

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591940

研究課題名（和文） マイクロRNAによるテロメラーゼ制御機構の解明と子宮頸癌治療への応用

研究課題名（英文） Analysis of miRNA-mediated regulation of telomerase and application for cervical cancer gene therapy

研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA MASAHIRO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20313661

研究成果の概要（和文）：細胞の不死化・癌化に関与するテロメラーゼ発現の決定因子である逆転写酵素 hTERT の発現がマイクロ RNA miR299-3p によって制御されており、それが hTERT mRNA の特異的な分解促進によるものであることが明らかになった。子宮頸癌では正常子宮頸部と比較して miR299-3p の発現が減少しており、これがテロメラーゼ活性化を誘導し癌化と関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：miRNA miR299-3p is involved in the regulation of telomerase. The degradation of hTERT, the catalytic component of telomerase, mRNA was accelerated by miR299-3p. The decrease of miR299-3p in cervical cancer tissue may be involved in activation of telomerase.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2008年度 | 1,600,000円 | 480,000円 | 2,080,000円 |
| 2009年度 | 1,200,000円 | 360,000円 | 1,560,000円 |
| 2010年度 | 700,000円 | 210,000円 | 910,000円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000円 | 1,050,000円 | 4,550,000円 |

研究分野：婦人科腫瘍学

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：マイクロRNA, テロメラーゼ, 子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

染色体末端構造テロメアは細胞分裂の度に短縮しある程度のレベルに達すると細胞はそれ以上分裂することができなくなる。テロメラーゼはテロメアを延長することで細胞の分裂回数の制限をなくすことが可能である。テロメラーゼは癌の80～90%で活性化されており発癌の重要なステップと考えられるが、同時に多くの幹細胞においてもテロメラーゼは活性化されている。テロメアの延長は細胞増殖能の維持に必要であると同時にテロメアの長さがある種の遺伝子の発現を調節するという報告もあり、そのテロメラ

ーゼの発現調節は発癌のみならず老化とも深く関与している可能性がある。

我々は1996年より産婦人科領域におけるテロメラーゼの研究を行ってきた。産婦臨床人科検体を用いてテロメラーゼ酵素活性の測定し子宮内膜において強いテロメラーゼ活性を認められることを示し、さらにこの活性が細胞の増殖活性と相関していることを示した (Cancer Res. 57: 610-4, 1997)。さらに、テロメラーゼ酵素活性蛋白であるhTERT (human telomerase reverse transcriptase) の mRNA レベルでの発現の有無がテロメラーゼ活性の有無の決定因子

となっていることを世界で初めて臨床検体で示した (Cancer Res. 58: 1558-61, 1998)。さらにテロメラーゼ活性の発現調節を研究するために不可欠な hTERT の遺伝子プロモーターを 1999 年にクローニングし、その転写調節機構に Myc と Sp1 が関与していることを解明し報告した (Cancer Res. 59: 551-7, 1999) (Nucleic Acids Res. 28: 669-77, 2000)。さらにエストロゲンが直接 hTERT プロモーターに結合しその転写を活性化することを発見し (Cancer Res. 59: 5917-21, 1999)、子宮内膜癌におけるプロゲステロンやタモキシフェンによるテロメラーゼ制御についても詳細な検討を行った (Oncogene 21: 3517-24, 2002)。また正常細胞におけるテロメラーゼ発現抑制メカニズムを世界で初めてエピジェネティカルな側面から検討した (Nucleic Acids Res. 29: 3006-11, 2001)。また AP-1 family に対する反応性の違いが動物種による正常細胞でのテロメラーゼ活性の有無 (ヒトではほとんどの正常細胞でテロメラーゼ活性は認められないが、マウスでは多くの組織で活性が認められる) を左右している可能性を指摘した (Mol Cell Biol. 25: 8037-43, 2005)。

