

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24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650225

研究課題名（和文） miRNAの迅速かつ安価な *in vivo* 解析技術の開発と脳腫瘍への応用研究課題名（英文） Development of *in vivo* electroporation method for miRNA functional analysis in brain tumor development.

研究代表者

杉谷 善信 (SUGITANI YOSHINOBU)

公益財団法人がん研究会・ゲノムセンター・研究員

研究者番号：80360569

研究成果の概要（和文）：

発癌過程における miRNA の迅速かつ安価な生体機能解析技術の開発を目的として、トランスポゾンおよびインシュレーターを組み合わせた *in vivo* エレクトロポレーション(EP)のためのベクターシステムを開発した。さらに、この開発技術を実際に脳腫瘍モデルマウスに応用することによって、特定の miRNAs が脳腫瘍の発症に関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Development and application of new *in vivo* electroporation method, which is combined with transposon & insulator-based plasmid vector system, opened the door to elucidate that miRNAs are involved in shh-associated medulloblastoma formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	0	2,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	210,000	3,210,000

研究分野：発がん

科研費の分科・細目：実験動物モデル

キーワード：神経前駆細胞、多段階発癌、miRNA、脳腫瘍、細胞分化、Shh シグナル、遺伝子発現制御、*in vivo* エレクトロポレーション、

1. 研究開始当初の背景

近年、miRNA マイクロアレイの開発によって、脳腫瘍、大腸がん、肺がん、白血病等の様々な癌において各種 miRNA の発現異常が見いだされており、癌の発生および悪性化への関与が示唆されている。しかしながら、高頻度で発現異常を示す miRNA のリストアップこそすすんでいるものの、ごく少数の miRNA を除いてその生体機能は明らかにされていないの

が現状である。これは生体における miRNA の機能の理解が容易ではないためであり、以下の理由が挙げられる。

- (1) 1つの miRNA は多数の標的遺伝子(多いものでは 100 種類以上)を発現制御する。
- (2) miRNA の結合配列が mRNA の 3' UTR に存在しても、必ずしも抑制効果が得られない。

これらの事実は、コンピュータ解析による標的遺伝子の推測のみでは、miRNA の生体機能を理解することは困難であり、実験による直接的な検証が必須であることを意味している。

- (3) 多くの miRNA はファミリーを形成しており、さらに一つの miRNA が複数の遺伝子座にコードされる場合も少なくはない。また、異なるファミリー間で結合配列が酷似する場合がある。

したがって多大な費用と時間をかけて遺伝子改変マウスを作製し解析を行っても、他の miRNA の代償機能により容易にはその機能を明らかにできない可能性がある。

近年、個体発生研究においては、*in vivo* エレクトロポレーション (EP) 法が手軽な *in vivo* 遺伝子機能解析技術として注目されている。この方法はミュータントマウスの作製に比べ安価でかつ迅速に行うことができる。さらにプラスミドベクターを用いるため、ウイルスベクターに比較し導入可能な遺伝子サイズおよび遺伝子数についての制限が小さい点でも優れている。しかし癌細胞等の細胞分裂を繰り返す細胞においては導入プラスミドが分裂により希釈されてしまうために恒久的な遺伝子発現は難しく、生体での発癌過程における遺伝子機能解析には適していない。

2. 研究の目的

発癌の分子メカニズムを迅速にかつ安価に解明するための基盤技術を確認すべく、本研究では *in vivo* EP 法をベースにした miRNA 等各種遺伝子の機能解析技術の開発を目的とした。具体的には

- (1) 分裂を繰り返す標的細胞 (脳腫瘍起始細胞、前癌細胞、癌細胞) においても恒久的かつ安定に miRNA 機能阻害 RNA 等を発現させることができるベクターシステムを構築し、*in vivo* EP によりマウス個体の標的臓器・細胞に直接局所遺伝子導入する技術を開発する。

- (2) 実際に開発技術を脳腫瘍発症モデルマウスへ応用し、発癌における miRNA の生体機能を明らかにする。

以上を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

発癌研究のための *in vivo* EP 技術の開発を行うにあたり以下の (1)~(3) を行った。

- (1) 各種競合型 RNA による阻害効果の比較。

in vivo における miRNA 機能阻害のために競合型 RNA (Tough Decoy, miR sponge, shRNA) による miRNA 機能阻害効果を、RFP レポーター遺伝子および miRNA 発現ベクターを用いて培養細胞において比較解析を行った。

- (2) *in vivo* electroporation の条件検討。

脳腫瘍 (髄芽腫およびグリオーマ) の起始細胞への *in vivo* electroporation の至適条件を見いだすために、RFP あるいは Cre 組換え酵素の発現プラスミドベクター、および Cre 組換え依存的に細胞膜移行型 EGFP を発現するマウスを用いて条件 (電圧、DNA 量、器具、手術手技等) 検討を行った。

- (3) 発癌研究用ベクターシステムの構築。

神経前駆細胞及び前癌細胞において GFP と共に miRNA または miRNA inhibitor、あるいは cDNA を安定かつ持続的に発現させるために、導入標的細胞のゲノム内挿入に働くトランスポゾン、および導入ゲノム領域の影響を抑えて再現性の高い導入遺伝子の発現を得るためのインシュレーターを組み合わせたプラスミドベクターを構築した。これらを Cre 組換え酵素およびトランスポゼーの発現ベクターとともに、Cre 組換え依存的に LacZ または細胞膜移行型 EGFP を発現するマウス脳に *in vivo* エレクトロポレーションにより導入し、マウス個体での増殖細胞における発現安定性に対するトランスポゾンおよびインシュレーターの効果を組織学的に解析し従来法と比較した。

