

平成 23 年 2 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590408
 研究課題名（和文）トランスジェニックマウスを用いた microRNA の発生・発癌における機能解析
 研究課題名（英文） Analysis of development and cancer in microRNA transgenic mice

研究代表者

岩本 隆司（IWAMOTO TAKASHI）
 中部大学・生命健康科学部・教授
 研究者番号：60223426

研究成果の概要（和文）：マイクロ RNA という小さな分子をマウス生体内で強制的に発現させることにより発生・発達や癌などの疾患に対する影響を検討した。その結果 miR-143 はヒトの家族性大腸ポリポーシスのモデルマウスの小腸腫瘍発症を有意に押さえることを示し、またそれらの抑制シグナル伝達経路を明らかにした。mir-143 を強発現する腫瘍では原癌遺伝子 c-Myc の発現が抑えられる事が腫瘍発生抑制に密接に関連していた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we analyze the effect of microRNAs, recently discovered small non-coding RNAs, on the development and pathogenesis of cancer using their transgenic mice. We show that the tumor development of the small intestines of APC^{min} mice, which are model mice of familial adenomatous polyposis, is inhibited when crossed to miR-143 transgenic mice. We also demonstrate that proto-oncogene c-myc is downregulated in transgenic tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患動物モデル、マイクロ RNA, 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、マイクロ RNA (microRNA ;miRNA)とよばれる 18-25 塩基の non-coding RNA の存在が多くの生物種で

報告されてきている。マイクロ RNA はもともと線虫において標的遺伝子の mRNA の 3' 末非翻訳領域に結合し、そのタンパクへの翻訳を抑制して発生や分化を調節する分子とし

て発見された。一方、哺乳類でも、研究開始当初で 400 種以上のマイクロ RNA が同定され、ヒトの転写産物の 1~4% を占める最も巨大な転写調節ファミリーを構成することがわかってきた。さらにその標的は全ヒト mRNA の 3 分の 1 に及ぶと試算されている。これらの事実からマイクロ RNA が哺乳類の発生・器官形成や病態に大きく関与している可能性が示唆され、実際癌との関連を示す事実が蓄積されてきているが、残念ながらその生理機能は殆どわかっていなかった。

(2) それまでの多くのマイクロ RNA の研究がその標的探索に重きが置かれてきたが、Limらはマイクロ RNA は翻訳レベルのみではなく RNA レベルでも各々 100 程度の組織特異的遺伝子の発現を調節していることを明らかにした (Nature, 433, p769-p773, 2005)。つまり一つのマイクロ RNA は想像していた以上の多くの複雑な RNA・翻訳カスケードを制御し、そのアウトプットはそれらのネットワークの生化学反応の総和として観察されるはずである。それゆえマイクロ RNA の機能を限られた標的遺伝子の翻訳抑制だけで説明しようとする既存のストラテジーだけでは限界があると思われた。

(3) もともとマイクロ RNA は線虫での発生を制御する non-coding RNA である lin-4, let-7 として同定されたことから哺乳類でも発生・分化に関与していると推測された。幾つかの実験はそれを支持している。マイクロ RNA の成熟に必須の Dicer 遺伝子の欠損マウスは胎生致死となる事実はマイクロ RNA がマウスの初期発生に必要な可能性を示唆した (Nat. Genet., 35, p215-p217, 2003)。個々のマイクロ RNA についても研究が進められており、miR-1 と miR-133 は心筋と骨格筋にの分化・増殖に、miR-181 は筋肉や血球の分化誘導に関与していることが示されてきた (Nat. Genet., 38, p228-p233, 2006; Science, 303, p83-p86, 2004; Nat. Cell. Biol., 8, p278-p284, 2006)。一方、miR-124a、miR-132 や miR-134 は神経の分化・機能を制御し (Nature, 439, p283-p289, 2006; PNAS, 102, p16426-p16431, 2005; PNAS, 103, p2422-p2427, 2006)、miR-196 は Hox8 を抑制して後肢の発生を制御する (Nature, 438, p671-p674, 2005)。しかし、これらの実験は培養細胞か器官培養の系で調べられておりマウスの発生・器官形成における個々のマイクロ RNA の個体レベルでの解析の報告は我々の知る限りでは申請時には無かった。

(4) 一方、マイクロ RNA と癌との関連はより多く示唆されてきている。Calin らはマイクロ RNA の約半数がヒトの癌との関連が深い不安定な染色体の領域に局在しているという

驚くべき報告をした (PNAS, 101, p2999-p3004, 2004)。我々が M1 白血病細胞の分化で発現が低下することを見出した miR-17—miR-92 クラスタも Myc により転写制御され B 細胞リンフォーマや肺癌の発症に関与しているという興味深い事実が報告された (Nature, 435, p828—p833, 2005; Cancer Res. 65, p9628-p9632, 2005)。

