

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501040

研究課題名（和文）癌転移を抑制する miRNA の標的タンパク質のプロテオーム解析による探索

研究課題名（英文）Proteomic analysis of micro RNA target proteins involved in cancer metastasis

研究代表者

原 康洋 (HARA YASUHIRO)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：70568617

研究成果の概要（和文）：本研究では、最新のプロテオーム技術を用いて癌転移抑制効果を有する miRNA の標的タンパク質の探索を行った。第一に乳癌細胞の転移を顕著に抑制することが報告されている microRNA-31 (miR-31) に着目し、miR-31 の標的となるタンパク質の探索とそれら標的タンパク質による癌転移の制御メカニズムの解明を目的としたプロテオーム解析を試みた。転移性乳癌細胞株 MDA-MB-231 にレンチウイルスベクターを用いて miR-31 を導入し、miR-31 導入細胞とコントロールベクター導入細胞から抽出したタンパク質をトリプシン消化後、iTRAQ 試薬による標識を行い LC-MS/MS にかけることによりタンパク質の同定と発現量の差異解析を行った。その結果、miR-31 導入細胞で発現が変化している複数のタンパク質を新たに同定できた。次に癌転移を抑制する新たな miRNA の候補として miR-145, miR-205, miR-206, miR-335 を選択し、それら miRNA をレンチウイルスベクターを用いて MDA-MB-231 に発現導入した。miR-31 を含むそれらの miRNA 発現細胞の癌浸潤抑制効果をマトリゲルを用いたインベージョン・アッセイにより入念に調べた。その結果、それらの miRNA に浸潤抑制効果は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that down-regulate gene expression and play important roles in tumorigenesis. Although a number of miRNA target proteins could be predicted, few of them have been validated experimentally and the precise mechanism of the inhibition of metastasis by miRNA has not been elucidated. Thus, we conducted a proteomic search for miRNA-target proteins. First, we focused on miR-31, recently, reported to inhibit metastasis of human breast cancer xenografts, and identification of its targets should be important for understanding the mechanism of cancer metastasis. Thus, we conducted a proteomic search for miR-31-target proteins. We over-expressed miR-31 in metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells using lentiviral vector and searched for differentially expressed proteins between miR-31-infected and empty vector-infected cells. Protein extracts from the cells were digested with trypsin and labeled with an isobaric tagging reagent, iTRAQ. The tryptic peptides were fractionated using a SCX column and identified by LC-MS/MS. A number of proteins with altered expression were identified by miR-31 over-expression. Next, we selected miR-145, miR-205, miR-206, miR-335 as candidates for miRNAs involved in metastasis inhibition. We over-expressed these miRNAs in MDA-MB-231 cells using lentiviral vector and determined whether they affect cells invasion by matrigel invasion assay. Results from invasion assays showed that these miRNAs were not able to suppress cells invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
24年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：プロテオミクス解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向

①癌組織における miRNA 発現のプロファイリング

miRNA の発現が腫瘍のタイプによって明確に異なること、癌組織における miRNA の発現が正常組織に比べ低下する傾向にあることが報告されている (Lu et al., Nature, 2005)。

②癌における miRNA 前駆体からのプロセッシングの異常

成熟 miRNA ができる過程に関わる酵素 Dicer や Drosha の発現低下と種々の癌の予後に相関があることが報告されている (Karube et al., Cancer Sci., 2005, Merrit et al., N. Engl. J. Med., 2008)。