最後に (1)~(3) で開発した技術を腫瘍形成における miRNA の機能解析の研究へ応用するため、下記の (4) の研究を行った。

- (4) 小脳腫瘍形成における遺伝子機能解析。

研究代表者が独自に同定した miRNAs、および Nmyc 遺伝子について、脳腫瘍形成過程における機能を明らかにするために、小脳腫瘍モデルマウスである Ptc1 コンディショナルノックアウトマウスに対して今回開発した *in vivo* EP 技術を応用し、Ptc1 遺伝子の存在下および非存在下において脳腫瘍形成における miRNA および Nmyc 遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 各種競合型 RNA による阻害効果の比較。

3 種の miRNA に対して、それぞれ各種機能阻害 RNA (shRNA, TuD, miRNA sponge) の発現ベクターを作製し、RFP 連結レポ

ーター遺伝子を用いて *in vitro* で miRNA の機能阻害効果を解析した結果、shRNA あるいは TuD に顕著な機能阻害効果を確認した。

(2) *in vivo* electroporation の条件検討。

脳腫瘍（髄芽腫およびグリオーマ）の起始細胞である大脳皮質神経幹細胞および小脳顆粒前駆細胞への *in vivo* electroporation の至適条件を見いだすために、電極器具および手術手技等についての改良を重ねた結果、胎生期の小脳菱脳唇（rhombic lip）への遺伝子導入については 69% (35 匹中 24 匹)、胎生期大脳皮質および生後一週の小脳外顆層については非常に高い効率 99% (294 匹中 292 匹) および 94 匹中 93 匹での遺伝子導入が可能となった (第 70 回日本癌学会学術総会, Neuroscience2011, 第 34 回分子生物学会年会)。

(3) 発癌研究用ベクターシステムの構築。

従来のプラスミドベクターでは、分裂を終えたニューロンでは長期間（一ヶ月以上）発現が認められるものの、増殖細胞（神経前駆細胞または前癌細胞）では数日程度（胎生期大脳皮質：1～3 日，胎生期小脳菱脳唇および生後 7 日小脳顆粒細胞：3～6 日，）の発現の持続しか認められず、また *in vivo* EP 後 48 時間以降に導入遺伝子 (GFP, HA 標識 Nmyc 等) の発現が急速に低下する傾向が観察された (Neuroscience 2011, 第 34 回分子生物学会年会)。

一方、インシュレーターおよびトランスポゾンシステムの組み合わせることで、増殖細胞（脳腫瘍起始細胞、前癌細胞、癌細胞）における長期間（一ヶ月以上）かつ安定な導入遺伝子 (GFP, miRNA inhibitor または HA 標識 Nmyc 等) の発現が認められた。ただし導入効率については小脳に比較し、大脳皮質では低い傾向にあった。

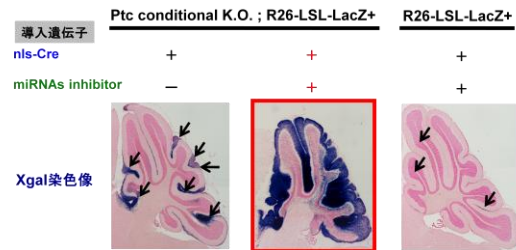
以上の結果から本ベクターシステムは発癌研究（特に小脳髄芽腫）に適することが示された。

(4) 小脳腫瘍形成における遺伝子機能解析

上記の遺伝子導入技術を脳腫瘍モデルマウスである *Ptch1* コンディショナルノックアウトマウスに応用し、研究代表者が生化学的解析および発現解析によって探索同定した小脳髄芽腫形成に抑制的に働きうる miRNAs について機能解析を行った。その結果、*Ptch1* 遺伝子の単独欠損に比較して、miRNAs の同時機能阻害を行うことによって小脳顆粒前駆細胞の分化抑

制と自己複製の顕著な亢進が認められた (下図) (2011 年日本癌学会学術総会, 投稿準備中)。以上の結果はプラスミドベクターによる増殖・腫瘍細胞における *in vivo* 遺伝子発現技術の開発ならびに髄芽腫形成に関与しうる miRNAs の同定に成功した

同定したmiRNAsは*Ptch1*非存在(*shh*シグナル亢進)下で増殖抑制に働く



ことを示している。

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)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Sugitani Y., Yaginuma K., Noda T. Molecular basis underlying the multi-step process for spontaneous medulloblastoma development. 第 70 回日本癌学会学術総会, Oct. 3, 2011, 名古屋

(2) Sugitani Y., Sugitani-Yoshida R. Nakai S., Ogawa M., Minowa O. & Noda T. Differential functional modes of Brn factors contribute to generate diverse projection neuron phenotype in neocortex. Neuroscience2011, Nov. 13, 2011, Washington

(3) Sugitani Y., Sugitani-Yoshida R. Nakai S., Ogawa M., Minowa O. & Noda T. Differential functional modes of Brn factors contribute to generate diverse projection neuron phenotype in neocortex. 第 34 回分子生物学会年会, Dec. 13, 2011, 横浜

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
杉谷 善信 (YOSHINOBU SUGITANI)
公益財団法人 がん研究会・ゲノムセンター・研究員
研究者番号：86360859

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし