

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4月26日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592087

研究課題名（和文）細胞間情報交換におけるストレス応答マイクロRNAの役割

研究課題名（英文）Micro RNA for stress response in cell-cell communication

研究代表者

田代 茂樹（TASHIRO SHIGEKI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20300882

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境ストレス（電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia）に対する細胞応答に際しての miRNA の役割を知るため、既知の miRNA の検索、さらにライブラリーを作製して網羅的に解析しようと試みた。さらにギャップ結合をポイントにして解析すると我々が長年研究してきた cPLA₂α の有無に依存することが明らかとなった。完全に cPLA₂α をノックアウト(KO)したマウスを得るため、我々で conditional KO マウスを作製することにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to know the role of miRNA upon cell response (ionizing radiation, UV, heat-shock, Hypoxia) to environmental stress and tried search miRNA known to try comprehensively analyzed to generate a library further. Relying on the presence or absence of cPLA₂α we have studied for many years and analyzed by point gap junction further revealed. To get the completely cPLA₂α knockout (KO) mice, we decided to produce a cPLA₂α conditional KO mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：マイクロRNA、細胞間情報交換、ギャップ結合、ストレス応答、cPLA₂α

1. 研究開始当初の背景

扁平上皮や血管内皮細胞はお互いに連携を保って存在しなければ上皮や血管としての機能は果たせない。このような細胞では細

胞間のギャップ結合を介して細胞間情報交換 (gap-junctional intercellular communication, GJIC) が行われていると考えられている。ギャップ結合はコネクシン (Cx) 6 量体で構成されており、特に Cx43

の役割が大きいとされている(図1)。

ギャップ結合を介して細胞間の情報伝達に携わっている物質はどのようなものが考えられるであろう? ギャップ結合を通過できるのは1 kDa 以下の低分子とされている。われわれは miRNA がその一つの候補ではないだろうか考えた。その理由はいくつかある。1つには miRNA が分泌顆粒に含まれて細胞間を移動している可能性が示唆されたことである

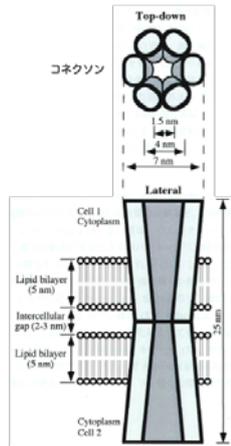


図1 GAP結合の構造
隣接細胞からの2つのコネクソン(Cx6量体)からなる

(Nat Cell Biol 9: 654-659; 2007)。さらには、細胞が遊走刺激に応じて伸展させる pseudopodia 内に多種類の miRNA が蓄積されていることが報告された (Nature 453: 115-119; 2008)。また、miRNA がギャップ結合を通過できることも分かった (BBRC 363: 610-615; 2007)。したがって、これらの結果を踏まえて われわれは以下のような仮説を立てた。すなわち、放射線などのストレスに対して細胞は miRNA をギャップ結合を通して隣り合った細胞に移動させて情報を交換し、ストレスに対する抵抗性を速やかに高めているのではないかと考えている。

以前にわれわれの研究室では、温熱ストレスに対する細胞の反応性を、細胞を高密度で維持した場合と低密度で維持した場合とで比べた事がある。その研究で分かったことは細胞は細胞間のコンタクトがなくなると途端に温熱に対する感受性が高くなるということである。lindane という Cx43 の機能を阻害する薬剤を培地中に同時に与えることで、たとえ高密度で維持している細胞においても温熱に対する感受性が非常に高くなることから、こうした考えは妥当なものと思われる。また一般に癌細胞はギャップ結合に異常をきたしていると考えられている。このことは、癌が温熱や放射線に対して比較的感受性が高い原因の一つなのかもしれない。

