

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790222  
 研究課題名(和文) 癌細胞のアポトーシスに関連するマイクロRNAの網羅的解析  
 研究課題名(英文) Comprehensive analysis of apoptosis-regulating microRNAs in cancer cell.  
 研究代表者  
 田中 陽一郎(TANAKA YOICHIRO)  
 埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・研究員  
 研究者番号：70450426

研究成果の概要：細胞の遺伝子発現調節に関与する小さなRNA、マイクロRNA(miRNA)の癌細胞での機能を網羅的に調べるため、細胞内でmiRNAを効率よく発現するベクターをデザインした。それを元に73種類からなるライブラリーを作製し、各miRNAを子宮癌細胞株で発現することで細胞増殖を抑制または促進するいくつかのmiRNAを同定した。中でも細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制したmiR-17は、癌細胞の悪性化との関与が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	360,000	2,460,000

研究分野：RNA 医工学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：癌、核酸、マイクロRNA、アポトーシス、網羅的解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、マイクロRNA(miRNA)とよばれる小型のRNAによって引き起こされるmRNAの調節機構が明らかになってきた。miRNAは21～24ヌクレオチドの内在性のRNAで、翻訳レベルでタンパク質の発現を抑制することで、細胞の基本的な遺伝子発現調節を行っている。既に応用研究が盛んに行われているsiRNAでは、完全な相補性を持つ標的mRNAを切断するのに対して作用メカニズムは異なる。siRNAとmiRNAの動作メカニズムの違いは標的との相補性(siRNAは完全に相補的、miRNAはミスマッチを含む)に由来することが明らか

かになってきている。

ヒトではこれまでに約700種のmiRNA前駆体が同定されているが、さらにその数は増えることがゲノム解析から予想されている。一つのmiRNAは数百の遺伝子の発現調節を行っていることが予測されており、約1/3の遺伝子がmiRNAによる発現調節を受けると考えられている。また、miRNAは、主に細胞の分化、増殖やアポトーシスをなど、生物にとって重要な機能を制御していると推測されている。

(2) 最近では、miRNAの発現メカニズムが解明されつつある(図1)。

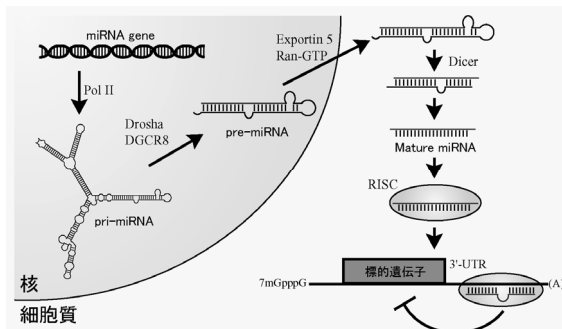


図1. miRNAのプロセッシング機構

miRNA は長い pri-miRNA として転写され、Drosha や DGCR8 を含むプロセッシング複合体によってヘアピン型の pre-miRNA となる。さらに核外に輸送され、Dicer によってループ部分の切断後、成熟した miRNA は miRISC と呼ばれる複合体に取り込まれる。miRISC は miRNA をガイドとして miRNA に相補性の高い配列を持つ標的 mRNA の 3' -非翻訳領域 (UTR) に結合して翻訳を抑制する。従って、miRNA は mRNA の量の変動なしにタンパク質産生を抑える遺伝子調節機構である。

(3) miRNA と疾患との関連は、主に癌で研究されており、多くの miRNA で癌細胞での増加や減少が起こることが知られている。miRNA の発現量の変化はその標的遺伝子の発現量の変化につながり、その結果、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の発現阻害が起こる。また、逆に癌抑制遺伝子を標的とし、発現を抑制することで癌抑制遺伝子として働く miRNA も知られている。癌遺伝子または癌抑制遺伝子として働く miRNA は数種明らかになっており、今後さらに増えていくと考えられる。

miRNA は非常に新しい遺伝子調節の概念であるため、癌における miRNA 研究の発展は、これまでに知られていない新しい癌化のメカニズムや創薬のターゲット等、多くの成果が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 一般に、miRNA は細胞に発現する 18~26 ヌクレオチド程度の RNA をクローニングすることで同定する。しかし、この時点では標的遺伝子は全くわからず、その機能は miRNA の発現プロファイリングや miRNA の配列からのターゲット予測、miRNA のノックダウンや発現による遺伝子発現の変化等によって明らかになる。これらの方法による miRNA の機能の同定は非常に効率が悪く、複数公開されているターゲット予測プログラムからは数百から千種類以上の標的候補がヒットし、プログラムによって結果も異なる。また、miRNA の標的遺伝子の同定も、予測プログラムの結果や表現形との関連を元に標的候補の遺伝

