDNA Reverse Transcription Kit
(ThermoFisher Scientific)と Power SYBR
Green PCR Master mix (ThermoFisher
Scientific)を用いて逆転写および
real-time RT-PCR を施行した。

IGBP1 の real-time RT-PCR に使用したプライ
マー

forward;

5' -GGCATCAACTTCTAACTCATCTCG-3' ,

reverse;

5' -CTCATACCACTCACTCACCGTCAT-3' .

18S real-time RT-PCR に用いたプライマーの
配列

forward; 5' -ACTCAACACGGGAAACCTCA-3' ,

reverse; 5' -AACCAGACAAATCGCTCCAC-3' .

: IGBP1 蛋白発現の検討

Protease と phosphatase inhibitor
cocktail (ThermoFisher Scientific)を含ん
だ、M-PER Mammalian Protein Extraction
Reagent (ThermoFisher Scientific)を用い、
氷上で細胞ライセートを調整した。ライセ
ートを 4 で 10 分間遠心し、不溶性の分画を
除去した。BCA protein assay kit
(ThermoFisher Scientific)を用いてタン
パク質の濃度を測定した。タンパク質溶液
(20 µg)と loading buffer、DTT を混合して、95
で 5 分間変性させた後に、10%または 12%
Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio-Rad
Laboratories, Hercules, CA)を用いて電気
泳動した。タンパク質は iBlot™ gel
transfer system (ThermoFisher Scientific)

を用いて polyvinylidene difluoride
membrane に転写した。ブロッキングの後に一
次抗体を反応させた。

抗体リスト

・ IGBP1

(1:200, Sigma-Aldrich Co),

・ -actin

(1:5000, ThermoFisher Scientific)

・ caspase 3

(1:500, Cell signaling technology,
Denvers, MA),

・ cleaved caspase 3

(1:500, Cell signaling technology)

・ PARP

(1:1000, Cell signaling technology)

続いて、Horseradish peroxidase を結合し
た二次抗体と反応させ、SuperSignal West
Femto Maximum Sensitivity substrate
(ThermoFisher Scientific)と ChemiDoc
Touch Imaging System (Bio-Rad
Laboratories)を用いてバンドを可視化した。

アポトーシス検出の陽性コントロールに
は、camptothecin (Sigma-Aldrich Co, final
concentration 10 µM)で処理した PC-9 の
ライセートを用い、陰性コントロールには、未
処理の PC-9 ライセートを用いた。

(3)細胞株を用いた治療効果の確認

WST-8 アッセイ

6 ウェルプレートに細胞株を播種して培養
した。細胞数は血球計数機で測定した。
Cell counting kit-8 (DOJINDO, Kumamoto,
Japan)を用い、プロトコルに従って WST-8
アッセイを施行した。Flexi Vector system
(Promega)を用いて IGBP1 ORF 配列を
pF4A_CMV Flexi vector (Promega)に挿入し
た。miR-3941 mimic と同時に pF4A_CMV_IGBP1
(pIGBP1)を細胞株にトランスフェクシ
ョンし、miR-3941 による細胞数の抑制効果
が消失するかも検討した。陰性コントロール
として pGFP を使用した。

4 . 研究成果

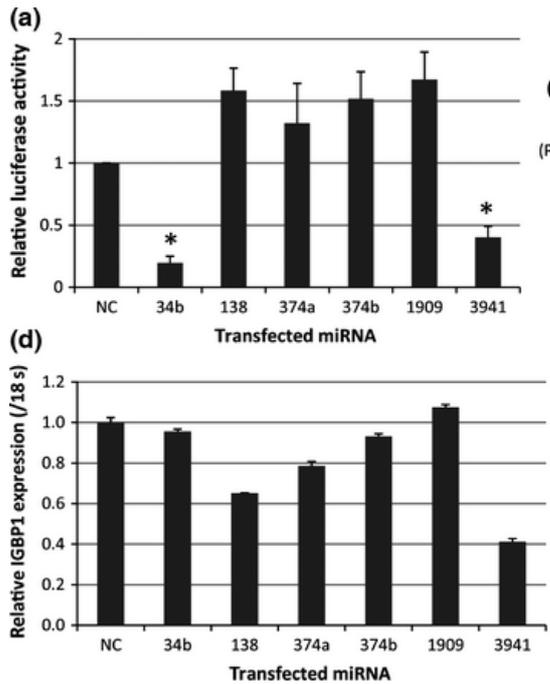
当初の研究の目的に記載した通り、
miRNA34b の transfection が、抗腫瘍効果
がある事が細胞株を用いた実験により明ら
かになっており、IGBP1 と関連がある事を
予想していた。