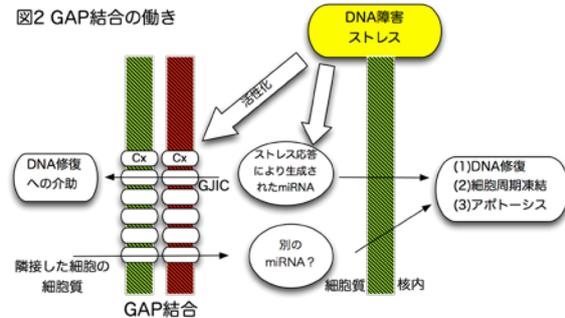
2. 研究の目的

本研究の目標は放射線、紫外線、温熱、低酸素分圧 (Hypoxia) など細胞を取り巻く種々のストレスに適応するため細胞が miRNA を使って適応していることを証明することである。おそらく、細胞が利用する miRNA の種類は一つではないだろう。異なるストレスに対しては異なる種類の miRNA

を準備しているであろう。その多様性こそが細胞の持っている防衛機所の特徴だと思われる。われわれは本研究にて、少なくとも上記のストレスそれぞれに対応した miRNA を同定したい。そして、それらの miRNA がストレス刺激を受けた1個の細胞からギャップ結合を介して隣接する細胞へと移動していく過程を画像化して見せることでこの仮説の証明を試みる。

ストレス応答に関わる物質についてギャップ結合を介しての miRNA に求めた点は独創的な点といえるのではないだろうか。miRNA はこれまで1個の細胞内での生物学的機序の同定は行われてきたが、細胞集団における働きは未だ認識されていない。本研究の仮説を図2にまとめた。ギャップ結合を介してのストレス応答に miRNA の存在が明らかになれば、頭頸部癌のような固形癌の治療において重要な貢献ができると考えている。miRNA を局所に投与することで全身投与と比べても副作用を極力抑えた新しい治療法開発への道を開く指標となり得る。

図2 GAP結合の働き



3. 研究の方法

環境ストレス(電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia)に対する細胞応答に際してのギャップ結合および miRNA の役割を知るために、実験計画を(1)環境ストレス応答における細胞情報交換因子 miRNA のスクリーニングと同定、(2)同定された miRNA の機能とストレス応答との関連付けおよびギャップ結合の通過能解析、(3)共焦点レーザー顕微鏡下での miRNA 移動解析および(4)正常細胞と腫瘍細胞との相違点について種々のストレスに対する細胞の防御機構の一手段としての細胞間情報交換システムの解明に取り組む年次計画を立て実験を進めていく予定であった。

以下に述べる研究計画においては、ギャップ結合を介した環境ストレス応答に関わる未知の miRNA を同定するという本研究の性格上、使用する細胞、薬剤、miRNA 発現のための shRNA、細胞形態学的手法、分子生物学的手法、アレイシステム等を併用し、多角的に検討を加えられるよう勘案した。

(1) 環境ストレス応答におけるギャップ結合を介した細胞情報交換因子 miRNA のスクリーニングと同定

細胞を様々なストレス下に置くことにより発現が大きく変化する miRNA を同定する。本研究ではその手掛かりを求めるため、アレイ法による既知の miRNA の検索を行い、さらにライブラリーを作製して網羅的に解析しようとした。本研究では環境ストレスとして電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia (低酸素分圧) を選んだ。細胞は CV-1、SK-N-SH、野生型マウス肺繊維芽細胞、HeLa S3、メラノーマを用いることを予定していたが、野生型マウス肺繊維芽細胞は凍結保存していたストックに問題があったため今回は用いることができなかった。スクリーニングは SA バイオサイエンス社のリアルタイム PCR アレイを用いた。

(2) 同定された miRNA の機能とストレス応答との関連付けおよびギャップ結合の通過能解析

miRNA とストレス応答との関連付けを行う。miRNA を合成、導入し、ギャップ結合が関与しているかを解析した。Confluent (ギャップ結合が効率よく働く状態) にした培養細胞とより低い細胞密度の細胞で比較を行った。さらに、Cx43 の阻害剤である lindane や Cx43 の siRNA も用いて比較を行った。

アッセイ方法として致死感受性測定のコロニーアッセイ、cell counting kit (同仁科学) を用いたアッセイ及びアネキシンアッセイを行った。さらに分子生物学的解析としてリアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング及び免疫蛍光染色法を行った。

さらに、同定した miRNA に対するショートヘアピン RNA (shRNA) 発現プラスミドを作成し、これを遺伝子導入してその働きを解析する予定であったが、結果的にその実験まで至らなかった。

