

令和元年6月16日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15601

研究課題名(和文) 複数のマイクロRNA産生制御を介した新規癌治療法の開発を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of miRNA biogenesis which is involved in tumorigenesis for approach to cancer therapy

研究代表者

樋口 琢磨 (HIGUCHI, Takuma)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：10754567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：二本鎖RNA結合タンパク質であるNF90はNF45と複合体を形成し、miRNAの初期転写産物(pri-miRNA)に結合することで複数のmiRNAの生合成を阻害する。しかしながら、NF90が産生制御するpri-miRNAの特徴は不明である。本研究で我々は、NF90と結合するpri-miRNAの構造的特徴を解析し、NF90が「ミスマッチの少ないステム構造」を有するpri-miRNAに強く結合することを見出した。加えて、我々はがん抑制miRNAであるmiR-7がNF90の発現を抑制することも明らかとし、がん部で発現増加しているNF90とmiR-7の間にフィードバックループが存在することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NF90とNF45の複合体はがん部で高く発現しており、がん抑制作用を有する複数のmiRNAの生合成を阻害している。本研究の成果より、NF90の結合するpri-miRNAの構造が同定できたため、その情報を元に、内在性pri-miRNAよりもNF90-NF45に対して結合性の高いオリゴヌクレオチド(デコイRNA)を作製することが可能となった。デコイRNAはNF90-NF45のmiRNA生合成阻害機能を抑える効果が期待できるため、新規のがん治療法開発の礎となることが想定される。

研究成果の概要(英文)：(1) Nuclear Factor 90 (NF90), which is double stranded RNA binding protein, and NF45 form a heterodimer complex (NF90-NF45). In cancer tissues, NF90-NF45 is known to bind to primary miRNAs (pri-miRNAs), resulting in an inhibition of anti-oncogenic miRNA biogenesis. However, a common characteristic of pri-miRNA for NF90 binding motif is still unclear. In this study, we found that NF90 preferentially binds to pri-miRNAs that have a structure of straight stem with few mismatches.

(2) We demonstrated that miR-7, an anti-oncogenic miRNA, regulates the expression of NF90. Taken together with our previously findings that NF90-NF45 suppresses miR-7 biogenesis, it suggests that the level of NF90 is increased by a negative feedback loop between NF90 and miR-7 in tumor tissues under physiological conditions.

Based on (1) and (2), we would expect to be applied oligo RNAs, which have a NF90 binding motif, and miR-7 to cancer therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA結合タンパク質 miRNA NF90 がん RNA二次構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロ RNA (miRNA) は約 22 塩基の機能性小分子 RNA であり、相補的または一部相補的なメッセンジャー RNA (mRNA) の 3' 非翻訳領域に結合し、mRNA の翻訳抑制および分解を引き起こす。miRNA は、その機能を通じて細胞の増殖や分化など様々な生命現象の調節に関与することが知られている。加えて miRNA は、発がんやがんの悪性化に関与することがわかってきている。特に、がんにおいて発現低下している miRNA の中にはがん抑制作用を持つ miRNA (anti-oncomiR) が含まれており、がん部において anti-oncomiR の発現を回復または補充することが新規のがん治療法に繋がるのではないかと期待されている。一方で、がん部における anti-oncomiR の発現低下メカニズムについては未だ不明な点が多い。

申請者はこれまで、二本鎖 RNA 結合タンパク質である NF90 (別名 ILF3, NFAR1, DRBP76) が結合パートナーである NF45 と複合体を形成し、miRNA の初期転写産物 (pri-miRNA) に結合することで、複数の miRNA の生合成経路を阻害することを *in vitro* 及び *in vivo* の両面で明らかにしている (Sakamoto, Higuchi [3 番目] *et al.*, MCB, 2009) (Todaka, Higuchi *et al.*, MCB, 2015)。さらに我々は、肝がん手術標本のがん部において NF90 及び NF45 の発現が増加しており、発現増加した NF90-NF45 は anti-oncomiR の一つである miR-7 の生合成を阻害することで、細胞増殖促進的に機能することを見出した (Higuchi *et al.*, JBC, 2016)。加えて、NF90-NF45 は miR-7, miR-181a, miR-193a/b, miR-133b, let-7 といった anti-oncomiR に分類される複数の miRNA の生合成経路を抑制することが明らかとなっている。一方で、NF90-NF45 は炎症促進・がん化促進的に作用する miR-21 の初期転写産物との結合性が低く、miR-21 の産生については影響を与えないことから、NF90-NF45 は特定の RNA に選択的に結合することが想定される。一方で、上記の NF90-NF45 が結合する anti-oncomiR の初期転写産物には「共通する配列」が認められなかった。このことから、NF90-NF45 が pri-miRNA に結合する際には「構造的特徴」を認識することで、複数の anti-oncomiR の生合成を制御することが想定できる。

