

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 -2008

課題番号：19780208

研究課題名（和文） 乳腺分化機構に關与するマイクロRNA (miRNA) の機能解析

研究課題名（英文） Involvement of miRNA in mammary gland differentiation

研究代表者

永岡 謙太郎 (NAGAOKA KENTARO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

60376564

研究成果の概要：哺乳動物は妊娠すると、ミルクを作るために乳腺細胞の増殖、分化そして退行を繰り返す。その遺伝子発現は精密に制御されているが、逸脱が生じるとミルク合成量の低下や乳癌の発生などにつながる。本研究により、近年注目を集めているマイクロRNAの一つが、細胞増殖を刺激する遺伝子発現を抑制させ、間接的にマウス乳腺細胞の増殖を制御する事が明らかとなった。今後、より詳細な研究を行うことで、乳腺機構の理解を深めることが可能となろう。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用動物科学

キーワード：miRNA、Cox-2、乳腺分化、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

2006 年のノーベル医学生理学賞は、二重鎖 RNA が遺伝子発現を阻害する現象「RNA 干渉 (RNAi)」の発見者 2 名に受賞された。この現象は線虫から哺乳類まで共通しており、二重鎖 RNA を人工的に作ることで新薬開発などへも応用可能なことから、1998 年の報告からわずか 8 年での受賞となった。この間、RNAi 分子機構が精力的に解析され、およそ 21 塩基の短い RNA が標的 mRNA 決定に重要であることが明らかとなった。さらに、多くの生物種で細胞および時期特異的に発現するタンパク質非コード領域の RNA(non-coding RNA, ncRNA) が次々と発見・同定され、様々な生命現象の調節因子として働

くことが報告され始めた。一方で、ヒトゲノムプロジェクトによりヒトの遺伝子数は約 2.2 万個であり、ショウジョウバエの 2 万個と大差無く、その代わりに ncRNA が多く発現していることが明らかとなった。代表的な ncRNA である siRNA (small interfering RNA) や miRNA (microRNA) は、メッセンジャー RNA (mRNA) の構造の一部である 5' および 3' 非コード領域 (5' or 3' UTR) と相互作用し、ターゲット mRNA の分解や翻訳阻害を引き起こすことが明らかとなり、またヒトの遺伝子の少なくとも 30% がこれら短い RNA の制御を受けるとの試算も報告された。これらの事実により、これまでジャンク (がらくた) とされていた領域が高次生物の複雑さに大きな役割を果たしていると考え

えられはじめた。

泌乳は哺乳動物に特有の生理現象であり、胎盤形成と並んで哺乳動物が高次に獲得した繁殖戦略の一つである。また、泌乳を司る器官である乳腺は動物体内で最大のタンパク質合成器官として知られ、そのドラスティックな発達と分化および退行のサイクルは非常に精密な制御を必要とする。一般的には、妊娠末期のホルモン刺激により乳腺は急激に発達、ミルク合成を開始し、子の発育・離乳によりミルク合成は停止、乳腺はアポトーシスにより退行すると説明されるが、未だ細胞・分子レベルでの制御機構はほとんど判っていない。また、これら生理的制御を逸脱した乳癌の発生機序もほとんど解明されていない。

申請者はそれまでの研究において、主に泌乳中に大量に合成されるカゼイン mRNA の転写後調節に注目し、その mRNA を安定化させる塩基配列と結合タンパクの同定およびその機能解析を行ってきた。また、乳腺の分化過程において、mRNA の転写後調節は単に多量に発現するミルクタンパクに対してのみ効果を示すのではなく、細胞分化メカニズム自体を制御していることを明らかにしていた。

上述したマイクロ RNA(miRNA) は、組織および発生特異的に発現しており、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどに関与し、その発現レベルの逸脱が癌や糖尿病などの疾病を引き起こす報告もなされていた。また、miRNA が既知の mRNA 結合タンパク質と相互作用し、mRNA の安定性を決定する可能性も報告されていた。以上より、申請者は、「乳腺組織が高次生物特有」であり、「乳腺分化に転写後調節が重要」である点から、特に乳腺組織内では mRNA 結合タンパクと miRNA が転写後調節に大きな役割を果たしていると確信し本研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

本研究の目的は遺伝子発現制御機構において新しいプレイヤーである miRNA が乳腺細胞の増殖・分化・退行過程に関与するかどうかの検討を行い、マウス乳腺組織において時期特異的に発現する miRNA を同定し、ターゲット遺伝子群を明らかにすることで、乳腺分化機構の理解を深めることである。