子発現の変化を調べる事で行われるが、一つの miRNA は数百の遺伝子の発現を抑制すると予想されるのに対して、一連の実験から明らかになる数はわずかである。このため、日々多数の miRNA が明らかになっているものの、機能や標的遺伝子の詳細が明らかになっているものは少ない。また、発現プロファイリングで変化の小さい miRNA は、従来法では見落とされる可能性が高く、miRNA による遺伝子調節の全体像を得ることは困難である。

そこで本研究では、miRNA の機能と関係があると考えられる癌細胞での miRNA 機能の網羅的解析法を開発する。具体的には癌細胞でのアポトーシスを誘導または抑制する miRNA を、機能のわかっていない miRNA 群から選択する方法を開発する。細胞の癌化にはアポトーシスに対する耐性が深く関連しているため、癌細胞のアポトーシスに関連する miRNA が明らかになれば、これまで知られていなかった癌化のメカニズムが明らかになるほか、アポトーシスの誘導による新しい治療法のターゲットとなりうる。具体的には、以下の順序で研究を進める。

(2) miRNA の強制発現による機能解析法を開発を行う。miRNA 発現ベクターを細胞に導入した場合、標的となる mRNA からの翻訳は抑制され、タンパク質の発現が減少することで細胞に影響を与える。miRNA を細胞内で発現する場合、成熟型の miRNA や pre-miRNA として発現すると miRISC への取り込み効率が低く、標的遺伝子の抑制効果が低いことがわかっている。高い効果を得るためには pri-miRNA の配列を含む状態で発現し、細胞内で miRNA のプロセッシングを行って pre-miRNA となる必要がある。このため、まず pri-miRNA 配列を含んだ miRNA を発現するベクターの開発を行う。市販の siRNA 発現ベクターを元に、網羅的研究に対応するために、発現する miRNA を簡便に入れ替えられるベクターをデザインする。ベクターのデザイン、導入条件や発現条件の検討を行い、最適化したベクターを用いて最終的に 100 種類程度の miRNA 発現ベクターライブラリを構築する。ベクター数は適宜増やし、可能であれば 200~300 種程度を網羅するものとする。

(3) 作製したベクターを用いて、アポトーシスに関連した miRNA を選別する方法を二通り開発する。一つ目は、作製したベクターを個別にヒト子宮癌由来の細胞株である HeLa 細胞に導入し、各 miRNA の強制発現によって起こるアポトーシスの発生や、UV 照射や抗がん剤投与によるアポトーシスへの耐性を検出する。二つ目の方法として、作製した全ての

ベクターの混合物を HeLa 細胞に導入し、UV 照射や抗がん剤によってアポトーシスを誘起する。miRNA によってアポトーシスに耐性となった細胞は生存することから、生存細胞を回収して発現ベクターのコードしている miRNA を調べることで、アポトーシス阻害能を持つ miRNA 群を明らかにする。

(4) アポトーシスに関連することがわかった miRNA について、その標的 mRNA を同定する実験系を確立する。標的を調べる miRNA の 3' 末端にビオチンラベルを施し、リポフェクション法で HeLa 細胞に導入する。導入した miRNA は細胞内で miRISC 複合体に取り込まれるため、ストレプトアビジン結合ビーズによって miRISC 複合体を回収する。miRISC 複合体は標的 mRNA に結合して発現を抑制しているため、この mRNA をクローニングし、含まれている配列を調べることで miRNA の標的 mRNA を同定する。以上の一連の実験によって、アポトーシスに関与する miRNA とその標的 mRNA を網羅的に明らかにすることを本研究の到達目標とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) miRNA 発現ベクターライブラリーの作製

まず miRNA 発現ベクターの開発を行った。siRNA 発現ベクターを市販されているものから選定した。miRNA の発現のためのプロモーターは、U のストレッチがあっても転写が可能で、ほとんどの miRNA の発現と同じ pol II 系の CMV プロモーターを選択した。