特に、Cx43 の機能はそのリン酸化 (BBA 1711: 154-163; 2005) によって調節されていることから、ストレス応答におけるリン酸化の差異は重要であるので、市販のリン酸化認識抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。これらの解析は miRNA それぞれに対して順次行った。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡下での miRNA 移動解析

共焦点レーザー顕微鏡による局在解析も併用して miRNA と Cx43 が環境ストレス応答においてどのような役割を担っているかを調べる。具体的には miRNA を標識して細胞に導入し、miRNA がストレス刺激を受けた 1 個の細胞からギャップ結合を通過して隣接する細胞へと移動していく過程を画像化して見

せることでこの仮説の証明を試みる予定であった。

(4) 正常細胞と腫瘍細胞におけるギャップ結合の相違点

正常細胞と腫瘍細胞、特に悪性の腫瘍とにおいては環境ストレスに対する耐性が大きく異なる。この一つの原因が GJIC 機構の違いにあるのではないかと仮説を実証する。

Confluent (ギャップ結合が効率よく働く状態) にした培養細胞とより低い細胞密度の細胞で比較を行った。さらに、Cx43 の阻害剤である lindane や Cx43 の siRNA も用いて比較を行った。

(5) cPLA₂ コンディショナル ノックアウトマウスの作成

以前、共同研究で cPLA₂α の KO マウスを使ったことがあるが、継代することが困難で実験材料として使うには労力が大きく、相手の研究室への依存度が大きすぎた。従って、我々で conditional KO マウスを作製することにした。世界的にもこのようなマウスは存在せず、ソースとしての貢献も副産物として得られ、遠回りではあるが最も早く目的に近づく実験であると考えた。導入する Targeting vector を作製し、共同研究により ES 細胞からマウスを作製した。

4. 研究成果

本研究では、環境ストレス (電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia) に対する細胞応答に際しての miRNA の役割を知るため、最初に細胞を様々なストレス下に置くことにより発現が大きく変化する miRNA を同定することを試み、その手掛かりを求めるため、アレイ法による既知の miRNA の検索、さらにライブラリーを作製して網羅的に解析しようとした。しかし、量があまりにも膨大なのが問題となった。これまで 1 個の細胞内での生物学的機序の同定は行われてきたが、細胞集団における働きは未だ認識されていない。

以前に我々の研究室では、温熱ストレスに対する細胞の反応性を、ギャップ結合をポイントにして比較した実験を行っていた。その研究で分かったことは細胞は細胞間のコンタクトがなくなると途端に温熱に対する感受性が高くなるということである。この結果は我々が長年研究してきた cPLA₂α の有無に依存した。よって、スクリーニングを試みる細胞は cPLA₂α が欠損している細胞とその正常細胞を比較して用いることがその突破口になると考えた。

簡便なやり方として siRNA などを用いる方法があるが、完全にノックアウト(KO)することはできず、ストレス応答の再現性に問題点が残る。よって cPLA₂α の KO マウス由来の細胞を用いることが最善策であると考えた。以前、共同研究で cPLA₂α の KO マウスを使ったことがあるが、継代することが困難で実験材料として使うには労力が大きく、相手の研究室への依存度が大きすぎた。従って、我々で conditional KO マウスを作製することにした。世界的にもこのようなマウスは存在せず、ソースとしての貢献も副産物として得られ、遠回りではあるが最も早く目的に近づく実験であると考えている。

(1) 環境ストレス応答における ギャップ結合を介した細胞情報交換因子 miRNA のスクリーニングと同定

細胞を様々なストレス下に置くことにより発現が大きく変化する miRNA を同定した。本研究ではその手掛かりを求めため、アレイ法による既知の miRNA の検索を行った。さらにライブラリーを作製して網羅的に解析しようと試みたが、結果として得られるものはなかった。

同定した miRNA

電離放射線 : miR-152, -410, -431, -493 (up-regulated), miR-155, -20a, -25, -15a (down-regulated) (Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 81: 839-848; 2011)

紫外線 : miR-125b (JBC 280: 16635- 16641; 2005, JBC 287:33036- 33047; 2012), miR-22 (BBRC 417: 546- 551; 2012)

温熱 : miR-3120 (JBC 287: 14726- 14733; 2012), miR-21, miR-24 (FEBS Lett. 582: 4137- 4142; 2008)

Hypoxia : miR-23, -24, -26, -27, -103, -107, -181, -210, -213 (MCB 27: 1859 -1867; 2007)

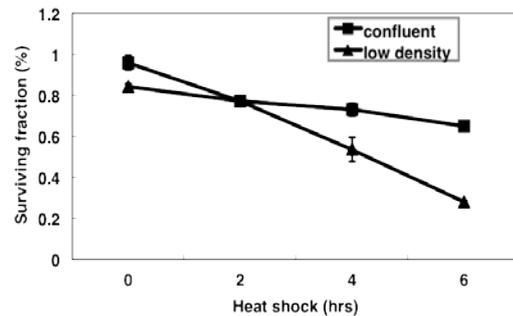
(2) ギャップ結合と cPLA₂α

miRNA とストレス応答との関連付けを行う。miRNA を合成、導入し、ギャップ結合が関与しているかを解析した。

①温熱ストレスによる細胞密度と生存曲線

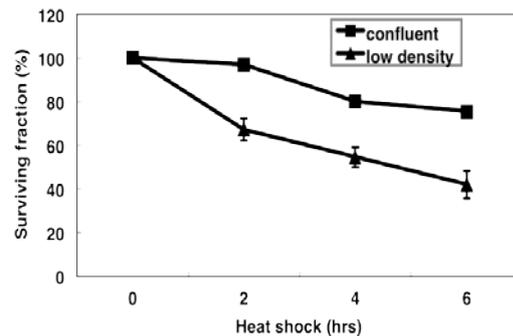
CV-1、SK-N-SH、HeLaS3 細胞で confluent、あるいは低密度での温熱ストレスを与えたところ、すべての細胞で confluent の方が温熱ストレスに耐性であることを示した。これにはギャップ結合が関与しており、特にコネクシン 43 (connexin 43; Cx43) に注目して解析を行った。

CV-1 細胞

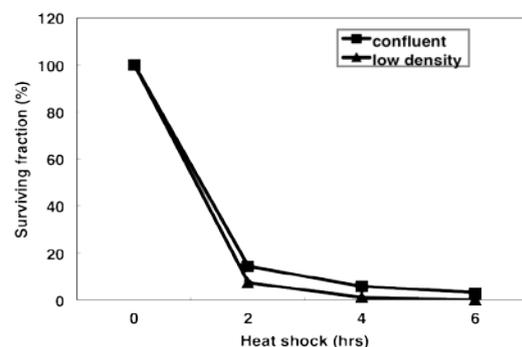


SK-N-SH 細胞

HeLa S3 細胞



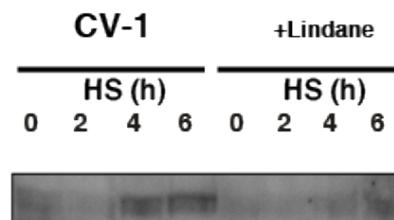
②コネクシン 43 阻害剤 Lindane は温熱ストレス耐性を低くする

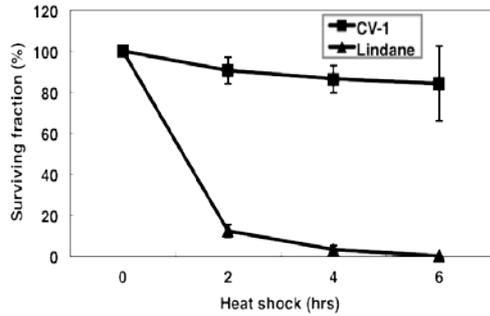


レス耐性を低くする

confluent な CV-1 細胞に Cx43 の阻害剤 Lindane を加えて温熱ストレスに対する同様の実験を行った。ウエスタンブロッティングにおいて Cx43 の発現が少なくなることも確認した。温熱ストレス耐性は著しく低下したので、ギャップ結合におけるコネクシン 43 の関与は明らかとなった。