また、miR-143 と miR-145 はヒト第 5 染色体上に約 2 kB 上に近接して存在しているが、Michael らはそれらが共に腸管ポリープ・大腸癌組織では正常粘膜組織に比べ発現が低下していることを示した (Mol. Cancer Res., 1, p882-p891, 2003)。さらに、Calin らはそれらが Myelodysplastic syndrome でしばしば欠損する染色体の領域の近傍に存在することを報告した。これらの事実は miR-143/miR-145 は腸管細胞や血球細胞において癌抑制遺伝子として標的タンパクの発現を抑制しており、何らかの原因でマイクロ RNA の発現が低下することが、悪性化へ移行する引き金になっている可能性を示唆する。しかも、Michael らのデータや我々が調べた範囲では、miR-143/miR-145 は培養癌細胞では大腸癌や白血病細胞だけではなく、種々の細胞でその発現が認められないので、それらは多くの組織での発癌に抑制的に働いている推測された。Akao らの miR-143 あるいは miR-145 を導入すると大腸癌細胞株の増殖を抑えるという報告はこの考えを支持した (Oncol Rep., 16, p845-p850, 2006)。

(5) しかしながら、我々の実験系では miR-143 と miR-145 の発現ベクターを単独あるいは共に V-SRC 形質転換マウス線維芽細胞、大腸癌や白血病細胞株に導入して強制発現しても増殖能やソフトアガーでのコロニー形成能に明らかに変化を及ぼさなかった。これらの事実の一部は第 77 回日本生化学会に報告した。Akao らの実験結果とのディスクレパンシーは、使った細胞の違いか、あるいは彼らは合成マイクロ RNA を使っていることに起因するかもしれない。そこで、更に検証するためには多くのアーティファクトが入る培養細胞への遺伝子導入実験より、正常組織からの発癌プロセスを経時的に詳細に解析出来るトランスジェニックマウスが理想的であると考えられる。この研究の申請当時 Costinean らは、ヒト B 細胞リンパ腫で発現が増強している miR-155 をリンパ球に強制的に発現させたトランスジェニックマウスが B 細胞の異常増殖を呈することを示した (PNAS, 103, p7024-7029, 2006)。これはトランスジェニックマウスがマイクロ RNA の生体での

機能解析の優れたツールになることを示している。

2. 研究の目的

以上の背景から我々はマイクロ RNA のヒトでの機能を解析するためにモデル動物を用いた機能解析が不可欠であると考えた。

そこで我々の研究室で設備が充実しているマウスの胚操作実験器具を用いて受精卵にマイクロ RNA を作り出す遺伝子を導入することによりマウス生体でマイクロ RNA を発現させ、それにより個体の発生・発達に対する効果を検討を計画した。

また、これらのマウスと発癌モデルマウスと交配させることにより発癌過程に対するマイクロ RNA の影響を解析出来る。本研究では以上の点を踏まえ、miR-143 と miR-145 の発生・分化と腫瘍・癌における機能解析に焦点をしばらく次に掲げる目標の達成を目指す。

(1) Spatio-temporal に制御されているマイクロ RNA の発現を乱すことにより起こる生体反応を観察することにより、miRNA の機能を推測する。腸管細胞など限られた臓器に発現している miR-143 と miR-145 を広くユビキタスに発現するプロモーターを用いて多くの組織に恒常的に発現する TgM を作る。これにより引き起こされる生体反応を本来これらのマイクロ RNA の発現が抑えられている脳や肝臓などの発生・分化を中心に観察する。肉眼的・組織学的解析に加え、生理学的検査(呼吸代謝、心電図、血圧など)も加えて検討する。

(2) miR-143/miR-145 が癌抑制遺伝子として多くの組織で機能するかを検証するために、(1)で作成したトランスジェニックマウスを家族性大腸腺腫症(腸管に多数のポリープででき、高率に癌化する)モデルマウス *APC^{min}* (ヒトと違い小腸で腫瘍が多発)と交配して、これらのマイクロ RNA の腸管腫瘍に対する影響を解析してその発癌への機能解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 広く多くの臓器で働く転写調節ユニットである CAG プロモーターに miR-143 単独あるいは miR-143 と miR-145 を bicistronic に発現できるように連結した遺伝子を繋いだ。また、さらにオワンクラゲの緑色蛍光分子 GFP をこれらのマイクロ RNA と共発現できるようにデザインした DNA コンストラクトも構築した。