ベクターに導入する miRNA 遺伝子を次のようにデザインした。miRNA は pri-miRNA のプロセッシングによって切断される配列(以下、pri-miRNA 配列と表記する)を含む状態で発現することで高い発現効率が期待されるが、100 残基以上の比較的長い配列となるため、全てを化学合成で調製することはコスト的に不利である。そこで、発現する miRNA の配列に直接関与しない事がわかっている pri-miRNA 配列は共通のものを使用し、miRNA を発現するためのアダプターとした。

pri-miRNA 配列は発現効率に大きく関与することがわかっているため、共通の pri-miRNA の配列を使用することによって、ベクターごとの miRNA の発現レベルを均一にすることが可能である。miRNA の細胞内での発現量が少なければ表現形が現れない可能性が高く、多すぎた場合は他の必要な miRNA の成熟や輸送を阻害することで毒性が表れる。このため、miRNA の発現量の最適化が必須であることから、pri-miRNA 配列は複数の miRNA のものを試し、適したものを使用した。発現ベクター合成は、まず、pre-miRNA をコードする DNA を化学合成によって作製する。短い DNA は高純度なものが安価で合成が可能である。この

ため、部分的に塩基対を形成する二本の DNA として合成し、伸長反応を行う事でコストを抑制した。得られた二本鎖 DNA を PCR によって 5' および 3' 側に pri-miRNA 配列と制限酵素部位を付加し、得られた配列を発現ベクターに導入した。この方法でいくつかの miRNA についてベクターを作製し、パイロット実験に用いた。条件検討後、ライブラリーを拡充し、let-7a~miR-100 までの 73 種類の miRNA を網羅したライブラリーを作製した。

#### (2) 細胞へのベクター導入条件の検討

作製したベクターをリポフェクションによって HeLa 細胞に導入した。細胞数、リポフェクション試薬濃度およびプラスミド濃度の最適化を行い、毒性が少なく、miRNA の発現効率が高い導入法を構築した。HeLa 細胞内での miRNA の発現量をノーザンブロットイングまたはリアルタイム PCR 法で確認し、miRNA の細胞内での発現量や miRNA 毎のばらつきの有無を確認した。

#### (3) アポトーシスに関連する miRNA の同定

96well plate に細胞を培養し、各ウェルに別々の発現ベクターを導入することで、各 miRNA の発現による表現形の変化を比較した。本研究では、まず let-7a~miR-100 までのライブラリーを卵巣癌由来細胞株である HeLa 細胞にそれぞれトランスフェクションし、3 日目における細胞増殖の変化を WST-1 cell proliferation reagent (clontech) を用いて調べた。細胞増殖を促進または抑制する効果の高かった miRNA について、トランスフェクションによるアポトーシスの誘導を caspase-glo 3/7 assay (promega) を用いて定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) miRNA 発現ベクターライブラリーのデザイン

まず、効率の良い miRNA 発現ベクターライブラリーのデザインおよび miRNA の発現条件検討を行った。市販されている shRNA 発現用ベクターを使用し、数種類のアポトーシス関連 miRNA について、miRNA のデータベース「miRBase」上に掲載されている miRNA 前駆体を発現したが、発現の効率が非常に悪いものが多かった。miRNA は、pri-miRNA として発現し、Drosh-DGCR8 複合体によって切断されて pre-miRNA となり、核外に輸送後に Dicer にさらに切断され、mature miRNA となる。pri-miRNA から pre-miRNA へのプロセッシング効率には、pre-miRNA で切り取られる部分(pri-miRNA 配列)が重要であることが知られている。そこで、プロセッシング効率の良い特定の pri-miRNA 配列に、発現する pre-miRNA を付加したキメラ型 pri-miRNA を作製した

(図 2)。

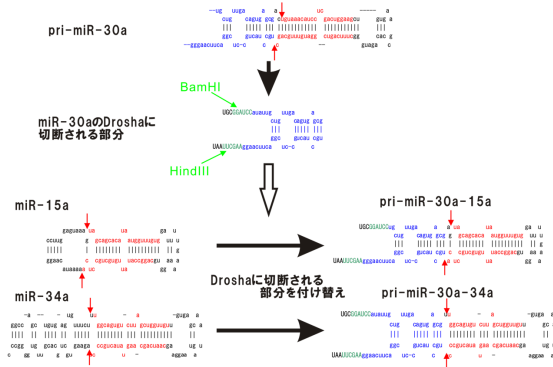


図 2. キメラ型 miRNA のデザイン

キメラ型 pri-miRNA をコードする配列は、前述の方法で作製し、低コストで、多くの miRNA ベクターの作製に应用可能であることを確認した。作製した miR-30a の pri-miRNA 配列を使用したキメラ型 miRNA 発現ベクターを数種類の miRNA について miRBase 上の miRNA 前駆体を発現した場合と比較したところ、ほとんどのベクターで発現効率の上昇が見られた(図 3)。