一方で miRNA は生体内に存在する 20~25 塩基ほどの短い 1 本鎖 RNA で遺伝情報はコードせず、多くの場合、他の遺伝子の 3' - 非翻訳領域に結合し遺伝子発現を負に調節すると考えられている。最近になって癌化過程である種の miRNA の発現が変化していることが報告されるようになってきたが、そのメカニズムを明らかにしたものは極めて少ない。一般的に miRNA は対象遺伝子の蛋白翻訳を抑制すると考えられているが (図 2A)、一部の miRNA は RNAi のように mRNA の分解を促進することで遺伝子制御に働いている可能性も示唆されている (図 2B)。哺乳類には数千におよぶ miRNA 遺伝子が存在していると予測されているが、ヒトで現在報告されているのは 500 あまりであり、そのうち機能が一部でも解析されているものはごく少数である。一般に一つの miRNA は複数 (数十~数百) の遺伝子を制御するとされており、miRNA による遺伝子制御は複雑なカスケードを形成していると推測される。miRNA によるテロメラーゼ制御に関してもこれまで報告はなく、今回研究の対象とした。

2. 研究の目的

本研究に先立って我々は hTERT mRNA の 3' - 非翻訳領域に相補性のある複数の miRNA をピックアップし、それらを子宮頸癌細胞株で強制発現し hTERT 発現とテロメラーゼ活性を制御する miRNA の候補を得ている。またこの hTERT 発現抑制が mRNA レベルでの抑制であることも判明した。今後

は hTERT mRNA に対する miRNA の作用機序を分子レベルで明らかにすることを第一の目的とする。第二に診断的意義としての miRNA の有用性を明らかにするために正常組織と癌組織において hTERT 制御 miRNA の発現を比較する。第三に癌遺伝子治療の応用の足がかりとして miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与して癌細胞に対する影響を検討することとした。

3. 研究の方法

予備実験において hTERT mRNA の 3' - 非翻訳領域に相補性のある複数の miRNA を Sanger institute miRBase Sequence database を用いてピックアップし、これら precursor を子宮頸癌細胞に導入する予備実験で miR299-3p という miRNA が hTERT 発現を mRNA レベルで抑制し、テロメラーゼ活性も抑制することが明らかになっていた。これをうけて、以下のとおりの方法で研究を進めた。

(1) miR299-3p による hTERT mRNA 発現抑制機構の解明

miRNA による mRNA 発現抑制は転写活性の抑制ではなく mRNA の分解の促進によるものとされている。hTERT mRNA の分解が miR299-3p で促進されるか否かを mRNA 合成阻害剤の存在下で経時的に hTERT mRNA を定量することで明らかにした。コントロール遺伝子 (GAPDH や β -actin 等) と比べて miR299-3p 存在下に hTERT mRNA が速く減少すれば、その分解が促進されているといえる。

さらに hTERT mRNA の 3' - 非翻訳領域を様々な長さでルシフェラーゼレポーターの luciferase 遺伝子の 3' - 非翻訳領域に組み込んで、miR299-3p により mRNA 分解促進が再現されるか検討した。この実験により site specific な遺伝子制御が行われていることを確認すると同時に miR299-3p の作用をルシフェラーゼアッセイで簡便に測定する実験系を樹立した。