具体的目標として、

- (1) 乳腺分化に関する miRNA の探索
- (2) 候補 miRNA のターゲット遺伝子の探索
- (3) 候補 miRNA の乳腺発育における役割解明以上を掲げ、粛々と実験を行っていく。

3. 研究の方法

(1) マウス乳腺上皮細胞(HC11)は、プロラクチンとデキサメサゾンで刺激することにより、細胞増殖が停止し分化することでミルクタンパク(カゼイン)の合成を開始することが知られている。このホルモン刺激前後、すなわち乳腺細胞分化前後に発現変化する miRNA をマイクロアレイ解析により探索する。

(2) miRNA マイクロアレイの結果より、乳腺分化前後で変化率の大きい miRNA をリストアップする。その中から、リアルタイム PCR を用いて乳腺発育過程における発現変化を確認し、乳腺分化に関する miRNA の絞込みを行う。

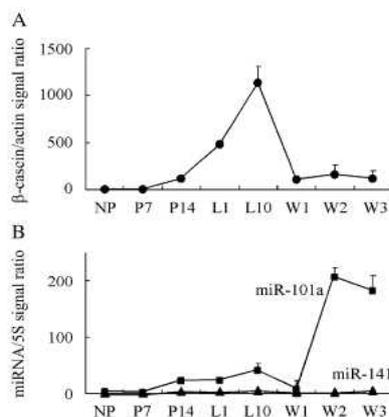
(3) 絞込みが終了したら、候補 miRNA に対して、ノックダウン(RNAi)もしくは強制発現を行い、乳腺分化に影響を及ぼすか検討を行う。

(4) 世界的な miRNA データベースを利用して、候補 miRNA のターゲット遺伝子の探索を行っていく。ターゲット遺伝子の 3'UTR サイトをクローニングし、レポーター遺伝子の下流に繋ぐことで、候補 miRNA が直接的にターゲット遺伝子を制御するかの検討を行う。

(5) 得られたターゲット遺伝子に対して、RNAi と強制発現実験を行い、乳腺分化に影響を及ぼすかの検討を開始する。また、ホルモン刺激から乳腺分化までの miRNA 発現変化とそのターゲット遺伝子またはタンパク発現変化のフローチャート作成し、転写調節機構と照らし合わせ相互関係を明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) 乳腺分化誘導前後において miRNA マイクロアレイを行い、分化に関与する候補 miRNA を得た。候補 miRNA について、リアルタイム PCR を用いて絞り込みを行った結果、mir-101a 発現が乳腺発育過程において大きく変化することが示された。特に強制離乳による乳腺退行時に著しく増加する事が明らかとなった。(下図)。

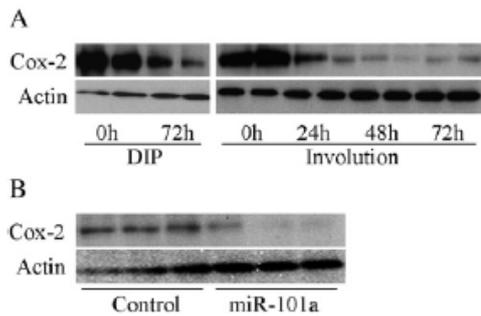


(2) 乳腺細胞において mir-101a をノックダウンさせると分化マーカーであるカゼイン mRNA の発現上昇が見られ、逆に強制発現させると発現が低下した。これは、mir-101a が細胞分化に抑制的に働く可能性を示唆している。

(3) mir-101a の強制発現において STAT5 のリン酸化解析、およびルシフェラーゼ遺伝子の下流にカゼイン mRNA の 3' UTR を組み込んだベクターを用いたレポーターアッセイの結果、mir-101a はカゼイン発現を直接制御しない事が明らかとなった。

(4) 乳腺分化および退行過程に深く関与する細胞増殖について検討をおこなったところ mir-101a が細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

(5) 細胞増殖に関与する因子として知られる cyclooxygenase-2(Cox-2)発現は乳腺退行時に低下することを突き止め、mir-101a の強制発現により Cox-2 発現が低下することを確認した(下図)。



以上の結果から、mir-101a は Cox-2 の発現を抑制することで細胞増殖を抑制し、乳腺分化および退行過程に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

本研究により得られた知見は、乳腺研究のみならず、多くの分野で重要であると考えられる。Cox-2 は細胞増殖をはじめ、炎症反応や癌化などに関与することから、Cox-2 を抑制する miRNA(mir-101a)を利用することで新しい薬剤の開発につながる可能性がある。今後もより詳細な検討を続けていくことで、乳腺における乳房炎や乳癌といった大きな問題に対する新しい突破口になる期待が持たれる。

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12件)すべて査読あり

1. Jaroenporn S, Nagaoka K, Ohta R, Watanabe G, Taya K. Prolactin induces phosphorylation of the STAT5 in adrenal glands of Hatano rats during stress. *Life Sci*. In press
2. Nagaoka K, Aoki F, Hayashi M, Muroi Y, Sakurai T, Itoh K, Ikawa M, Okabe M, Imakawa K, Sakai S. L-amino acid oxidase plays a crucial role in host defense in the mammary glands. *FASEB Journal*. In press
3. Sakurai T, Sakamoto A, Muroi Y, Bai H, Nagaoka K, Tamura K, Takahashi T, Hashizume K, Sakatani M, Takahashi M, Godkin JD, Imakawa K. Induction of endogenous tau interferon gene transcription by CDX2 and high acetylation in bovine non-trophoblast cells. *Biology of Reproduction*. 80, 1223-1231, 2009
4. Haneda S, Nagaoka K, Nambo Y, Kikuchi M, Nakano Y, Matsui M, Miyake Y, Macleod JE, Imakawa K. Interleukin-1 receptor antagonist 1 expression in the equine endometrium during peri-implantation period. *Domestic Animal Endocrinology*. 36, 209-218, 2009
5. Tanaka T, Imakawa K, Sakai S, Nagaoka K. MiR-101a controls cell proliferation by regulating cyclooxygenase-2 during mammary gland development. *Differentiation*. 77, 181-187, 2009
6. Jaroenporn S, Nagaoka K, Ohta R, Shirota M, Watanabe G, Taya K. Differences in adrenocortical secretory and gene expression responses to stimulation in vitro by ACTH or prolactin between high and low avoidance Hatano rats. *Stress*. 12, 22-29, 2009
7. Sakai S, Nonobe E, Satow T, Imakawa K, Nagaoka K. Production of hydrogen peroxide by a small molecular mass compound in milk from Holstein cows with high and low milk somatic cell count. *Journal of Dairy Research*. 75, 335-339, 2008
8. Sakai S, Satow T, Imakawa K, Nagaoka K. Generation of hydrogen peroxide by a low molecular weight compound in whey of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Research*. 75, 257-261, 2008
9. Jaroenporn S, Furuta C, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Comparative effects

of prolactin versus ACTH, estradiol, progesterone, testosterone, and dihydrotestosterone on cortisol release and proliferation of the adrenocortical carcinoma cell line H295R. Endocrine. 33, 205-209, 2008

10. Jaroenporn S, Nagaoka K, Kasahara C, Ohta R, Watanabe G, Taya K. Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress. Endocrine Journal. 54, 703-711, 2007
11. Jaroenporn S, Nagaoka K, Ohta R, Watanabe G, Taya K. Direct effects of prolactin on adrenal steroid release in male Hatano high-avoidance (HAA) rats may be mediated through Janus kinase 2 (Jak2) activity. Journal of Reproduction and Development. 53, 887-893, 2007
12. Nagaoka K, Tanaka T, Imakawa K, Sakai S. Involvement of RNA binding proteins AUF1 in mammary gland differentiation. Experimental Cell Research. 313, 2937-2945, 2007. (Corresponding author)

(学会発表) (計4件)

1. 永岡謙太郎、青木不学、伊川正人、岡部勝、今川和彦、酒井仙吉 ミルク中 L-amino acid oxidase (LAO)による乳腺感染防御機構 第101回日本繁殖生物学会大会 福岡 2008年9月
2. 永岡謙太郎、青木不学、伊川正人、岡部勝、今川和彦、酒井仙吉. ミルク中抗菌タンパク LAO ノックアウトマウスの解析 日本畜産学会第109回大会 水戸 2008年3月
3. 永岡謙太郎、田中哲也、今川和彦、酒井仙吉. 乳腺細胞分化過程における RNA 結合タンパク AUF1 の関与 第30回日本分子生物学会年会 横浜 2007年12月
4. 田中哲也、永岡謙太郎、今川和彦、酒井仙吉 マウス乳腺の退行過程における microRNA 発現変化 日本畜産学会107回大会、麻布大学、2007年3月

(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

永岡 謙太郎(NAGAOKA KENTARO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
60376564

(2)研究分担者

(3)連携研究者