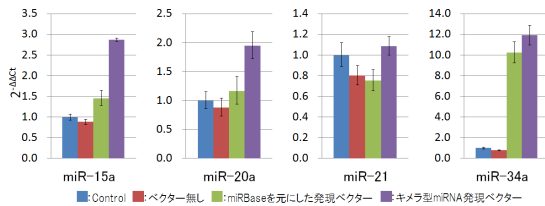


図 3. キメラ型 miRNA 発現ベクターによる miRNA の発現量増加

HeLa 細胞で発現している miRNA 量を網羅的に調べたところ、miR-21 などキメラ型ベクターによって発現上昇が見られなかった miRNA は、元々細胞内での発現が非常に多いものが多かった。このため、本研究で作製したキメラ型 miRNA 発現ベクターは発現量のばらつきの少ない、ライブラリー作製に適したベクターであることが分かった。

これを元に let-7 から miR-100 までの 73 種の発現ベクターからなるライブラリーを作製した。

### (2) アポトーシスに関連する miRNA の同定

各ベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、その細胞増殖能の変化を調べたところ、let-7a-1, let-7f-1, miR-24-2, miR-30b, miR-34a 等で細胞増殖の抑制が見られた。また、今回のライブラリーの中で、miR-17 のみで強い細胞増殖の促進が観察された(図 4)。これらのベクターによる増殖能の変化について、アポトーシスを起こしているかどうかを調べたところ、miR-34a では、アポトーシスが増加し、逆に miR-17 では減少していた。

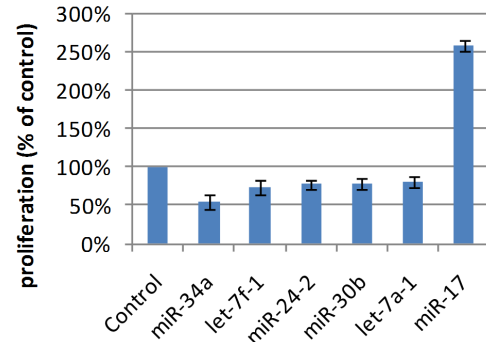


図 4. 各 miRNA による細胞増殖の促進および抑制

miR-34a は癌抑制遺伝子 p53 の下流でアポトーシスを制御していることが知られており、miR-17 はアポトーシスに関連する因子 E2F1 をターゲットとしていることが知られている。このため、今回の結果はこれらを反映したものである可能性があるが、miRNA の標的遺伝子は多数あると考えられている。このため、現在知られているメカニズムに同調して働く未知の経路が存在する可能性が高い。今回明らかになった、その他の HeLa 細胞の増殖を抑制する miRNA についても、そのメカニズムに関する研究を進めることで癌の治療、診断への応用が期待できる。

### (3) まとめと今後の展望

本研究では、miRNA の機能を癌細胞の表現系をもとに網羅的に解析するツールとして、発現量が高く、安定しているキメラ型 miRNA 発現ベクターをデザインし、これを元に let-7a ~miR-100 までのベクターライブラリーを作製した。本ライブラリーを用いて HeLa 細胞の増殖に影響を与える miRNA を同定した。その中から miR-17 がアポトーシスを抑制し、miR-34a は促進することを明らかにした。

本研究の結果により、miRNA の機能解析には発現ベクターライブラリーによる網羅的解析が有効であることが示された。すでに miR-100 以降のライブラリー作製に取りかかっており、今後ライブラリーを充実させることで、未知の miRNA の機能を一度に同定することのできる優れた方法となると考えられる。

また、本研究では時間および予算の都合上到達しなかったが、すでに miRNA の実験的なターゲット同定法の開発にも着手している。これら一連の miRNA の機能解析法が完成することで、miRNA の機能を短期間で、網羅的に解明し、癌における miRNA の役割の解明および治療法の確立が可能であると考えられる。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

① 田中陽一郎、大和谷勇太、和田直久、神津知子 「新規マイクロ RNA 発現ベクターライブラリのデザインとがんに関連するマイクロ RNA の探索」第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学回大会合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸国際展示場

[その他]

和文総説

① 田中陽一郎、神津知子 「癌遺伝子と microRNA」 Surgery Frontier、15(4)、96-98 (2008)、査読無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 陽一郎 (TANAKA YOICHIRO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
研究員

研究者番号：70450426

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者