上記の知見を受け、申請者は新規がん治療法の候補として『NF90-NF45 の pri-miRNA 結合能を阻害し、複数の anti-oncomiR の産生を回復させることで腫瘍化を抑制する手法』の開発の着想に至った。

(2) NF90 は肝細胞がんや肺がん、乳がん、結腸がん、膀胱がんのがん部で、NF45 は肝細胞がん、肺がん、結腸がんのがん部で高く発現している。前述の通り、NF90-NF45 は複合体を形成し、miRNA の生合成経路を負に制御することから、がん部で発現増加した NF90-NF45 は様々な anti-oncomiR の生合成を阻害することでがんの増悪化に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、がん部において NF90 及び NF45 が発現増加するメカニズムは未だ不明な点が多く残されている。がん部における NF90 および NF45 の発現制御機構を明らかにすることは、前述の『NF90-NF45 の pri-miRNA 結合能を阻害し、複数の anti-oncomiR の産生を回復させることで腫瘍化を抑制する手法』を医療に応用する際の重要な知見となりえる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、NF90-NF45 が結合する pri-miRNA の結合様式 (構造的特徴) を明らかにすることである。得られた構造的特徴を元に、NF90-NF45 が内在性 pri-miRNA よりも優先的に結合するオリゴヌクレオチド (デコイ RNA) を作製できれば、デコイ RNA による NF90-NF45 の RNA 結合能阻害を介した新たながん治療法開発に繋がる。

### 3. 研究の方法

(1) NF90-NF45 と pri-miRNA が結合する際には、NF90 が直接 pri-miRNA と結合し、NF45 は NF90 の RNA 結合能を向上させるという役割を担う。NF90-NF45 が結合する可能性のある pri-miRNA の候補を絞り込むため、国際共同研究を通して、RNA 結合タンパク質が結合する RNA を網羅的に解析した eCLIP-seq データベース「ENCORD」を利用し、NF90 が結合する可能性のある候補 pri-miRNA を探索した。得られた候補 pri-miRNA の配列を用いて放射性同位体標識した RNA-probe を作製し、リコンビナント NF90 との結合性を検討する RNA ゲルシフトアッセイを実施した。また、候補 pri-miRNA の二次構造を「RNAfold software」および「mfold」により解析し、NF90 が結合する RNA 二次構造の特徴を探索した。得られた RNA 二次構造の特徴を変化させるように変異を導入した変異型 RNA-probe を作製し、野生型 RNA-probe と比べて NF90 に対する結合能が変化するか否かを RNA ゲルシフトアッセイにより検証した。

(2) NF90-NF45 が産生制御する miRNA の標的を探索する中で、miR-7 の予測標的配列が NF90 mRNA 上に存在することが新たに判明した。そこで、培養細胞に miR-7 または miR-7 anti-sense 阻害剤を導入し、ウエスタンブロッティングおよび qRT-PCR により NF90 の発現量への影響を検討した。またレポーターアッセイを用いて、NF90 mRNA に対して miR-7 が直接作用するかを検証した。

#### 4. 研究成果

(1)- NF90-NF45 により生合成経路が阻害される miRNA を探索する中で、申請者らは国際共同研究により NF90 が結合する可能性のある pri-miRNA の候補として pri-miR-3173 を見出した。そこで、pri-miR-3173 と NF90 が結合するかどうかを検討するため、RNA ゲルシフトアッセイを実施した。その結果、NF90 は pri-miR-3173 と直接結合しており、その結合活性は pri-miRNA のプロセッシングを促進するマイクロプロセッサーの構成因子である DGCR8 よりも強いことが明らかとなった。また、pri-miR-3173 は miRNA 生合成制御の中心因子である Dicer の pre-mRNA 上に存在し、NF90 による pri-miR-3173 のプロセッシング抑制が Dicer の発現を促進することも合わせて見出した。

本研究により、Dicer の発現には NF90 による pri-miR-3173 のプロセッシング阻害が重要であることが示唆された。本研究成果は、主な発表論文等の[雑誌論文]リスト(3)として発表した(Barbier, Higuchi[6 番目] et al., Cell Res, 2018)。

(1)- さらに我々は国際共同研究を通して、eCLIP-seq の結果を集めたデータベースである「ENCORD」のデータを用いて NF90 と結合している pri-miRNA を探索した。その結果、既に報告している pri-miR-3173 の他に NF90-NF45 が結合してプロセッシング制御を行う候補として、pri-miR-186、pri-miR-1273c、pri-miR-3189 を見出した。上記の pri-miRNA と NF90 との結合活性を RNA ゲルシフトアッセイにより解析した結果、NF90 と結合性が低いと予測される pri-miR-200a と比較し上記の pri-miRNA は NF90 と顕著に結合していた(図 1)。

さらに「RNAfold software」および「mfold」を使用して、NF90 が結合する RNA の二次構造の特徴を解析した。その結果、NF90 が結合する pri-miRNA はミスマッチが少ないステム構造を有することが示唆された。そこで、変異導入によりステム構造を変化させた pri-miRNA probe を用いて再度 RNA ゲルシフトアッセイを行った。RNA ゲルシフトアッセイの結果、NF90 と強く結合する pri-miR-3173 のステム構造にミスマッチを導入した変異体は、野生型 pri-miR-3173 と比較し NF90 との結合能が大幅に減少した(図 2 右側、pri-miR-3173 WT vs pri-miR-3173 Mut1 および Mut2)。さらに、NF90 との結合性が低い pri-miR-200a のステム構造からミスマッチを減らした変異体は、野生型 pri-miR-200a よりも強く NF90 と結合していた(図 2 左側、pri-miR-200a WT vs pri-miR-200a Mut)。以上の結果より、NF90 はミスマッチが少ないステム構造を有する pri-miRNA に対して高い結合性を有することが明らかとなった。

一方、本研究では NF90-45 に強く結合し内在性 miRNA の産生を回復させる「デコイ RNA」の作製・効果検証には至らなかった。今後、本研究成果を元にデコイ RNA の作製に取り掛かる予定である。

