

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16794

研究課題名（和文）腫瘍抑制マイクロRNA let-7の新規制御因子の機序解明と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of novel regulators of tumor suppressor microRNA let-7 and search for novel therapeutic targets

研究代表者

栗本 遼太（Kurimoto, Ryota）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：10753957

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）：let-7は多くの悪性腫瘍において中核的な腫瘍抑制microRNAとして機能している。このlet-7はRNA結合タンパク（RBP）により制御されているが、その全貌は不明である。本研究においてルシフェラーゼレポーターを応用し、全RBPを標的として、let-7の発現を制御する遺伝子の機能的スクリーニングを行い、新たな制御因子TruB1をはじめ複数の遺伝子を同定した。生化学的解析及び次世代シーケンサーを駆使した網羅的解析を行い、tRNA修飾酵素であるTruB1が酵素活性非依存的に、let-7に特異的に結合してそれを正に制御することを明らかにした。これが腫瘍増殖能を抑制することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

このtRNA修飾酵素TruB1が、その酵素活性とは独立してlet-7を上昇させることを明らかにした。この機構は、酵素活性という既存の機能のみに注目した研究方法では見出すことが困難であったが、microRNAの機能的スクリーニングとRNAへの結合を網羅的に解析するCLIP法の組み合わせによって初めて見出すことが可能となった。ゲノム遺伝学や既存の治療法、検査法のみでは解析の困難なエピトランスクリプトームの研究手法の選択肢を示すものである。

研究成果の概要（英文）：Let-7 functions as a core tumor suppressor microRNA in many malignancies. Although let-7 is regulated by RNA-binding proteins (RBPs), the full extent of this regulation is unknown.

In this study, we applied a luciferase reporter to target all RBPs and functionally screened for genes that regulate let-7 expression, and identified several genes including a new regulator, TruB1. Biochemical analysis and comprehensive analysis using next-generation sequencers revealed that TruB1, a tRNA-modifying enzyme, binds specifically to let-7 and positively regulates it in an enzyme activity-independent manner. We also found that this suppresses tumor growth potential.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA マイクロRNA RNA修飾 CLIP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は本邦における死亡の第1位である。分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬(ニボルマブなど)の登場で飛躍的に治療成績が向上したが、なお治癒は困難である。いずれの治療でも薬剤耐性が生じるため、新規治療標的の同定が求められている。

MicroRNAは21~25塩基程度の短鎖ノンコーディングRNAであり、相補的な配列を持つmRNAを分解するRNAサイレンシングを担っている。全mRNAの約半数はmicroRNAの制御を受けていると報告されている。中でもlet-7 familyは初めて同定されたmicroRNAの一つであり、K-RasやC-Myc、HMGB-2などのがん遺伝子を抑制する事で腫瘍増殖に抑制的な機能を有する事が知られている。肺癌においてはこのlet-7の発現が低い症例では生命予後が不良であり、がんとmicroRNAが密接に関わっていることを示した(Takamizawa J, et al. Cancer Res, 2004.)。Let-7 familyはRNA結合タンパク質Lin28やKSRPなどにより制御されているが、これらに非依存的なlet-7 familyも報告されており(Robinson T, et al. Cell Reports, 2015.)。未だその全貌は明らかとなっていない。

申請者は、Gene OntologyからRNA結合が予測される1123遺伝子を標的として、let-7を制御する新たな遺伝子の探索的スクリーニングを行い、新たな制御因子TruB1を同定した。この遺伝子はRNA修飾遺伝子の一つであるが、哺乳類におけるその機能は十分に分かっていない。さらに、microRNAとの関与はこれまでに報告されていない。申請者は、このTruB1がLin28の発現は変化させずにlet-7の前駆体(Primary-let-7)と結合し、さらにDrosha/DGCR-8による切断を促進して、成熟型のlet-7(Mature-let-7)の発現を亢進させることを示した。またArray解析から、microRNAの中でも比較的特異的にlet-7 familyの制御を行うことも示し、さらにlet-7の下流のK-RasとHMGB2の発現抑制も認められた。TCGA(The Cancer Genome Atlas)のDatabaseを解析すると、TruB1は肺癌や前立腺癌、腎細胞癌において生命予後と正の相関関係を示した。これらのことから、TruB1は、腫瘍抑制遺伝子の有力な候補であり、既にDatabase上は悪性腫瘍の臨床情報とも即したデータが蓄積しつつある。

2. 研究の目的

本研究により、候補遺伝子TruB1によってどのようにlet-7が選択的に制御されるのかを分子生物学的に明らかにし、*in vitro*および*in vivo*におけるTruB1の増殖能、浸潤能、分化能、転移形成能へ与える影響を明らかにすることで腫瘍マーカーや治療標的の可能性を探る。さらに、TruB1と関与する分子を同定し、さらなる制御機構や治療標的の探索を行う。

3. 研究の方法

1). TruB1によるlet-7制御機構の解明

TruB1は、precursor-let-7と結合し、Drosha/DGCR-8による成熟化を亢進する。この機序にはmicroRNAによる選択性の存在が示唆されることから、primary-microRNAの塩基配列の違いが関与していることが予想される。これを検証するために申請者は、既にCRIPR/Cas9によりTruB1のN末端にHiBIT/Flagタグを付加したTruB1標識細胞を樹立した。この標識細胞を用いて、HITS-CLIP(High-throughput sequencing UV-cross linking immunoprecipitation)法によりLRF-1が結合する全Precursor-let-7の塩基配列を1塩基レベルで決定する。さらにこれを他のmicroRNAの塩基配列と比較し、機能部位を詳細に特定する。その後、結合塩基配列に変異を加えたprecursor-let-7を合成し、TruB1の存在下で*in vitro* processing法を行い、配列依存的にmicroRNAの成熟が抑制されるかを検証する。

2). TruB1による腫瘍の表現系に対する影響

申請者は先述のように、siRNAによるTruB1抑制に関して、MTTアッセイにより著しい腫瘍増殖能の亢進効果を確認した。今後、Xenograft modelや*in vitro*のモデルを用いて腫瘍の表現系への影響を明らかにする。

4. 研究成果

1). TruB1によるlet-7制御機構の解明

TruB1によるmicroRNAへの機能の特異性を評価するために、TruB1のノックダウン下でTaqMan arrayを実施したところ、比較的特異的にlet-7 familyが制御されていた。Large scaleのqPCRにおいても同様であり、複数の癌細胞株でも同様の傾向が認められた。

このTruB1のノックダウンでは最終産物であるlet-7は低下する一方で、転写初期産物であるprimary-let-7は上昇した。ノーザンプロットでprimary、precursor、matureの比率を計測したところ、priからpre、preからmatureに至る各maturation stepでの抑制が認められた。これらのことから、TruB1はlet-7の転写ではなく転写後の成熟化を促進している可能性が示唆された。

これを示すために TruB1 をノックダウンした細胞から得られた細胞溶解液を用いて in vitro processing を行ったところ、primary-let-7 の成熟化が抑制された。このプロセッシングに関わる機序を明らかにするために、代表的な microprocessor である DGCR-8 と let-7 の affinity を RIP assay を用いて検証した。その結果、TruB1 のノックダウンによって DGCR-8 と pri-let-7 の結合が抑制された。さらに、免疫沈降法によって TruB1 と DGCR-8 の間での interaction が示唆された。

次に、TruB1 の酵素活性が let-7 の制御機構に関わっているかを検証した。Mt1 を酵素活性の失活させた変異体、Mt2 を RNA 結合能の失活させた変異体とする。これらの変異体を過剰発現させ、qPCR およびノーザンブロット を行ったところ、酵素活性変異の Mt1 でも let-7 の上昇が認められた。このことから、酵素活性は let-7 の上昇に関与していないことが示唆された。さらに、RI-UTP で標識した microRNA を TruB1 リコンビナントタンパク質で反応させたところ、シュードウリジン化は認められなかった。さらに、TruB1 と let-7 の直接的な結合の有無を検証するために、RIP assay と EMSA、HITS-CLIP を行ったところ、TruB1 と pri-let-7 の stem-loop 構造が特異的に直接結合していることが明らかとなった。

2). TruB1 による腫瘍の表現系に対する影響

細胞増殖能においては、TruB1 の発現によって増殖抑制が認められ、ここに let-7 のノックダウンを加えることによって部分的にその抑制が解除される傾向が認められた。

さらに、スフェア形成能を評価したところ、同様に TruB1 の発現によってスフェア形成が抑制され、let-7 の KD によってその抑制が部分的に解除された。また、TruB1 のノックダウンでは、Xenograft model において、皮下移植腫瘍の増殖能が増加した。これらのことから、TruB1-let-7 axis が細胞の増殖能と幹細胞性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本研究成果を、上記文献 (Kurimoto R, et al. EMBO J. 2020 Sep 14:e104708.) として報告した。さらに、学会発表として、日本 RNA 学会オンラインミーティング (2nd RNAJ Online Meeting) 2020 年 8 月 27 日、第 38 回日骨代謝学会学術集会 2020 年 10 月 9 日、2020 年度世界肺癌学会 (World conference on lung cancer) 2021 年 1 月 28-31 日 (シンガポール、オンライン) においてこれらの成果を発表した。

文献 : Kurimoto R, et al. EMBO J. 2020 Sep 14:e104708.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurimoto R, Chiba T, Ito Y, Matsushima T, Yano Y, Miyata K, Yashiro Y, Suzuki T, Tomita K, Asahara H	4. 巻 39
2. 論文標題 The tRNA pseudouridine synthase TruB1 regulates the maturation and function of let-7 miRNA.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida Y#, Matsushima T#, Kurimoto R#, Chiba T, Inutani Y, Asahara H	4. 巻 595
2. 論文標題 Identification of chemical compounds regulating PD-L1 by introducing HiBiT-tagged cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letter	6. 最初と最後の頁 563-576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kataoka K, Kurimoto R, Tsutsumi H, Chiba T, Kato T, Shishito K, Kato M, Ito Y, Cho Y, Hoshi O, Mimata A, Sakamaki Y, Nakamichi R, Lotz MK, Naruse K, Asahara H	4. 巻 8
2. 論文標題 In vitro neo-genesis of tendon-like tissue by combination of Mohawk and a three dimensional cyclic mechanical stretch culture system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto H, Uchida Y, Chiba T, Kurimoto R, Matsushima T, Inotsume M, Ishikawa C, Li H, Shiga T, Muratani M, Uchida T, Asahara H	4. 巻 15
2. 論文標題 Transcriptome analysis of sevoflurane exposure effects at the different brain regions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0236771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0236771.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uchida Y, Chiba T, Kurimoto R, Asahara H.	4. 巻 166
2. 論文標題 Post-transcriptional regulation of inflammation by RNA-binding proteins via cis-elements of mRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 375-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryo Nakamichiab, RyotaKurimotoc, Yusuke Tabatad, Hiroshi Asahara	4. 巻 in press
2. 論文標題 Transcriptional, epigenetic and microRNA regulation of growth plate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kurimoto R, Asahara H
2. 発表標題 RNA Modification Enzyme TruB1 Regulate Tumor Proliferation via MicroRNA let-7.
3. 学会等名 International Association for the study of Lung Cancer 2020 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurimoto R, Ikeuchi S, Asahara H
2. 発表標題 The tumor suppression potential of RNA pseudouridine synthase family via microRNA regulation
3. 学会等名 The 18th meeting of Japan Society of Medical Oncology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurimoto R, Asahara H
2. 発表標題 The tRNA pseudouridine synthase TruB1 regulates the maturation of let-7 miRNA.
3. 学会等名 2nd RNAJ Online Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryota Kurimoto, Hiroki Tsutsumi, Maiko Inotsume, Hiroshi Asahara.
2. 発表標題 New regulatory mechanism of tumor suppressor microRNA let-7s
3. 学会等名 16thn Bone Biology Forum
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Kurimoto, Hiroki Tsutsumi, Yutaro Uchida, Hiroshi Asahara.
2. 発表標題 腫瘍抑制microRNA let-7 familyの新たな制御機構の解明
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara, Sho Mokuda, Yoshiaki Ito, Masafumi Inui, Ryo Nakamichi, Tomoki Chiba, Ryota Kurimoto, Takahide Matsushima.
2. 発表標題 miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy.
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪爪 舞子, 栗本 遼太, 堤 大樹, 細貝 春香, 浅原 弘嗣
2. 発表標題 腫瘍抑制microRNA let-7 familyの新たな制御機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ハイスループット遺伝子編集技術	発明者 浅原弘嗣、栗本遼太、松島隆英、堤大樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP 2020/009987	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関