(2) これらの DNA コンストラクトをマウスの受精卵にマイクロインジェクションを行いトランスジェニックマウスを作成した。

(3) 得られた親マウスを系統化し、マイク

ロ RNA を発現するマウスを選択した。

(4) 得られたトランスジェニックマウスのうち miR-143 を強発現するマウス (Line C) と家族性大腸腺腫症モデルマウス *APC^{min}* を交配して腫瘍発症に及ぼす効果を観察した。

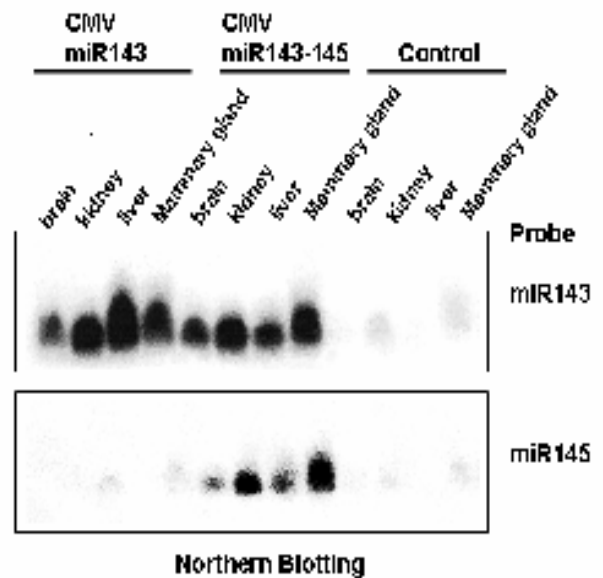
(5) これらの腫瘍から RNA やタンパクを抽出して導入マイクロ RNA の発現および下流のシグナル伝達分子の発現をノザンブロット法やリアルタイム PCR 法さらにウエスタンブロット法で解析した。

(6) 全身の臓器を肉眼的・組織学的に観察して発達異常などの有無を検討する

4. 研究成果

(1) トランスジェニックマウスにおける導入マイクロ RNA の発現解析：樹立したトランスジェニックマウスの各組織での導入マイクロ RNA の発現をノザンブロット法で確認した。図 1 のように脳、腎臓、肝臓、乳腺などで幅広く発現している系統を樹立することができた。

図 1 トランスジェニックマウスにおける導入マイクロ RNA の発現解析

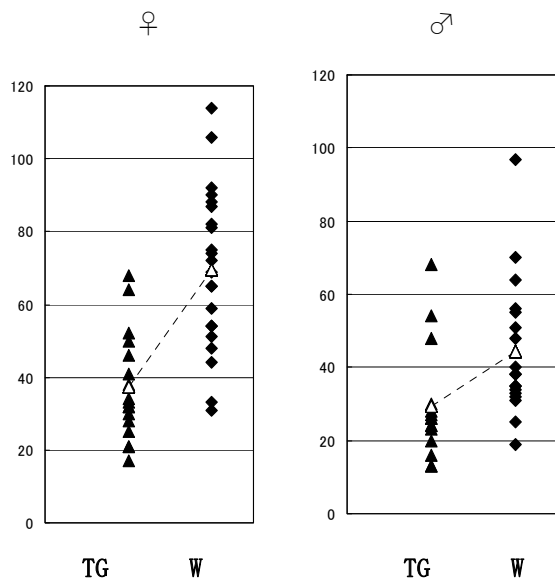


(2) この中で miR-143 を導入したトランスジェニックマウス (Line C) を家族性大腸腺腫症モデルマウス *APC^{min}* と交配し miR-143 過剰発現 *APC^{min}* マウスを樹立した。これらのマウスで腸管腫瘍の発症頻度を *APC^{min}* マウスでのそれと比較したところ、オス、メスともに miR-143 過剰発現 *APC^{min}* マウスの小腸において約半分に抑制されていた (図 2)。一方、大腸での腫瘍発症頻度ではむしろ逆転していた。

そこでこれらの腫瘍における miR-143 の発現をノザンブロット法で確認したところ、miR-143 過剰発現 *APC^{min}* マウスの小腸にお

いて高い miR-143 の発現が認められたが、大腸腫瘍ではその発現は有意に抑えられていた。
以上の結果より、mir-143 の強発現は腸管腫瘍の発症を抑制する可能性が示唆された。

