

機関番号：32666

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591931

研究課題名 (和文) 卵巣顆粒膜細胞に特異的なマイクロ RNA の卵巣成熟における機能解析とその臨床応用

研究課題名 (英文) Profiling and functional analysis of microRNAs in follicular granulosa cells and their clinical application

研究代表者

竹下 俊行 (TAKESHITA TOSHIYUKI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60188175

研究成果の概要 (和文)：ヒト卵巣顆粒膜由来細胞株を用いて、Augonaute2 (AGO2, EIFC2) に結合している microRNA (miRNA) の大規模プロファイリング解析を行った。*miR-21* は、得られた miRNA の約 80% を占め、顆粒膜細胞において機能的な miRNA であり、重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、AGO2-RNA 複合体に結合している mRNA 解析から、*miR-21* の標的 mRNA の 1 つである *COL4A1* mRNA を見出した。また、KGN 細胞の解析過程で、短鎖 2 本鎖 RNA (23-24 塩基) が、顆粒膜細胞特異的にアポトーシスを誘導すること、さらにその作用は 2 本鎖 RNA 結合蛋白質である PKR や RIG-I を介する新規機構であることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：We performed large-scale profiling of microRNA (miRNAs) in human granulosa-derived cell lines (e.g., KGN) by high-throughput sequencing. In these cell lines, we found that *miR-21* accounted for more than 80% of AGO2 (designated EIFC2) -bound miRNAs, suggesting that it played a central role as a functional miRNA in human GCs. We also performed cDNA cloning of AGO2-bound mRNAs in KGN cells and identified *COL4A1* mRNA as a possible *miR-21* target in KGN cells, which was corroborated by subsequent experimental validation. In proceeding in vitro functional studies using synthetic mimics of miRNA precursors or short-interference RNAs, we also found that these short double-strand RNAs (23- and/or 24-nucleotide dsRNAs) readily induced apoptosis in human granulosa cell tumor-derived cells but not in other cell types. Furthermore, we revealed that the short dsRNAs transcriptionally hyper-induce retinoic acid-inducible gene-I through dsRNA-activated protein kinase.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 2009 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣、卵巣顆粒膜細胞、マイクロ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム DNA 上ジャンクとされていた箇所 (非蛋白質コード領域) に由来する

RNA (非コード RNA) が注目されている。非コード RNA のうち、22 塩基ほどの 1 本鎖 RNA より成る microRNA(miRNA)は、miRNA

の塩基配列と部分的に相補的な mRNA(標的 mRNA)と結合し、転写後の翻訳を抑制すると考えられている。miRNA は、1000 以上の miRNA が報告され、ヒト器官の発生・分化への関与、さらには、組織(臓器)特異的な発現様式を示し、組織の分化・機能と形態の維持に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、しかし、個々の組織・臓器に特異的に発現している miRNA と、その機能は、ほとんど解明されていない。

我々は、マウス卵巣の詳細な miRNA の発現プロファイル解析を行い、卵巣に特徴的な miRNA を見出した。さらに、卵巣の *in situ* hybridization 解析を行い、卵胞顆粒膜細胞に特異的に発現している miRNA (miR-351 など) が存在するという新規の知見を掴んだ。この予備解析から、卵胞顆粒膜細胞に発現している miRNA と、その機能の一端を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

卵胞顆粒膜細胞に特徴的な miRNA が、卵胞顆粒膜細胞の機能制御を通して、卵胞の成熟と閉鎖の調節機構にどのように関わるかという点について、標的 mRNA の同定を含め分子レベルでの機能解明を目指すとともに、臨床応用(卵細胞の評価、癌治療など)につながる基盤研究を行うことを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