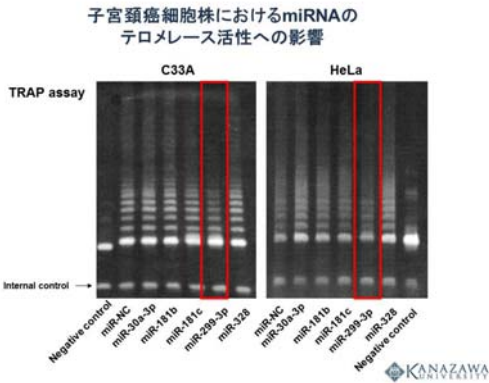
(2) miRNA の子宮頸癌における診断的意義の検討

子宮頸癌と正常子宮頸部における miR299-3p の発現を臨床手術検体を用いて real-time RT-PCR 法で定量した。

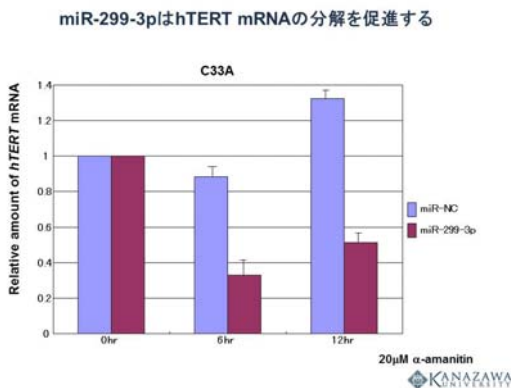
(3) 子宮頸癌遺伝子治療に向けた基礎的研究
miR299-3p による hTERT mRNA 分解促進機構の解明のために Dicer1 の遺伝子ノックダウンを行い、miR299-3p の発現ならびにテロメラーゼ活性への影響を調べた。また miR299-3p のアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションして子宮頸癌細胞株への影響を調べた。

4. 研究成果

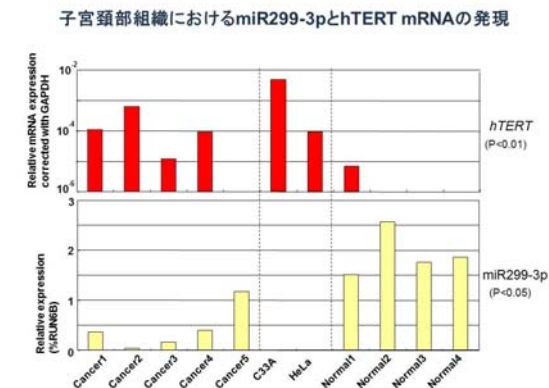
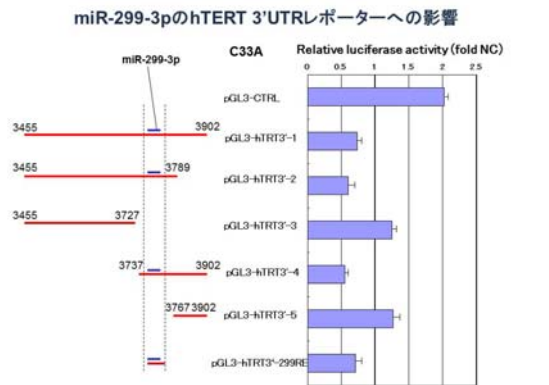
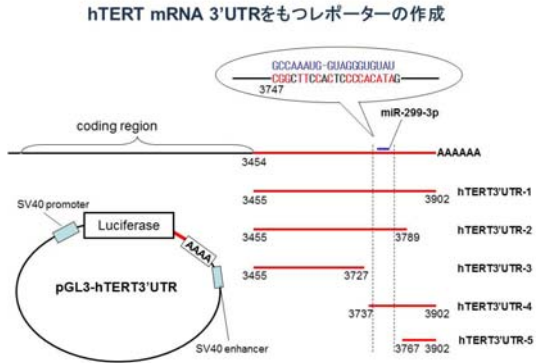
(1) miRNA miR-299-3p を子宮頸癌細胞株にて強制発現することでテロメラーゼ活性と hTERT mRNA 発現が抑制された。



hTERT プロモーターのレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイではhTERTの転写活性に対するmiR299-3pの影響は認められず、転写活性に影響をおよぼすものではないと考えられた。一方、mRNA合成阻害剤の存在下でhTERT mRNAはコントロール遺伝子に比べて早く分解され、miR299-3p強制発現によってこの作用は増強された。このことからmiR299-3pのテロメラーゼ抑制作用はhTERT mRNAの分解促進によるものであることが明らかになった。



さらにhTERT mRNAの3'-非翻訳領域を様々な長さでルシフェラーゼレポーターのluciferase遺伝子の3'-非翻訳領域に組み込むとmiR299-3p結合領域を含む場合にはルシフェラーゼ活性の減弱が認められた。また同様の作用がmiR299-3p結合領域の塩基配列に変異を入れたものでも認められた。以上よりこの作用はmiR299-3p結合領域を介した特異的反応であることが明らかになった。



(2) インフォームドコンセントにもとづいて採取された臨床検体を用いた実験において子宮頸癌組織ではmiR299-3pの発現が正常子宮頸部組織に比べて有意に減少していた。これはhTERT mRNAの発現と逆の相関を示していた。

(3) Dicer1のノックダウンにより子宮頸癌細胞株ではmiR299-3pの発現減少とhTERTの発

現増加ならびにテロメラーゼ活性の増強が認められた。このことから miRNA miR-299-3p は Dicer1 依存的に hTERT 発現を抑制しテロメラーゼ活性を制御していることが明らかになった。またアンチセンスオリゴヌクレオチドによる miR299-3p の抑制でも同様の hTERT とテロメラーゼ活性の変化が認められた。

以上より、特定のマイクロ RNA (miR299-3p) の発現減少が癌化過程において認められ、これがテロメラーゼ活性化に関与していることが明らかになった。このことは癌がんにおけるマイクロ RNA の関与を示唆する重要な所見と考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Activation of NF- κ B is a novel target of KRAS-induced endometrial carcinogenesis.

Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Mori N, Bono Y, Sakurai H and Inoue M.

Clin.Cancer Res. 17:525-37, 2011 (査読有り)

2. Intraperitoneal administration of telomerase-specific oncolytic adenovirus sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin and affects survival in a xenograft model with peritoneal dissemination.

Takakura M, Nakamura M, Kyo S, Hashimoto M, Mori N, Ikoma T, Mizumoto Y, Fujiwara T, Urata Y, Inoue M

Cancer Gene Ther. 17:11-19, 2010 (査読有り)

3. Expression of HER-2 impacts patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer.

Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y, Takakura M, Ohno S, Kiyono T and Inoue M.

Br. J. Cancer. 103:889-898, 2010 (査読有り)

4. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor initiating marker in endometrial
Nakamura M, Kyo S, Zhang B, ZhnagX, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S and Inoue M
Hum. Pathol. 41:1516-1529, 2010 (査読有り)

5. Diagnostic potential and limitation of imaging cancer cell in cytological sample using telomerase-specific replicative adenovirus.

Maida Y, Kyo S, Sakaguchi J, Mizumoto Y, Hashimoto M, Mori M, Ikoma T, Nakamura M, Takakura M, Urata Y, Fujiwara T, Inoue M
Int. J. Oncol. 34:1549-1556, 2009 (査読有り)

6. Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients.

Ikoma T, Kyo S, Maida Y, Ozaki S, Takakura M, Nakao S, Inoue M

Am J Obstet Gynecol. 201:e1-8. 2009 (査読有り)

7. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers.

Kyo S, Takakura M, Fujiwara T and Inoue M.
Cancer Sci. 9:1528-1538, 2008 (査読有り)

8. Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells.

Hashimoto M, Kyo S, Hua X, Tahara H, Nakajima M, Takakura M, Sakaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Ikoma T, Mori N, Mizumoto Y and Inoue M.

Int. J. Oncol. 33:333-340, 2008 (査読有り)

9. 卵巣癌の遺伝子治療

高倉正博 京哲 井上正樹

臨床婦人科産科 62: 1347-51, 2008 (査読無し)

[学会発表] (計 3 件)

1. microRNA によるテロメラーゼ制御機構の解明と婦人科発癌および細胞老化への影響の解明

高倉正博

平成 21 年 5 月 29 日

財団法人神澤医学研究振興財団 第 11 回講演会 (ホテルオークラ) 東京都

2. microRNA mediated regulation of telomerase in cervical cancer

高倉正博 京哲 中村充宏 橋本学 森紀子 水本泰成 生駒友美 井上正樹

第 67 回日本癌学会

平成 20 年 10 月 28 日 (名古屋国際会議場)

愛知県

3. 子宮頸癌におけるテロメラーゼ制御には

miRNA が関与している

高倉正博 京哲 中村充宏 橋本学 森紀
子 水本泰成 生駒友美 坂口純子 井上
正樹

第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会
平成 20 年 4 月 12 日 (パシフィコ横浜) 神奈
川県

[その他]

ホームページ等

<http://kanazawa-u.sanpu.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 正博 (TAKAKURA MASAHIRO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：20313661

(2) 研究分担者

京 哲 (KYO SATORU)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：50272969