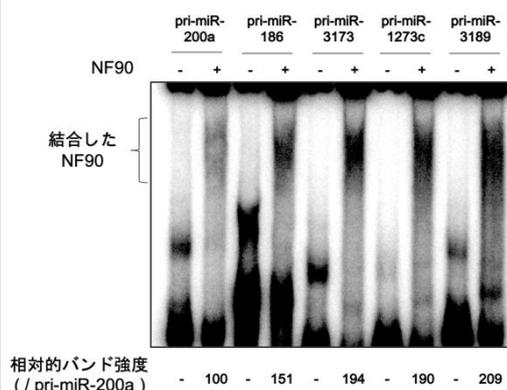


図 1 各pri-miRNAに対するNF90の結合能の検討

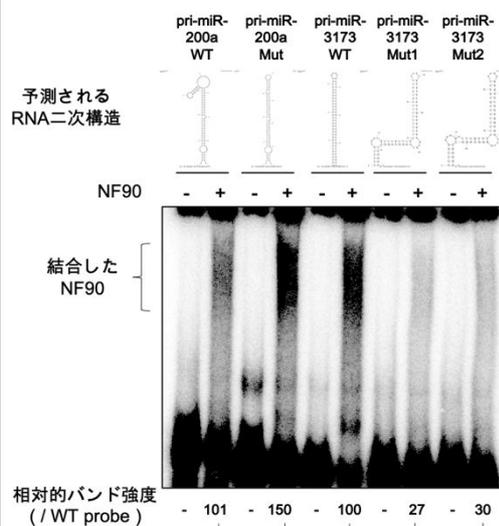


図2 NF90 は ミスマッチの少ないステム構造を有する pri-miRNA に結合する

(2) NF90 mRNA 上には miR-7 の予測標的配列が存在する。miR-7 は NF90-NF45 が産生制御する antionco-miR の一つであるため、NF90 と miR-7 の発現にはフィードバックループが存在する可能性が考えられる。そこで、培養細胞に miR-7 または miR-7 antisense 阻害剤を導入した際の NF90 の発現への影響を検討した。その結果、NF90 の発現が高い Huh7 細胞においては、miR-7 の導入により RNA およびタンパク質レベルで NF90 の発現が顕著に低下した。また、NF90 の発現が低い SK-N-SH 細胞において miR-7 antisense 阻害剤を導入することで、NF90 の発現増加が認められた。次に、上記の miR-7 予測標的配列を組み込んだレポーターベクターを作製し、miR-7 が予測標的配列に直接作用しているかの検討を行った。レポーターアッセイの結果、miR-7 の導入により予測標的配列を有するレポーターベクターの活性は有意に低下した。さらに、予測標的配列に変異を導入したレポーターベクターの活性は、miR-7 を導入した場合でも有意な変化は見られなかった。

以上の結果より、miR-7 は NF90 mRNA を直接の標的として、その発現を抑制することが明らかとなった。これまでの我々の知見と今回の結果から、がん部において発現増加している NF90 と anti-oncomiR である miR-7 の間にはフィードバックループが存在することが示唆された(図 3)。本研究成果は、主な発表論文等の[雑誌論文]リスト(2)として発表した (Higuchi *et al.*, BBRC, 2018)。

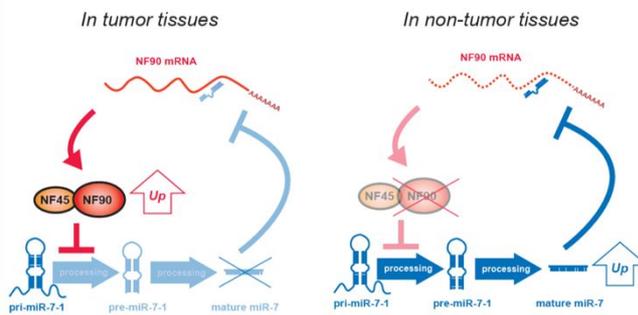


図3 NF90とmiR-7の発現を制御するフィードバックループモデル

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)[筆頭著者論文:1件、共著者論文:2件]

- (1) Tatsuto Nakane, Ayae Ido, **Takuma Higuchi**, Hiroshi Todaka, Keiko Morisawa, Tadashi Nagamine, Kensaku Fukunaga, Shuji Sakamoto, Koji Murao, Yasunori Sugiyama  
Candidate plasticity gene 16 mediates suppression of insulin gene expression in rat insulinoma INS-1 cells under glucotoxic conditions.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読あり, 512(2):189-195. 2019  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.036
- (2) **Takuma Higuchi**, Keiko Morisawa, Hiroshi Todaka, Sylvia Lai, Eunsup Chi, Kazutsugu Matsukawa, Yasunori Sugiyama, Shuji Sakamoto  
A negative feedback loop between Nuclear Factor 90 (NF90) and an anti-oncogenic microRNA, miR-7.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読あり, 503(3):1819-1824. 2018  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.119
- (3) Jérôme Barbier, Xin Chen, Gabriel Sanchez, Muyan Cai, Marion Helmsmoortel, **Takuma Higuchi**, Pierre Giraud, Xavier Contreras, Gangjun Yuan, Zihao Feng, Rima Nait-Saidi, Olivier Deas, Lisa Bluy, Jean-Gabriel Judde, Sylvie Rouquier, William Ritchie, Shuji Sakamoto, Dan Xie & Rosemary Kiernan  
An NF90/NF110-mediated feedback amplification loop regulates dicer expression and controls ovarian carcinoma progression  
*Cell Research*, 査読あり, 28, 556-571. 2018  
DOI: 10.1038/s41422-018-0016-8.

[学会発表](計14件)[筆頭演者:3回、共同演者:11回]

- (1) 坂本修士、森澤啓子、**樋口琢磨**、Sylvia Lai、戸高寛、池恩燮、杉山康憲、津田雅之  
骨格筋において二本鎖 RNA 結合タンパク質複合体 NF90- NF45 の過剰発現が引き起こす筋成熟化抑制  
第41回日本分子生物学会年会, 2018年12月
- (2) Sylvia Lai、**樋口琢磨**、杉山康憲、森澤啓子、津田雅之、坂本修士  
RNA 結合タンパク質複合体 NF45-NF90 は膵細胞のアポトーシスを抑制する  
第41回日本分子生物学会年会, 2018年12月
- (3) **樋口琢磨**、戸高寛、森澤啓子、Sylvia Lai、池恩燮、杉山康憲、坂本修士  
Nuclear Factor 90(NF90)の発現は miR-7 を介したフィードバックループにより制御される  
第91回日本生化学会大会, 2018年9月
- (4) 中根達人、井戸彩詠、**樋口琢磨**、戸高寛、坂本修士、村尾孝児、杉山康憲  
膵臓細胞における CPG16-JDP2 を介した新規インスリン発現抑制機構の解明  
第91回日本生化学会大会, 2018年9月
- (5) 中根達人、井戸彩詠、**樋口琢磨**、戸高寛、坂本修士、村尾孝児、杉山康憲  
膵臓細胞における CPG16-JDP2 を介した新規インスリン発現抑制機構  
第59回日本生化学会中四国支部例会, 2018年5月
- (6) 飯田悟史、藤井修作、井戸彩詠、戸高寛、**樋口琢磨**、坂本修士、村尾孝児、杉山康憲  
膵臓細胞におけるコレステロール合成を介したインスリン発現抑制機構  
第59回日本生化学会中四国支部例会, 2018年5月

- (7) **樋口琢磨**、宗景玄祐、矢生健一、Sylvia Lai、松川和嗣、津田雅之、小野正文、坂本修士  
NASH モデルマウスの肝細胞において Nuclear Factor 90 の発現は増加する  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月
- (8) 坂本修士、森澤啓子、Sylvia Lai、**樋口琢磨**、戸高寛、池恩燮、杉山康憲、津田雅之  
骨格筋において過剰発現した NF90-NF45 は赤筋化を誘導する  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月
- (9) Sylvia Lai、**樋口琢磨**、津田雅之、森澤啓子、杉山康憲、坂本修士  
RNA 結合タンパク質を介した新たな膵 細胞増殖機構の解明  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月
- (10) 藤井修作、飯田悟史、戸高寛、**樋口琢磨**、坂本修士、村尾孝児、杉山康憲  
膵臓 細胞におけるコレステロール増加はインスリン発現を抑制する  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月
- (11) 井戸彩詠、**樋口琢磨**、戸高寛、坂本修士、村尾孝児、杉山康憲  
糖毒性状態の膵臓 細胞において Dcl1 はインスリンの発現を抑制する  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月
- (12) 宮野友里、本郷新、田村慎之介、**樋口琢磨**、坂本修士、枝重圭祐、松川和嗣  
凍結乾燥によるマウス胚性線維芽細胞の保存  
Cryopreservation Conference 2017, 2017 年 11 月
- (13) 藪本美月、岩本侑希子、**樋口琢磨**、坂本修士、森澤啓子、岩佐茜、久保里加、宅谷はるこ、竹中由布、竹村泰雄、垣淵和正、石田豊、松川和嗣  
夏期の柚子果皮給与が褐毛和種高知系の肥育に与える影響 - オミクス解析による検討  
日本畜産学会 第 123 回大会、2017 年 9 月
- (14) **樋口琢磨**、三輪武司、森澤啓子、Sylvia Lai、坂本修士  
二本鎖 RNA 結合タンパク質によるケモカイン CXCL5 の発現制御を介した癌細胞の浸潤能制御機構の解明  
第 58 回日本生化学会中国・四国地区支部例会, 2017 年 5 月

[ その他 ]

(1) **受賞：優秀研究賞**

第 58 回日本生化学会中国・四国地区支部例会, 2017 年 5 月

(高知大学 HP, <http://www.kochi-u.ac.jp/information/2017052900026/> )

( 第 58 回日本生化学会中国・四国地区支部例会 HP, <http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~seikagaku2017/> )

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 坂本 修士

ローマ字氏名：SAKAMOTO, Shuji

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系基礎医学部門

職名：准教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。