これらは癌抑制因子としての miRNA の破綻に起因する標的分子の発現上昇が癌化に対して重要であることを示唆している。

③miRNA による癌転移の抑制

miRNA による癌転移抑制はそれまではほとんど知られていなかったが、本研究着想時点になり miRNA の転移に対する特異的な抑制効果が報告されはじめた。

転移性乳癌細胞を用いた研究により、miR-206, miR-335, miR-146a, b, miR-31 が乳癌の転移を抑制することが示されている (Tavasoie et al., Nature, 2008, Hurst et al., Cancer Res., 2009, Valasty

etal., Cell, 2009)。しかし、これらの miRNA の標的タンパク質や転移抑制のメカニズムについて体系的に調べた報告はない。

(2) 着想に至った経緯

これまでの研究は悪性度の異なる癌組織から得られた miRNA のマイクロアレイを用いた発現プロファイリングを中心に行われてきた。この理由として標的遺伝子よりもむしろ miRNA 自身が癌の悪性度を表す指標であると捉えられていること、miRNA による標的遺伝子の発現抑制の機構に未だ不明の点が多いこと、miRNA が多くの遺伝子を同時に標的とするため重要な役割を果たしている標的遺伝子が絞りにくいことがあげられる。さらに個々の miRNA の標的分子の研究に目を向けると、これまでは過去の研究に照らし合わせて推測し、実験で検証、あるいはインフォマティクスによる in silico 予測を実験で検証、という手順がとられてきた。しかし、予測しえなかった分子が miRNA の標的であった例も多い。それらに対し、本研究では miRNA による転移抑制の標的となるタンパク質をプロテオーム解析を用いて網羅的に同定する。

本研究によりこれまで予想されていなかった転移関連タンパク質や新たな転移制御機構が見出され、予後を予測可能なマーカーあるいは癌の抗転移治療法の開発につながる

と思われた。

2. 研究の目的

microRNA(miRNA)は遺伝子発現を制御する短い non-coding RNA である。近年、miRNA が癌の発生、進展、転移に関与することが報告されているが、その標的となるタンパク質は遺伝子の配列に基づいて推測されているに過ぎず、個々の標的タンパク質が何かは明らかになっていない。そこで本研究では癌転移抑制効果を有する miRNA の標的となるタンパク質に焦点を絞り、最新のプロテオーム技術を用いてそれら miRNA の標的タンパク質を同定し、その癌転移制御メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) レンチウイルスベクターを用いた miRNA の発現

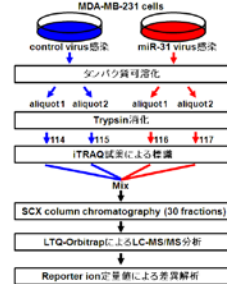
miR-31, miR-145, miR-205, miR-206, miR-335 の precursor 配列を組み込んだレンチウイルスベクターは System Biosciences (SBI) 社から購入した。それらウイルスベクターを SBI 社製パッケージングプラスミドとともに 293TN 細胞に導入し、48 時間後回収した培養上清からウイルス粒子を精製した。精製したウイルスの moi(感染力価)は乳癌細胞 MDA-MB-231 にウイルスを感染させ 72 時間後、細胞を回収し、UltraRapid Lentiviral Global Titer Kit (SBI 社) を用いたリアルタイム PCR によりゲノム DNA 中のコピー数を測定することによって決定した。

miRNA 発現細胞作製は moi 5~20 で感染させることによって行った。また、感染細胞の確認はレンチウイルスベクターに組み込まれた GFP の発現、ゲノム DNA に当該 miRNA を含むベクター配列が存在することのゲノミック PCR による検出によって行った。さらに

実際に当該 miRNA が発現していることの確認は miRNA に対する RT-PCR による検出および miRNA のターゲット配列を付加したルシフェラーゼ・リポーターによる抑制効果の検証によって行った。

(2) miRNA 発現細胞のプロテオーム解析
高転移性乳癌細胞 MDA-MB-231 に miRNA 発現レンチウイルス、およびベクターコントロールレンチウイルスを moi20 で感染させた後、

iTRAQ法を用いたmiR-31のターゲットタンパク質のプロテオーム解析



細胞を回収した。細胞から 7M ウレア、2M チオウレアでタンパク質を可溶化し、トリプシン消化後、iTRAQ 試薬

(AB SCIEX 社) による同位体標を行った。これら標識ペプチドを強陽イオン交換カラムによる分画後、nanoLC MS/MS (LTQ-Orbitrap XL) による同定と定量を行うことにより、miRNA により発現量が変化するタンパク質を検索した。