miRNA34b は IGBP1 の他にも(BCL2, CCND1,
CCNE2, CDK4, MYC, MYCN, MET, HMGA2, SIRT1,
CD44 and FRA1)などの良く知られた多数の
遺伝子群を制御しており、この点も腫瘍発
生および進行に重要な役割を果たしている
という仮説に大きな根拠を与えるものでは
なく、これをを用いる治療実験を行う予
定であった。

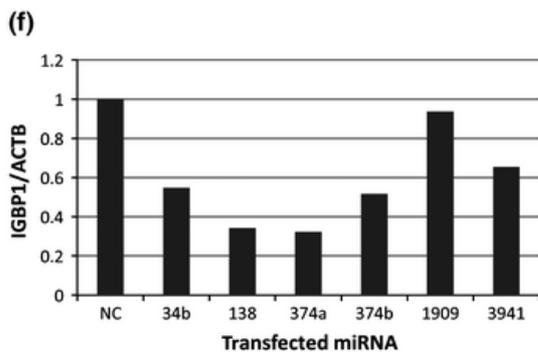
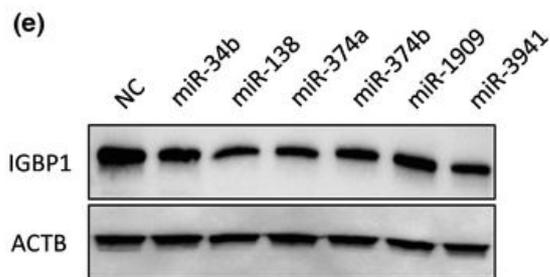
目的に書いた通り、研究計画の時点では、
データベースで、miRNA34b と IGBP1 が関

っている事、癌の正常で miRNA34b に違いが認められていたものの miRNA34b と IGBP1 との結合は確認されておらず、ルシフェラーゼアッセイを行って、結合を確認するところから実験を始めた。

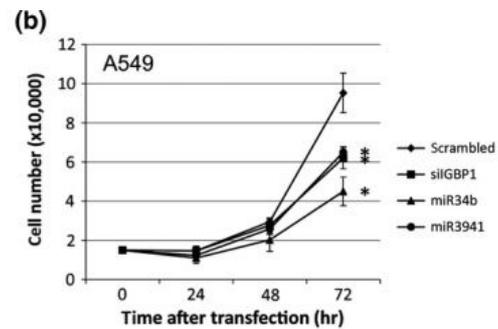
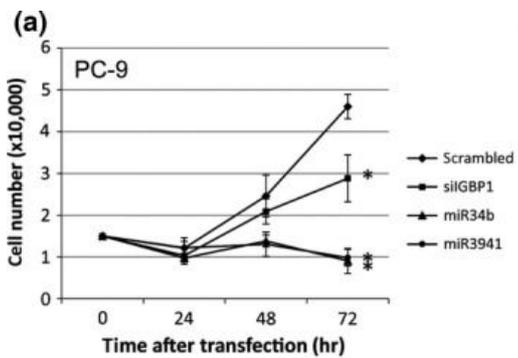
この実験で候補 miRNA のうち miRNA34b と miRNA3941 が結合している事が確認され、mRNA の発現も低下させることがわかった。



また、ウェスタンブロットにて、IGBP1 の蛋白発現についても、低下させることがわかった。

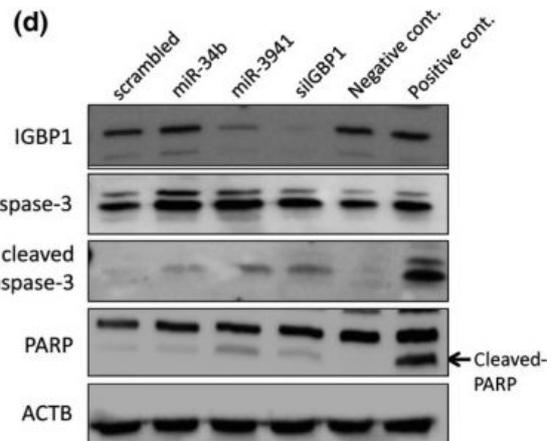


以上の結果を基に miRNA34b と miRNA3941 を用いて治療実験を行った。

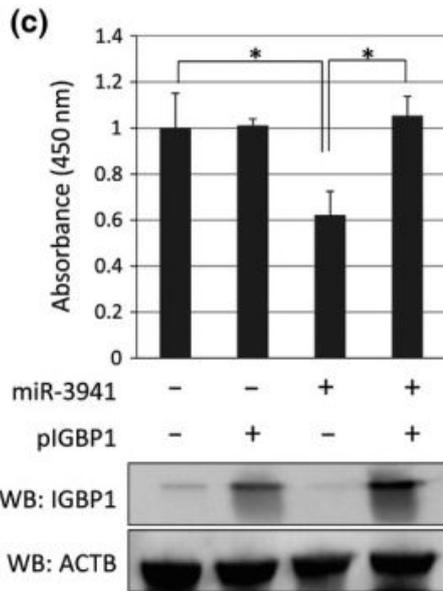


予想された通り、細胞株を用いた治療実験において、miRNA34b および miRNA3941 に治療効果が認められた。

そして、その原因として IGBP1 の知られた機能である抗アポトーシス機能の抑制である事が判明した。



しかも、miRNA34b よりも、miRNA3941 が IGBP1 のタンパクレベルを抑制していることが判明した。



miRNA3941 は、急性リンパ性白血病において報告があるものの、癌においてはまだ報告がなく、固形癌においては我々の報告が世界で初めての報告であった。

総括

ルシフェラーゼアッセイなどの手技の問題で非常に時間を費やしたため、当初の予定であった、「患者由来 XG を用いた治療実験」にまでたどりつかなかったが、一つ一つの実験を確認しながら行ったことにより、miRNA3941 が IGBP1 を介して肺癌の増殖抑制に関わっているという事を明らかにすることができた。固形癌における miRNA3941 は世界で初めての報告である。

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 1 件)

Taiki Sato, Aya Shiba Ishii, Yunjung Kim, Tomoko Dai, Ryan Edbert Husni, JeongMin Hong, Junko Kano, Shingo Sakashita, Tatsuo Iijima, Masayuki Noguchi

miR 3941: A novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma

Cancer Science, 2017 Mar; 108(3): 536-542

doi: 10.1111/cas.13148

(査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 106 回病理学会総会(京王プラザ、東京、2017 年 4 月 27 日~29 日)

miR-3941 は IGBP1 の発現を制御し、肺腺癌の悪性化に参与する。佐藤泰樹、柴綾、Kim Yunjung、臺知子、Husni Ryan E、Hong JeongMin、加野准子、坂下信悟、野口雅之

IASLC 17th World Conference of Lung Cancer(Congress center, Vienna, Austria, 27-29/Apr/2017) miR 3941: A novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma

Taiki Sato, Aya Shiba Ishii, Yunjung Kim, Tomoko Dai, Ry, Shingo Sakashita, Masayuki Noguchi

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂下 信悟 (SAKASHITA Shingo)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 40620638

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者: なし