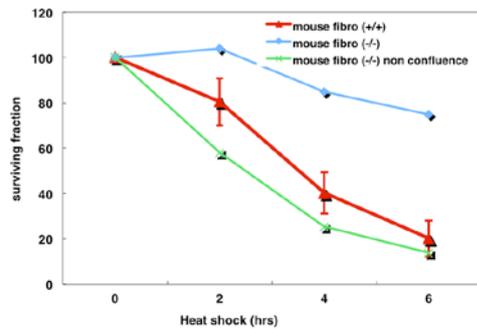
Cx43





③温熱ストレスによる細胞密度と cPLA₂α 存在下の生存曲線

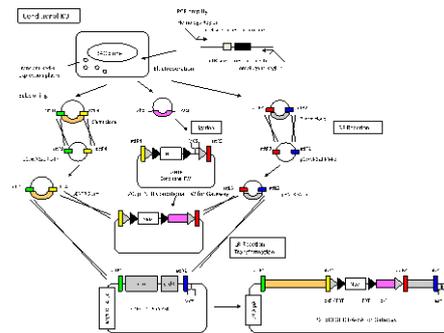
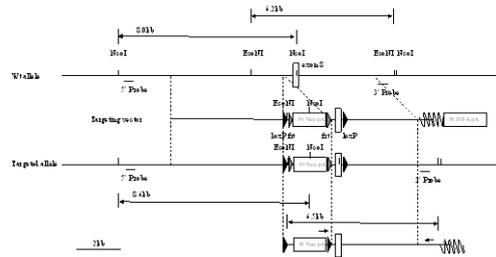
cPLA₂α ノックアウトマウス肺より得られた初期培養細胞においては温熱ストレスに対して強い耐性を confluent な状態では示すが、低密度では野生型コントロールに近い耐性しか示さなかった。この結果は温熱ストレスに cPLA₂α が深く関与していることを示し、さらに解析を進める予定だったが、共同研究での cPLA₂α の KO マウス供給が困難になり、従って、我々で conditional KO マウスを作製することにした。実験材料として使うには継代と PCR による遺伝子型判定において労力が大きく、相手の研究室への依存度が大きすぎた。



(2) cPLA₂α コンディショナル ノックアウトマウスの作成

cPLA₂α conditional KO マウスを作成することにした。KO マウスは存在するが、世界的にもこのようなマウスは存在せず、ソースとしての貢献も副産物として得られ、遠回りではあるが最も早く目的に近づく実験であると考えている。継続して飼育する場合には非常に有効である。

ターゲティングベクターは Gateway System (Invitrogen) を使用して作製した。以下にベクターのデザインと作製方法の図を示す。



cPLA₂α conditional KO マウスはほぼ完成したので、これからは安定した初期培養細胞の供給が可能になり、より深い解析に進めると期待している。

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 3 件)

① Katayama I, Sasaki M, Kimura Y, Hotokezaka Y, Eida S, Tashiro S, Sumi M, Nakamura T

Comparison between ultrasonography and MR imaging for discriminating squamous cell carcinoma nodes with extranodal spread in the neck.

Eur J Radiol 81(11), 3326-3331, 2012. 査読有

② Ichikawa Y, Sumi M, Eida S, Takagi Y, Tashiro S, Hotokezaka Y, Katayama I, Nakamura T

Apparent diffusion coefficient

characterization of the fluid areas in cystic and abscess lesions of the neck.

Oral Radiol (2012, in press). 査読有

③ Eida S, Hotokezaka Y, Katayama I, Ichikawa Y, Tashiro S, Sumi T, Sumi M, Nakamura T

Apparent diffusion coefficient-based differentiation of cystic lesions of the mandible.

Oral Radiol (2012, in press). 査読有

〔学会発表〕(計1件)

中村 卓, 田代茂樹: cPLA2 コンディショナ
ル・ノックアウトマウスの作成

日本歯科放射線学会 第31回関西・九州合
同地方会(名古屋)

プログラム P2, 2011

12/10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号: 20300882

(2) 研究分担者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学・病院・講師

研究者番号: 10244089

片山 郁夫 (KATAYAMA IKUO)

長崎大学・病院・助教

研究者番号: 80295089

角 忠輝 (SUMI TADATERU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号: 80284701

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号: 30172406