

機関番号：82606

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590297

研究課題名 (和文) がん抑制因子 miR-34a の細胞増殖抑制機構と大腸発がん過程における役割

研究課題名 (英文) Biological roles of tumor-suppressor miR-34a in colon carcinogenesis

研究代表者

土屋 直人 (TSUCHIYA NAOTO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30322712

研究成果の概要 (和文) : 大腸がん細胞の増殖を強く抑制する miR-34a が、どのようにしてがん細胞の増殖を抑制しているか明らかにした。がん細胞内で miR-34a の量が増加すると、miR-34a が p53 と呼ばれる分子を再度活性化して、細胞の増殖を停止させることを明らかにした。また、がん細胞の増殖抑制機能を持つマイクロ RNA を効率よくスクリーニングする方法を樹立し、新たながん抑制因子 miR-22 を単離することに成功した。

研究成果の概要 (英文) : miR-34a is a tumor-suppressive miRNA, which represses cancer cell proliferation by inducing cell cycle arrest. In this study, we found positive feedback activation of p53 by miR-34a through the repression of endogenous inhibitors of p53. Furthermore, a functional screening method was established to quickly and efficiently isolate tumor-suppressive miRNAs. By using this method, a novel tumor-suppressor miR-22 was successfully identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科

キーワード：癌・細胞・組織・シグナル伝達・発現制御・マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

miR-34a は、代表的ながん抑制因子 p53 によって制御される、がん抑制的 miRNA である。miR-34a は CDK4 や E2F ファミリーの発現を抑制することで、がん細胞を老化様の表現型を誘導する。これに加えて、miR-34a が p53 をポジティブフィードバック制御により活性化している可能性が示唆されていた。また、他の大腸がん抑制的 miRNA は同定されていなかった。

2. 研究の目的

(1) miR-34a による、p53 活性化の分子機構を解明し、細胞増殖抑制機構を明らかにする。

(2) 大腸発がん過程における miR-34a 機能喪失の意義を検討する。

(3) 新たな大腸がん抑制因子 miRNA を単離する。

3. 研究の方法

(1) miR-34a による、p53 のポジティブフィードバック活性化機構の解析

miR-34a を大腸がん細胞株 HCT 116 へ導入した。細胞を細胞質と核とに分画し、各々からタンパク抽出液を調整した。イムノブロット法により、p53 の局在を解析した。P53 の翻訳後修飾は、部位特異的リン酸化抗体及びアセチル化抗体を用いて解析した。

(2) miR-34a の標的分子の同定

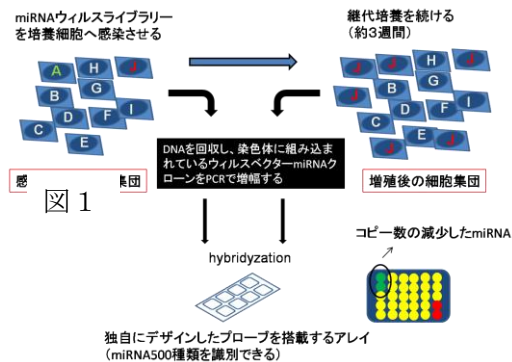
TargetScan データベースを用いて、miR-34a の標的候補となる分子を抽出した。その中から、Gene Ontology 解析により、p53 の翻訳後修飾の制御因子をさらに抽出した。生化学的に、候補分子のを同定するため、3' 末端へビオチンを導入した miR-22 を合成し、HCT 116 細胞へ導入した後、細胞質抽出液を調整した。アビジンビーズを加えて、4C で 2 時間インキュベート後、miR-34a と相互作用している細胞内 mRNA を単離した。SIRT ファミリーの特異的プライマーを用いて、mRNA の検出を行った。

(3) レポーター遺伝子による p53 活性化の解析

ルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流に、p53AIP1 の p53 応答配列を挿入したプラスミドを入手した (国立がん研究センター・荒川博士からの提供)。HCT 116 細胞へ、レポータープラスミドと miR-34a を導入し、一晚培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) 機能スクリーニングによるがん細胞増殖抑制 miRNA の同定

レンチウイルス miRNA ライブラリー (450 種類の miRNA) を培養大腸がん細胞株へ感染させ、感染成立直後の一部の細胞をプールした。一方で、一定期間、継代培養を続けた細胞のプールを作成し、両者から DNA を回収し、ウィルスベクターの共通配列を利用して、細胞に感染している miRNA クローンをすべて PCR で増幅した。増幅した感染直後と継代培養後の各々の細胞由来の PCR 産物を Cy3 及び Cy5 で標識し、独自にデザインしたプローブを搭載したカスタムアレイを用いて PCR 産物に含まれる miRNA クローンのコピー数の



比を算出し、細胞増殖に伴ってコピー数が減

少する miRNA (ドロップアウトクローン) の抽出を行った (図 1)。

(4) 大腸がん抑制遺伝子として機能する miRNA の絞込み

上記、機能スクリーニングで得られたがん細胞の増殖抑制的 miRNA (ドロップアウト miRNA) について、それらの遺伝子座のコピー数変化の解析を行った。大腸がん 24 検体を用いて、染色体の増幅及び欠損を array Comparative Genomic Hybridization 法で解析した。

(5) miR-22 の標的 mRNA の同定

miRNA の制御因子である AGO2 を恒常的に発現する HCT116 細胞を樹立した。その細胞へ、miR-22 もしくはコントロール miRNA を導入し、一晚培養した。細胞から AGO2 を免疫沈降法により回収し、沈降物から RNA を抽出した。その RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、miR-22 の導入後に AGO2 複合体に取り込まれる mRNA 群を同定した。同時に、miR-22 の導入した HCT116 細胞の発現プロファイルを作成した。AGO2 複合体への濃縮率を算出した後、バイオインフォマティクス解析を行った。

(6) 分子生物学的及び生化学的解析

タンパク質の電気泳動、イムノブロット解析は、常法に従った。

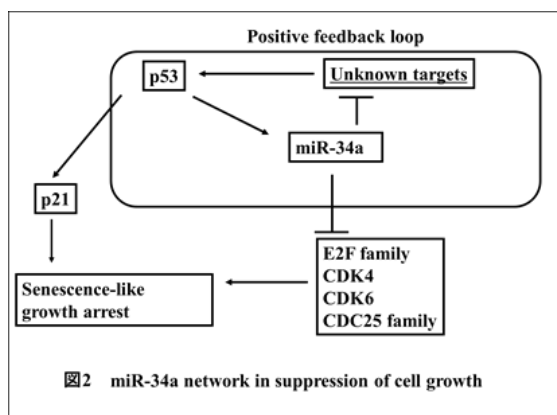
4. 研究成果

(1) miR-34a による p53 経路の活性化機構

miR-34a は、p53 により発現制御されており、細胞傷害性ストレスにより、p53 依存的に発現が亢進する。miR-34a の発現上昇は、CDK4 や E2F ファミリーの発現抑制を介して、細胞周期停止を誘導する。このとき、p53 が、さらに活性化され、その下流遺伝子の代表である p21 の発現亢進が誘導されることを見出した。この分子機構を解析するため、p53 の翻訳後修飾の解析を行った。miR-34a を細胞へ導入すると、p53 の核内移行が促進されるが、Ser15 などのリン酸化に変化は生じていないことが分かった。興味深いことに、K382 のアセチル化が miR-34a の導入により亢進していることが判明した。miR-34a の標的遺伝子の中に、p53 のアセチル化を制御可能な分子があるか否か、データベースを利用して、分子の絞込みを行った結果、SIRT1 が候補として同定された。さらに、実際に細胞内で、miR-34a と標的分子の mRNA が相互作用しているか否か、ビオチン標識した miR-34a を細胞へ導入し、Pull-down 法により確認を行った。SIRT ファミリーの中でも、SIRT1 は miR-34a と相互作用していることが判明した。実際に、miR-34a を導入することによりタンパク質量の減少が認められた。レポーター遺伝子を用いた解析から、miR-34a が SIRT1 の発現を直接抑制していることが分かった。

SIRT1 はヒストン脱アセチル化酵素であ

り、p53 のアミノ酸 382 番目のリジンの脱アセチル化を触媒する、内在性の p53 の阻害分子である。miR-34a を導入すると、p53 の活性化が生じることは、レポーター遺伝子の解析で明かであったが、SIRT1 を発現させることにより、miR-34a による p53 の活性化は抑制されることが分かった。さらに、SIRT1 をノックダウンすることでも p53 の活性化を誘導することができることから、miR-34a による SIRT1 の抑制が p53 ネットワークの活性化に重要であることが判明した。同時に、miR-34a と p53 の間にはポジティブフィードバック制御が存在することも判明した。miR-34a が、ストレス応答に際して、p53 と強調して機能し、正常機能を維持している可能性が考えられる(図 2)。



(2) 機能スクリーニング法の確立

miR-34a は、in vitro 解析では強い細胞増殖抑制機能を有し、p53 ネットワークの制御に関連するがん抑制遺伝子である可能性が考えられる。ヒト大腸がん検体における miR-34a の発現を解析した結果、約 30% の症例で発現低下を示したものの、40% 以上の症例で発現亢進が認められた。このことから、大腸がんの抑制遺伝子として機能する新たな miRNA 分子を単離することとした。

そのために、レンチウイルス miRNA 発現ライブラリーを用いた、機能スクリーニング法を開発した。Pooled library を培養細胞へ導入し、一定期間培養した後、培養前後でコピー数に変動したクローンを定量的にアレイ解析により同定する。さらに、大腸がん過程において、抑制的に機能する miRNA を同定するため、ヒト正常大腸組織における miRNA の発現解析を行い、さらに、ヒト大腸がん検体を用いた染色体のコピー数異常の解析データと統合して、新たに大腸がん抑制因子として miR-22 を単離した。miR-22 遺伝子は、ヒト染色体 17p13.3 に局在し、大腸がん検体の 70% 以上で片アリの欠損と発現低下が認められる。miR-22 を大腸がん細胞株へ導入すると、p53 が野生型のがん細胞に選択的にアポトーシスを誘導することを見出した。

miR-22 を導入した HCT116 細胞の mRNA 発現プロファイルを作成し、ネットワーク解析を行うと、p53 経路が最も影響を受ける細胞内経路であることが判明した。興味深いことに、miR-22 を細胞へ導入しても、p53 の安定化や活性化は認められず、p53 経路の下流で機能していることが示唆された。生体内で、このような経路が存在するか確認するため、miR-22 の遺伝子構造を解析した。その結果、miR-22 遺伝子には、p53 応答配列が複数存在し、ストレスに反応して p53 の結合が増加し、転写が活性化されることを明らかにした。注目すべきは、miR-22 の p53 による発現亢進が、細胞に強い傷害を与えて、アポトーシスが誘導されるときにのみ認められることである。

我々は、miR-22 の標的分子の検索を生化学的手法でおこない、p21 を同定した。P21 は p53 の標的遺伝子であり、細胞周期の停止に必須の分子である。古典的には、がん抑制因子として機能するとされているが、近年、p21 ががん促進的に機能することも多数報告されている。その理由は、アポトーシスの抑制にある。過剰に p21 が発現すると、細胞周期は停止するものの、アポトーシスが抑制される。miR-22 を導入した細胞では、アドリアマイシン処理による p53 依存的 p21 の発現上昇が認められなかった。細胞に低用量のアドリアマイシンを添加すると、p21 の急激な上昇とともに細胞周期の停止が誘導される。miR-22 を導入した細胞では、低用量のアドリアマイシンで急激なアポトーシスが誘導され、p53 依存的アポトーシスの亢進が生じることを明らかにした(図 3)。