(3) miRNA 発現細胞のインベージョン・アッセイ

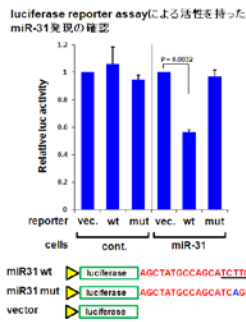
高転移性乳癌細胞 MDA-MB-231 に miRNA 発現レンチウイルス、およびベクターコントロールレンチウイルスを moi5 で感染させた。それら発現細胞を用いてマトリゲル・インベージョン・チャンバー (ベクトン・デッキンソン社) によるアッセイを行った。アッセイは 5×10^4 個の細胞をチャンバー上層に播種し、24 時間後、下層に移動した細胞を染色し数を計測することによって行った。

4. 研究成果

(1) mi-31 導入 MDA-MB-231 細胞のプロテ

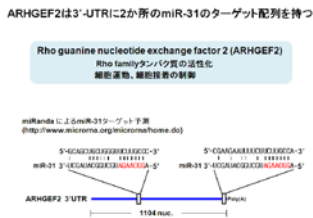
オーム解析

転移抑制能を有する miRNA の中でも特に miR-31 は転移性乳癌細胞 MDA-MB-231 に発現



導入すると転移の複数のステップを強力に抑制することが報告されている。そこで miR-31 を第一の候補とし、

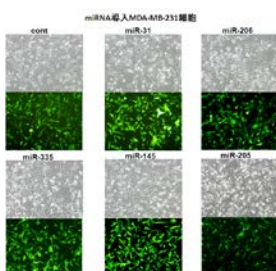
レンチウイルスによって作製した miR-31 導入およびコントロールベクター導入 MDA-MB-231 を用いた iTRAQ 法によるプロテオーム解析を行った。LTQ-Orbitrap XL の分析結果から Proteome Discoverer ソフトウェアによる解析を行い、3403 個の定量比較可能なタンパク質が同定された。miR-31 導入細胞で 1/1.5 以下に減少しているタンパク質として 2 個、1.5 倍以上に増大しているタンパク質として 4 個が同定された。



miR-31 導入細胞で減少しているタンパク質の一つである Rho guanine

nucleotide exchange factor 2 (ARHGEF2) は細胞運動、細胞接着を制御する因子として知られ、また miRNA のターゲット予測アルゴリズム、miRanda により配列中に二か所の miR-31 ターゲット配列を持つことから、これまで知られていなかった miR-31 のターゲットタンパク質である可能性が示された。

(2) miRNA 導入 MDA-MB-231 細胞のインベ



miR-31, miR-145, m
iR-205, miR-206, m
iR-335 をレンチウ

イルスベクターによって MDA-MB-231 細胞に導入しインベーション・アッセイを行うことにより、それら miRNA の浸潤抑制能を詳細に調べた。

その結果、それら miRNA によって論文に報告されていた浸潤抑制は再現しなかった。論文に報告されている miRNA の癌転移抑制能と異なる結果は実験方法が正確に一致していないためと考えられ、癌転移抑制能の解釈には熟考が必要であることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①原 康洋, 朝長 毅: 乳癌転移に関わる microRNA (miR-31) のターゲットタンパク質のプロテオーム解析. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010 年 9 月 22-24 日

②原 康洋, 朝長 毅: 乳癌転移に関わる microRNA (miR-31) のターゲットタンパク質のプロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会, 東京, 2010 年 7 月 25-27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 康洋 (HARA YASUHIRO)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員
研究者番号: 70568617

(2) 研究分担者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー
研究者番号: 80227644

松原 久裕 (MATSUBARA HISAHIRO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 20282486

石濱 泰 (ISHIHAMA YASUSHI)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 30439244