図 2 小腸腫瘍の発症数



TG: トランスジェニックマウス
W: コントロールリッターメイト

(3) トランスジェニックマウス腫瘍抑制の分子メカニズムの解析: ①miR-143 の標的遺伝子として現在まで明らかにされている分子の発現を解析した。その内 MAP キナーゼ ERK5 の発現が有意に低下していることがウエスタンブロット法による解析の結果、明らかになった。また、腸管腫瘍において中心的な役割を果たしている原癌遺伝子産物 C-Myc の発現を解析したところ、面白い事にトランスジェニックマウスの小腸腫瘍で明らかに発現が低下していた。一方大腸においては ERK5 および C-Myc 共に発現に変化はみとめられなかった。
②これらの分子の発現変化が培養細胞レベルでも再現できるかをヒト大腸癌細胞 DLD-1 を用いて検討した。その結果、合成 miR-143 を導入すると ERK5 と C-Myc 共に低下した。③C-Myc 発現低下のメカニズムを調べるために ERK5 の siRNA を DLD-1 に導入して、C-Myc の発現を解析したところ、有意に低下した。これより miR-143 過剰発現マウスの小腸腫瘍における C-Myc の発現低下の少なくとも一部は ERK5 の発現抑制を介していることが示唆された。④大腸では miR-143 の発現が低いだがそれが転写レベルでの制御なのか転写後での調節なのかを調べるため前駆体 pri-miR-143 の発現をリアルタイム PCR

法で解析した。その結果、大腸では小腸と同じレベルで発現しており、大腸での発現低下は主に転写後のプロセシングのレベルで調節されていることが明らかになった。

(4) トランスジェニックマウスに認められる心肥大の解析: miR-143 および miR-143/145 トランスジェニックマウスは生後3ヶ月ころより心臓の肥大を呈してくる。cDNA マイクロアレイの結果、ANP, BNP の発現が増加し、何らかの病的な心肥大と考えられるが、現在まで導入マイクロRNAとの直接の関連が認められる分子の同定に至っていない。(6) まとめ: 本研究では miR-143 のトランスジェニックマウスを樹立し、それを家族性大腸腺腫症モデルマウス *APC^{min}* と交配することにより小腸腫瘍の発症が低下した。これはヒト大腸癌で miR-143/miR-145 が低下している事実と共にこれらのマイクロRNAが大腸癌の抑制分子として働く可能性を示唆する。また miR-143 の過剰発現がその標的分子である ERK5 の発現を低下させ、それにより C-Myc の発現低下を誘導することにより腫瘍発症を低下させている可能性を示した。しかし、他のシグナル分子も関与している実験結果が得られており、更なる解析が必要とされる。また、大腸でのマイクロRNAの転写後の発現抑制メカニズムも今後明らかにしてかなければならない。

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 Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. :Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529-533 (2009) 査読有り
- ② Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. :A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. *Exp Cell Res.* 315, 1384-1392. (2009) 査読有り
- ③ Tsutsui M, Hasegawa H, Adachi K, Miyata M, Huang P, Ishiguro N, Hamaguchi M, Iwamoto T. :Establishment of cells to monitor Microprocessor through fusion genes of microRNA and GFP. *Biochem Biophys*

Res Commun. 372、856-861. (2008) 査読有り

[学会発表] (計 6件)

- ① Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K.: Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway, BMB2010, 2010年12月7日、神戸ポートアイランド (神戸市)
- ② 山本純矢、大内靖夫、岩本隆司: Zebrafishを用いたRNA結合タンパク質 Lin28 の機能解析、BMB2010, 2010年12月7日、神戸ポートアイランド (神戸市)
- ③ 大内靖夫、朝枝祐太、岩本隆司: 腸管上皮細胞におけるRNA結合分子 Lin28 の機能解析、BMB2010, 2010年12月9日、神戸ポートアイランド (神戸市)
- ④ Yuko Shimizu, Hitoki Hasegawa, Yasuo Ouchi, Takashi Iwamoto: 家族性大腸腺腫症モデルマウスにおけるmiR-143 の発がん抑制機能解析、第2回日本RNAi研究会、2010年8月28日、グランドプリンスホテル広島 (広島市)
- ⑤ Yasuo Ouchi, Yuko Shimizu, Mai Mizuno, Takashi Iwamoto: Altered brain microRNA biogenesis affects neural stem cell proliferation in mouse hippocampal dentate gyrus. 第8回幹細胞シンポジウム2010, 2010年5月15日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)
- ⑥ Establishment of cells to monitor Microprocessor through fusion genes of microRNA and GFP. Hitoki Hasegawa, Takashi Iwamoto. BMB2008, 2008年12月10日、神戸ポートアイランド (神戸市)

[その他]

岩本研究室:

<http://www015.upp.so-net.ne.jp/chubuanimal/publication.html>

中部大学ヘルスサイエンスヒルズ:

<http://www.isc.chubu.ac.jp/hsh/topics.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 隆司 (IWAMOTO TAKASHI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 60223426

(2) 研究分担者

加藤 昌志 (KATO MASASHI)

中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 10281073

市原 正智 (ICHIHARA MASATOSHI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 00314013