

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07431

研究課題名(和文)新規miR-143/p38キナーゼ経路の生体での調節機構と乳癌細胞における解析

研究課題名(英文)Analysis of novel miR-143/p38 signaling in mice and human breast cancer cells

研究代表者

岩本 隆司 (Iwamoto, Takashi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：60223426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウス心筋にmiR-143を強発現するトランスジェニックマウス(MHC/143/145TG)においてp38の発現が低下する事実を見出した。そこでp38の3'末非翻訳領域(3'UTR)上のp38のある標的配列を含む約200塩基を欠損したマウスを樹立して、MHC/143/145TGマウスと交配したところ、心臓でのp38の発現が約半分程度のレベルまで回復した。またmiR-143欠損マウスを作成して膀胱や小腸での発現を解析した結果、3'UTRの3200塩基を削るとp38の発現が有意に上昇した。以上より哺乳類間で保存されていないマイクロRNAの標的もある条件下では生体で機能することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNAは20塩基程度の小さなRNAでヒトでは2000種類以上あり、mRNAの発現を調節しており、多くの生物種での発達や生理機能に重要なだけでなく、癌や多くの疾患に関与している。その標的配列の探索において多くの生物種で保存されている事が大きな基準になっている。今回の研究で、哺乳類間で保存されていないマイクロRNAでも、ある条件下では生体で機能する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the expression of p38 was downregulated in the hearts of the transgenic mice expressing miR-143 (alpha MHC/143/145TG) at a high level. We made a series of mice which had various deletion in the 3' UTR of p38 and crossed them with alpha MHC/143/145TG mice. We found that the deletion of about 200 base pairs containing one possible target site for miR-143 restored about half of p38 expression suppression in alpha MHC/143/145TG mice hearts, suggesting that overexpression of miR-143 actually suppressed p38 expression in the mouse hearts. When about 3200 base pairs of p38 3' UTR was deleted, the deletion of miR-143 significantly increased p38 expression in the bladders and small intestines. These data suggest that the targets of miRNA that are not conserved among mammals may function in living animals in certain situation.

研究分野：実験病理学

キーワード：マイクロRNA 心筋症 p38

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) miRNA は多くの生物に存在する ~ 22 塩基の non-coding RNA で、主に標的遺伝子の 3'UTR に結合し、RNA の分解あるいは翻訳抑制により発現を抑制して生理機能を調節しており、ヒトでは 2000 以上の miRNA がある事が判っている。それらの標的遺伝子への機能的な結合には miRNA のシード配列と呼ばれる 7 塩基が標的と相補的である事が肝要であるが、アルゴリズムによる *in silico* の解析では、ひとつの miRNA の標的は膨大な数に及ぶ。その中から生物学的に意味があるものを取捨選択する訳であるが、生物種間で広く保存されている事が信頼性の重要な指標の一つとなっており、実際、そのような標的を多くの研究者が追試して、論文で頻りに引用してきている。しかし、保存された標的でも、実験で再現よく抑制されない例をしばしば経験するのも事実であり、未だ解決すべき点が多い。

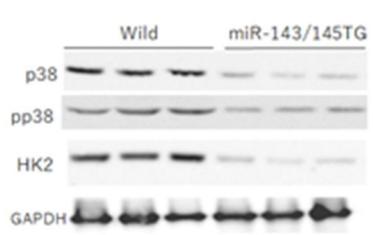


図1 miR-143は心臓でp38の発現を低下させる:トランスジェニックマウスの子臓のウエスタンブロット解析では、miR-143の標的であるヘキソキナーゼ2 (HK2)と同程度に発現低下し、リン酸化も低下した。

(2) 代表者らは、 α MHC/miR-143/145TG の解析の課程で、p38 α (以後

p38) の発現が miR-143 の発現量依存的に明確に低下している事実を発見した(図 1)。そこで、代表的な標的解析アルゴリズムである Targetscan で解析した所、哺乳類の p38 の 3'非翻訳領域 (UTR) には広く保存された miR-143 の標的配列は見いだせなかったが、マウスの p38 の 3' UTR には miR-143 の標的配列が 2 か所 (図 2 の a,b)、ヒトの p38 の 3'UTR では 3 か所あり、(図 2 に一部表示) 更に二つのマウスの標的配列(図 2 の a, b) をルシフェラーゼの下流に連結してレポーターアッセイを施行した所、合成 miR-143 添加により、上流の配列 (図 2 の a) ではシード配列依存性に活性が低下した。以上より、p38 は miR-143 の新規標的遺伝子の可能性が示唆されたが、培養細胞でのアッセイは人工的な条件であるので標的の評価には更なる解析が必要と考える。

(3) 一方、MAP キナーゼには大きく ERK1/2, JNK, p38, ERK5 の 4 つに分けられるが、興味あることに ERK5 は miR-143 の標的である。特に、p38 と ERK5 は MEF2 という転写因子をリン酸化することにより、神経、筋肉の分化を調節している事が、わかっている。また、最近では MEF2 は癌との関係も示唆されてきており、その中でも我々は乳癌の 6~8 割に発現している増殖や転移に重要な BRK (PTK6) のシグナルには p38 と ERK5 の二つが重要であるという報告に注目した (*Cancer Res.* 67:4199-4209, 2007)

2. 研究の目的

今回の研究で見出した miR-143 の生物種間で保存されていない標的である p38 が実際生体内で機能するかどうか、更に、miR-143 による p38 の制御が乳癌の発症を抑制することが出来るかどうかを明らかにする。よって期限内に以下の miR-143 (ヒトの場合は miR-145 も含む) による p38 の発現調節機構と miR-143 (miR-145) /p38 経路の癌細胞における機能解析を主に以下の 2 点に焦点を当てて遂行する。

(1) マウス受精卵のゲノム編集を用いてマウスとヒトの p38 の 3'UTR を介した miR-143 および miR-145 による各臓器における発現調節機構の全貌を明らかにする。

(2) p38 と ERK5 の活性化を介して乳癌の悪性化に関与しているとされる Breast tumor kinase (BRK/PTK6) 陽性乳癌細胞における miR-143/145 の抗腫瘍効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改編マウスの作成

我々の研究室ではエレクトロポレーション法を用いたマウス受精卵における CRISPR-Cas9 によるゲノム編集をセットアップしてきた(TAKE 法、*i-Gonad* 法)。C57/BL6 の受精卵を用いて、図 2 に示すように Targetscan アルゴリズムにて予想されるマウス p38 の 3'UTR 上の miR-143 標的配列 a を含む約 170 塩基を欠損させたマウス(Mup38/3'UTR マウス(a))、その下流の約 3200 塩基を欠損させた Mup38/3'UTR マウス(b)、および両方を欠損させた Mup38/3'UTR マウス(c) を作成した。当初の計画ではこれらマウスの p38 3'UTR を図 2 に示すようにヒトのそれと置換したマウスの作成も計画したが、達成出来なかった。

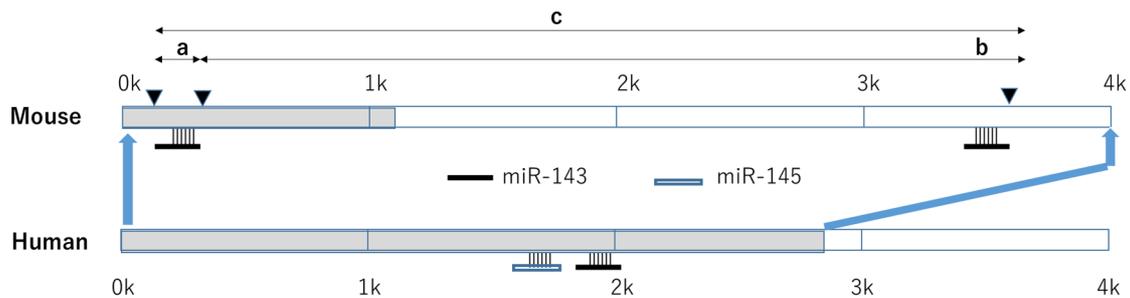


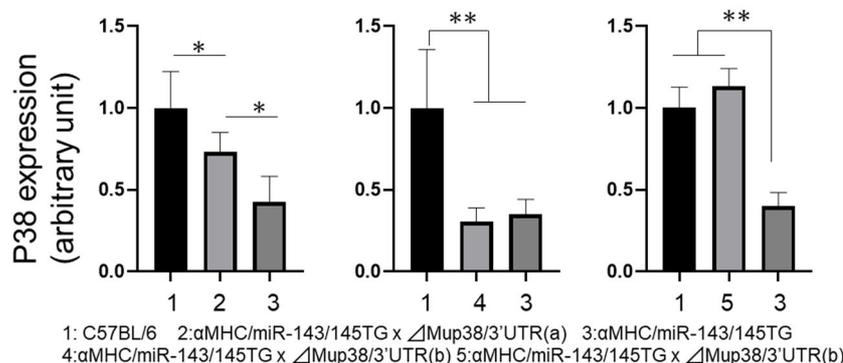
図2 マウスとヒトのp38の3'UTRの模式図。灰色部はGenecodeプロジェクトで報告されている最も下流のpolyA付加部位。→で示されている領域をマウスの領域と置換する。▼:欠損させるマウスのmiR-143標的配列を含む領域。▽:欠損させるヒトのmiR-143とmiR-145標的配列を含む領域

miR-143 欠損マウスの作成：同様にマウス受精卵における CRISPR-Cas9 を用いて pre-miR-143 をコードする領域を含む 174 塩基を欠損させたマウスを 2 系統樹立した。

(2)ヒト乳癌細胞 T47D, MDA-MB-231 ヘルトロウイルスにより miR-143 および miR-145 を導入して、それぞれの高発現細胞を樹立した。

4 . 研究成果

(1) 2 系統の Mup38/3'UTR マウス(a)を α MHC/miR-143/145TG と交配し、 Mup38/3'UTR(a) x α MHC/miR-143/145TG を樹立した。これらのマウスの心臓での p38 の発現をウエスタンブロッティング法で解析すると、 α MHC/miR-143/145TG より有意に発現が増強していたが、野生型 C57BL/6 マウスと比較するとその回復は約半分程度であった(図 3A)。この事実から α MHC/miR-143/145TG の心臓における p38 の発現低下は標的配列 a を介する miR-143 の効果である可能性が示唆されたが、それだけでは説明が不可能で他の領域の関与も必要と考えられた。



1: C57BL/6 2: α MHC/miR-143/145TG x Δ Mup38/3'UTR(a) 3: α MHC/miR-143/145TG
4: α MHC/miR-143/145TG x Δ Mup38/3'UTR(b) 5: α MHC/miR-143/145TG x Δ Mup38/3'UTR(b)

図3 α MHC/miR-143/145TGと Δ Mup38/3'UTR(a,b,c)マウスを交配させて得られたマウスの心臓のp38のウエスタンブロッティング解析

(2) 次に標的配列 a の下流から標的配列 b までを含む約 3200 塩基を欠損させた Mup38/3'UTR マウス(b)を α MHC/miR-143/145TG と交配し、 Mup38/3'UTR(b) x α MHC/miR-143/145TG を樹立した。これらのマウスの心臓で

の p38 の発現をウエスタンブロットング法で解析すると、 α MHC/miR-143/145TG と有意差が認められなかった (図 3B)。この事実から少なくとも領域 b のみでは、miR-143 による p38 発現低下を説明出来なかった。

(3) そこで我々は標的配列 a および b を含む約 3400 塩基を欠損させた Mup38/3'UTR マウス(c) を α MHC/miR-143/145TG と交配し、Mup38/3'UTR(c) x α MHC/miR-143/145TG を樹立した。これらのマウスの心臓での p38 の発現をウエスタンブロットングで解析すると、発現が増強して、ほぼ C57BL/6 マウスと同じレベルまで発現が回復した(図 3C)。

この事実から α MHC/miR-143/145TG の心臓における p38 の発現低下の約半分は標的配列 a に miR-143 が結合することによる可能性が示唆されたが、残り半分の低下は他の領域を介している事が推察された。

(4) また、内在性の miR-143 の発現が高い平滑筋組織において、p38 が実際 miR-143 の標的になっているかどうかを確認するために、miR-143 の遺伝子を欠損したマウス miR-143 をマウス受精卵のゲノム編集で 2 系統作成した。これらのマウスの平滑筋組織である膀胱や小腸において p38 の発現をウエスタンブロットングで解析した結果、明らかな発現上昇は認められなかった (図 4A)。

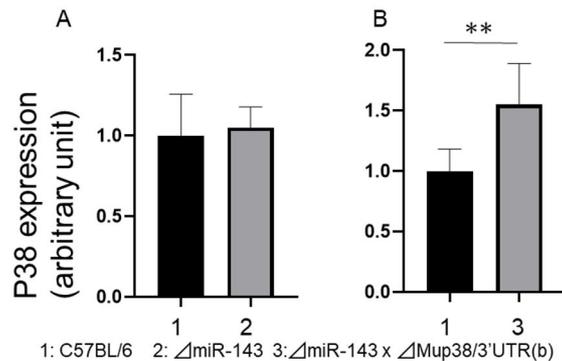


図4 Δ miR-143マウスと Δ Mup38/3'UTR(b)マウスを交配させて得られたマウスの膀胱のp38のウエスタンブロットング解析

そこで平滑筋組織では miR-143 の p38 への作用を阻害する機構が働いているのではと想定し、標的配列 a より下流の配列を欠損した Mup38 /3'UTR (b)マウスと miR-143 マウスを交配して、Mup38 /3'UTR (b)x miR-143 マウスを樹立した。それらの膀胱や小腸において p38 の発現を解析したところ、Mup38 /3'UTR (b)に比べて有意に増加していた(図 4B)。これらの事実より、マウスの平滑筋組織において miR-143 は標的配列 a を介して、p38 の発現を抑制するが、それは配列 a の下流の配列により生理的状态では抑制されている可能性が示唆された。

(5)しかしながら、当初計画していたマウスの 3'UTR をヒトの 3'UTR と置換したマウスの樹立を期限内に樹立することは出来なかった。これはエレクトロポレーション法で受精卵に導入出来る DNA フラグメントの長さに限界があるため、マイクロインジェクションを試みたが、技術的な問題で達成できなかった。また、ヒト乳癌細胞での miR-143 の強制導入実験において p38 の発現低下の再現性を多くの細胞で確認出来なかった。よって、miR-143 のヒト p38 の発現への影響は現時点で不明である。

(6)マイクロ RNA の標的配列は多くの生物種で保存された標的が重要視されているが、今回の実験結果により生物種間で保存されていない標的でも高発現した場合生体内で機能することが示唆された。しかし、miR-143 欠損マウスの平滑筋組織においても p38 3'UTR の下流の領域を除去した時のみ p38 発現増強効果が得られた事から、miR-143 の単独で p38 を抑制出来るのはある限られた条件であり、p38 の 3'UTR を調節する他のマイクロ RNA や転写因子との協調作用が必要であることが推測された。そこで胎生期の組織において成獣の組織とは違った遺伝子調節機構が働く可能性が考えられるので、現在マウス胎児の組織を解析中である。また、マウスの p38 の 3'UTR をヒトのそれと置換する試みは達成できず、またヒト乳癌培養細胞では p38 の抑制効果は認められなかった。以上の事より、ヒトにおいて p38 が miR-143 の標的になるかは不明であるので、今後これら未確認の実験についてはさらなる検証と続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwata Satoru, Sasaki Takahisa, Nagahara Miki, Iwamoto Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 An efficient i-GONAD method for creating and maintaining lethal mutant mice using an inversion balancer identified from the C3H/HeJcl strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/g3journal/jkab194	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 -

1. 著者名 Ogawa K, Noda A, Ueda J, Ogata T, Matsuyama R, Nishizawa Y, Qiao S, Iwata S, Ito M, Fujihara Y, Ichihara M, Adachi K, Takaoka Y, Iwamoto T.	4. 巻 25:40
2. 論文標題 Forced expression of miR-143 and -145 in cardiomyocytes induces cardiomyopathy with a reductive redox shift	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Mol Biol Lett.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s11658-020-00232-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩田悟、長原美樹、岩本隆司
2. 発表標題 マウス胚におけるchromoanasythesis様(よう)の複雑な染色体再編成の効率的誘導
3. 学会等名 第94回 日本遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田悟、長原美樹、岩本隆司
2. 発表標題 マウス受精卵における複雑な染色体再編成(Complex Chromosome Rearrangements: CCRs)誘導法の開発
3. 学会等名 第7回 日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田悟、長原美樹、岩本隆司
2. 発表標題 ゲノム安定性制御によるマウス胚の多重染色体編集法の開発
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoru Iwata, Takahisa Sasaki, Miki Nagahara, Takashi Iwamoto
2. 発表標題 バランス染色体B6.C3H-In(6)1Jを用いた致死変異体マウスの効率的な作製と維持
3. 学会等名 第6回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	喬 善楼 (Kyo Zenrou) (00343658)	中部大学・生命健康科学部・教授 (33910)	
研究分担者	岩田 悟 (Iwata Satoru) (70722891)	中部大学・実験動物教育研究センター・助教 (33910)	

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
---------	---------