下記に記載した(1)~(3)の3つの研究を軸として、卵胞顆粒膜細胞に特徴的に発現している miRNA に関する基盤研究を行った。

(1) 顆粒膜細胞に発現している miRNA のプロファイル解析と標的 mRNA の同定

①培養細胞[ヒト顆粒膜細胞腫由来細胞株(KGN)など]を用いて、発現している miRNA のプロファイル解析を行った。

②卵胞顆粒膜細胞に特徴的な miRNA の標的 mRNA の同定するために、Augonaute 蛋白質(AGO; RNA-induced silencing complexes の主要因子であり、miRNA が複合体を形成することで、遺伝子発現の抑制が行われる)を単離し、AGO 中の RNA を抽出、miRNA と mRNA の cDNA ライブラリー作製し、シーケンス解析を行った。また、標的 mRNA の検証を行った。

(2) 卵胞顆粒膜細胞に特徴的な miRNA の機能解析

①培養細胞系で、miRNA を過剰発現または抑制させ、形態学解析、増殖能解析、アポトーシス解析を行った。

②アポトーシスに関しては、アポトーシスを起こすシグナル経路に関連する分子

の real-time PCR 解析、Western blot 解析を行った。さらに、RNA センサー[retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) など]の関与についても、RNA 干渉技術等を用いて、機能解析を行った。

(3) miRNA の診断ツールとしての臨床応用

①倫理委員会の承認を得て、体外受精・胚移植の採卵時に、ヒト卵胞顆粒膜細胞を採取、保存した。

②採取した卵胞顆粒膜細胞サンプルの miRNA の発現量を、real-time PCR にて定量解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 顆粒膜細胞に発現している miRNA のプロファイル解析と標的 mRNA の同定

ヒト卵巣顆粒膜由来の細胞株(KGN 細胞)から、RNA を抽出し、Genome Analyzer II(イルミナ社)を用いて、高速大容量配列解析を行った。約 380 万個の miRNA 配列を得え、*let-7a*、*let-7f*、*miR-21* などの miRNA が上位にクローニングされた。さらに、ヒト卵巣顆粒膜由来の細胞株(KGN 細胞、GC1a 細胞、HSOGT 細胞)から、抗ヒト Augonaute2 (AGO2) モノクローナル抗体を利用した免疫沈降法を用いて、AGO2 に結合している miRNA を精製し、次世代シーケンサー GS-FLX (ロシュ・ダイアグノスティクス社)を用いて大規模プロファイリング解析を行った。プロファイル解析から 20 万個以上の配列情報が得られ、その約 99%が既知の miRNA 由来であった。特に *miR-21* は、すべての細胞株において約 80%を占めていた。この結果は、*miR-21* が顆粒膜細胞において機能的な miRNA であり、重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、KGN 細胞から抗 AGO2 抗体を用いた免疫沈降で AGO2-RNA 複合体を回収し、複合体に結合している mRNA をクローニング、シーケンス解析し、標的 mRNA の同定を行った。AGO2-RNA 複合体と結合していた mRNA に、*miR-21* の予測標的 mRNA の1つである *COL4A1* を見出した。*COL4A1* mRNA の 3'-非翻訳領域を含むレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼアッセイにより、*COL4A1* が標的 mRNA であることを明らかにした。

(2) 卵胞顆粒膜細胞に特徴的な miRNA の機能解析

KGN 細胞に卵胞顆粒膜細胞に特徴的な miRNA (*miR-351* など)を過剰発現させたところアポトーシス様の細胞死を認めた。*miR-351* は 24 塩基であり、他の 24 塩基の pre-miRNA 分子を KGN 細胞に導入したところ、アポトーシスが顕著に誘導され、この現象は同様な短鎖 2 本鎖 RNA (double-strand

RNA; dsRNA)である合成 small interfering RNA を用いた場合にもアポトーシスを誘導することを見出した。より短鎖の dsRNA、および長鎖 2 本鎖 RNA では認められず、その塩基数に依存しており、顆粒膜細胞特異的にアポトーシスを誘導すること、さらにその作用は dsRNA 結合蛋白質である PKR や RIG-I を介する新規機構であることを見出した [Science Signaling (provisionally accepted)]。

(3) miRNA の診断ツールとしての臨床応用

(1) 結果から、これらの顆粒膜細胞株において多く発現している miRNA の一部について、初代培養ヒト卵巣顆粒膜細胞および生殖器系組織(子宮、卵巣、胎盤、精巣)における発現を real-time PCR により比較解析した。ヒト卵巣顆粒膜由来細胞株のシーケンス解析で上位を占めた miRNA のうち、*miR-21*、*let-7a* などは、初代培養卵巣顆粒膜細胞でも強く発現する傾向が認められた。

また、体外受精において、採卵された卵の質、受精後の着床能を含めた胚機能をより正確に予測しうる新規臨床マーカーの検索として、付着していた卵胞顆粒膜細胞の miRNA が検出可能であることを示したが、卵細胞の質を評価するためのマーカーとなりうるか、臨床解析は課題として残された。

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. 石橋 幸、間瀬 有里、瀧澤 敬美、米山剛一、朝倉 啓文、松原 茂樹、竹下 俊行、瀧澤 俊広. マイクロRNA 2.女性生殖器(子宮・卵巣)におけるマイクロRNA. 産婦人科の実際 59: 1551-1555, 2010. 査読無
2. 石橋 幸、石川 源、松原 茂樹、竹下 俊行、瀧澤 俊広. マイクロRNA 1. 産婦人科医としての基礎知識. 産婦人科の実際 59: 1389-1395, 2010. 査読無
3. Takuya Mishima, Takami Takizawa, Shan-Shun Luo, Osamu Ishibashi, Yutaka Kawahigashi, Yoshiaki Mizuguchi, Tomoko Ishikawa, Miki Mori, Tomohiro Kanda, Tadashi Goto, Toshihiro Takizawa. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. Reproduction 136:811-822, 2008. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 石橋 幸, 他. 短鎖 2 本鎖 RNA は PKR, RIG-I

および p38 を介し塩基数依存的にヒト卵巣顆粒膜細胞のアポトーシスを誘導する. 第 116 回日本解剖学会. 2011 年 3 月 30 日. 神奈川.

2. Osamu Ishibashi, et al. RNA duplexes elicit interferon-independent apoptosis of ovarian granulosa cells via RIG-I in cell type- and length-dependent manner. 第 25 回日本生殖免疫学会学術集会・国際生殖免疫学シンポジウム (International Symposium for Immunology of Reproduction)・合同集会. 2010 年 8 月 28 日. 大阪.
  3. 間瀬 有里, 他. ヒト卵巣顆粒膜細胞株に発現する microRNA の特徴: ~次世代シーケンサーを用いた大規模プロファイリング解析~. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2010 年 4 月 24 日. 東京.
  4. 間瀬 有里, 他. ヒト卵巣顆粒膜細胞株に発現する microRNA の大規模プロファイリング解析. 第 24 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 2009 年 11 月 27 日. 東京.
  5. 間瀬 有里, 他. Argonaute2(Ago2)-免疫沈降法によるヒト卵巣顆粒膜細胞株(KGN)に発現する microRNA のプロファイリング. 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2009 年 4 月 4 日. 京都.
  6. 石橋 幸, 他. miR-125b/351 はヒト卵胞顆粒膜細胞のアポトーシスを制御する. 第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 2008 年 12 月 6 日. 富山.
  7. 間瀬 有里, 他. ヒト卵巣顆粒膜細胞株 (KGN) における microRNA 発現プロファイルの解析. 第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 2008 年 12 月 6 日. 富山.
  8. 瀧澤 俊広, 他. mmu-miR-145 は卵胞莢膜細胞に特異的に発現している. 第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 2008 年 12 月 6 日. 富山.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
竹下 俊行 (TAKESHITA TOSHIYUKI)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60188175
  - (2) 研究分担者  
石橋 幸 (ISHIBASHI OSAMU)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70293214

菊地 邦生 (KIKUCHI KUNIO)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70374676

富山 僚子 (TOMIYAMA RYOKO)  
日本医科大学・医学部・医療技術員  
研究者番号：40409214

(3) 連携研究者