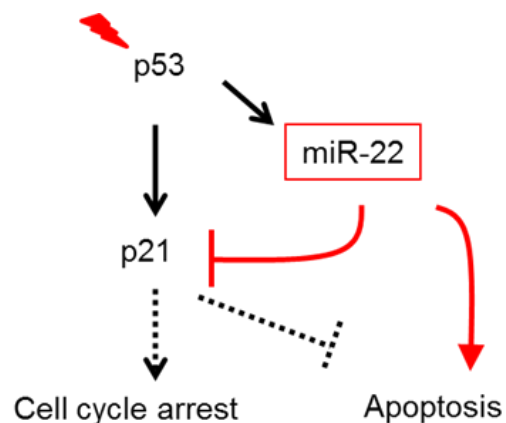


図3. miR-22によるp53依存的アポトーシス誘導機構

miR-22 は、70%の大腸がん症例で遺伝子座の片アリ欠損と発現低下を示すがん抑制遺伝子の候補であることを明らかにした。miR-22 の欠損は、細胞傷害性ストレスに対するアポトーシス耐性を引き起こし、DNA に傷を持った細胞が生存するチャンスを与えている可能性が考えられる。今後、詳細な検討

を加えて、miR-22 ががん抑制遺伝子であることを証明し、発がん過程における役割を明らかにする。

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4件)

1. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res.* 2011 in press
2. Wang R, Dashwood WM, Nian H, Löhr CV, Fischer KA, Tsuchiya N, Nakagama H, Ashktorab H, Dashwood RH. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Int. J. Cancer.* 2011, 128(11):2581-90
3. Tsuchiya N, Nakagama H. MicroRNA, SMD1, and alteration in translational regulation in colon carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2010, 693:94-100
4. Izumiya M, Okamoto K, Tsuchiya N, Nakagama H. Functional Screening using microRNA virus library and microarray; a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs. *Carcinogenesis* 2010, 8:1354-59

[学会発表] (計15件)

1. Naoto Tsuchiya, Masashi Izumiya, Hiroko Ogata and Hitoshi Nakagama miR-22, a novel tumor-suppressor gene, determines p53-dependent apoptosis through repression of p21. Non-coding RNA, miRNA and Cancer, Keystone Symposia, 2011 Feb/14, Banff. Canada
2. 土屋 直人, 泉谷 昌志、緒方 広子、中釜 斉 「がん抑制因子 miR-22 による細胞運命決定機構」第 69 回日本癌学会総会 2010 9 月 23 日 大阪
3. Naoto Tsuchiya Activation of p53 tumor-suppressor network by microRNA-34a. Japan-Denmark Joint Workshop on "Molecular Cancer Research" January 19 2009 Jan. Tokyo
4. Naoto Tsuchiya, Masashi Izumiya, Hiroshi Tazawa, Takashi Sugimura, Hitoshi Nakagama Molecular mechanism for the induction of senescence-like growth arrest by microRNA-34a in colon cancer

cells. Oligonucleotide 4th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society October 16 2008 Boston

5. Naoto Tsuchiya, Hiroshi Tazawa, Masashi Izumiya, Takashi Sugimura, Hitoshi Nakagama MicroRNA-34a, a potential tumor suppressor, induces senescence-like growth arrest in human colon cancer cells. AACR. April 13 2008 San Diego.

[図書] (計4件)

1. 泉谷 昌志、土屋 直人 マイクロ RNA の機能スクリーニング法 細胞 2010 年 6 月号
2. 土屋 直人 マイクロ RNA の機能異常と発がん 最新医学 2009 年 9 月増刊号
3. 土屋 直人、中釜 斉 miR-34a による細胞増殖抑制機構と大腸発癌における役割 実験医学 2009 年 5 月号
4. 土屋 直人、中釜 斉 マイクロ RNA の機能異常と大腸発がん ゲノム医学 2009 年 2 月号

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 「がん抑制的マイクロ RNA を含む腫瘍抑制剤」

発明者: 中釜 斉、土屋 直人、泉谷 昌志、岡本 康司

権利者: 国立がん研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2010-220275

出願年月日: 2010 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内優先

名称: 「大腸がん検査マーカー及び大腸がん検査方法」

発明者: 中釜 斉、土屋 直人、泉谷 昌志

権利者: 国立がん研究センター

種類: 特許

番号: PCT/JP2-1/67081

国内外の別: 国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 直人 (TSUCHIYA NAOTO)

独立行政法人 国立がん研究センター研究所・発がんシステム研究分野・ユニット長

研究者番号: 30322712

(2) 分担研究者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし