

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300363

研究課題名(和文)がん細胞に老化を誘導し増殖・転移を抑制するマイクロRNAのメカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of senescence-associated microRNA inhibiting cell growth and metastasis

研究代表者

田原 栄俊(Tahara, Hidetoshi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00271065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円、(間接経費) 5,070,000円

研究成果の概要(和文)：老化を誘導するマイクロRNA, SA-miRNAとしてmiR-22を同定した。miR-22は、MCF-7、MDA-MB-231、SiHa細胞などのがん細胞に老化のマーカーであるSA-b-GalやSAHFを伴う増殖停止を誘導することを明らかにした。メカニズムとしては、CDK6、SP-1、SIRT1 および ヒストンH3.3などの標的を介してこれらの表現型を示すことを明らかにした。さらに、乳癌の高転移がん細胞MDA-231細胞ゼノグラフトモデルにおいて、mimic miR-22はその腫瘍の増殖および転移を抑制した。miR-22は老化を誘導する核酸医薬として期待できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified that senescent associated miRNA, SA-miRNA, miR-22 is down-regulated in various cancer cell lines including MCF-7, MDA-MB-231 and SiHa cells, suggesting that miR-22 should play important roles for cancer progression. Transfection of miR-22 strongly induces cellular senescence accompanied by enlarged morphology, senescent-associated b-Gal activity (SA-b-Gal) and senescent associated heterochromatin foci (SAHF) formation. By using 3-UTR luciferase assay and Western analysis, we identified CDK6, SP-1, SIRT1 and Histone H3.3 are targets of miR-22. Furthermore, synthetic miR-22 delivery significantly suppresses tumor growth and metastasis in vivo in a murine breast metastasis cancer model using MDA-MB-231 Luc cell lines. Our study provides the first evidence that the senescence-associated miRNA induces cellular senescence in human fibroblasts and cancer cells, and acts as tumor suppressor to play an important role in tumorigenesis.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：細胞老化 がん マイクロRNA 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

miRNA は、ゲノムから転写される 20-25 塩基の非常に短い non-coding RNA の一つであり、動植物に広く存在し、細胞の発生、分化、増殖などの様々な生物現象に重要な役割を果たしている。*miRNA* は、転写後にプロセッシングを経て、*mRNA* の翻訳や転写を阻害する (図 1)。*miRNA* は、*siRNA* と異なり一つの *miRNA* で約 100 以上もの遺伝子の翻訳調節 (翻訳阻害) や転写抑制を行うことができ、細胞内の遺伝子調節の新機構として近年世界中で注目されている (*Nature* 455, 64-67, 2008)。しかし、癌抑制メカニズムとして重要視されている細胞老化に関わる *miRNA* については、ほとんど明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

多様な生物現象における新しい遺伝子調節機構として、*microRNA* (*miRNA*) が注目されている。本研究では、研究代表者らが新たに発見したヒト細胞老化 (*cellular senescence*) に寄与する *miRNA* である *miR-22* に焦点を当て、正常細胞およびがん細胞における *miR-22* による老化誘導機構を明らかにすることを目的としている。がん細胞は、正常細胞にみられる老化プログラムから逸脱した細胞であり、この老化プログラムを再活性化することが、がん抑制機構の重要な方法であるといわれている。*miR-22* は、様々ながん細胞の老化を誘導し、*in vivo* での腫瘍抑制、転移の抑制効果を示し、老化のリプログラミングを起こす。本研究では、我々が同定した新規老化誘導 *miRNA* である *miR-22* に焦点を絞り、細胞老化における *miR-22* 発現増加メカニズム、*miR-22* が癌細胞に老化を誘導し増殖および転移を抑制するメカニズム解明、*miR-22* が有効な癌種の同定など、次世代核酸医薬品に向けた基盤研究を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 老化関連マイクロ RNA の同定

細胞老化マイクロ RNA の候補を同定するために正常線維芽細胞 TIG-3 細胞の若い細胞 (50 代) と老化細胞 (80 代) から全 RNA を解析して網羅的なマイクロ RNA の発現解析を 3D Gene *miRNA* array 解析 (東レ株式会社) にて解析を行った。

(2) 老化関連マイクロ RNA *miR-22* の正常細胞に対する影響

老化関連マイクロ RNA の一つ *miRNA* を合成したものを正常線維芽細胞 TIG-3 細胞、MRC-5 細胞、IMR-90 細胞に RNAiMax を用いてトランスフェクションし、細胞の増殖に対する効果を細胞数のカウントにより計測した。また、同時に老化細胞のマーカである老化関連ベータガラクトシダーゼ活性による緑色染色および DAPI の染色による SAHF の形成をカウントして、老化細胞の評価を行った。

(3) 老化関連マイクロ RNA *miR-22* のがん細胞での発現解析

大腸癌、肺がん、子宮頸がん、乳癌、胃がんなどのがん細胞株から RNA を抽出して、*miR-22* に特異的なプライマーを用いてその発現を qRT-PCR により解析した。

(4) 老化関連マイクロ RNA *miR-22* のがん細胞に対する影響

合成 *miR-22* を種々のがん細胞株に RNAiMax を用いてトランスフェクションして、その効果を細胞増殖、老化細胞のマーカである老化関連ベータガラクトシダーゼ活性による緑色染色および DAPI の染色による SAHF の形成などをカウントして評価した。

(5) *miR-22* によるがん細胞およびがん幹細胞の細胞周期解析

合成 *miR-22* を種々のがん細胞株に RNAiMax を用いてトランスフェクションして、その効果を FACS により細胞周期を解析した。

(6) *miR-22* によるがん細胞の増殖及び転移を抑制する詳細なメカニズムの解明

標的遺伝子の予測を *in silico* 解析を行い、その標的に関して 3' -UTR ルシフェラーゼ活性を測定して評価した。特異性は、シード配列の変異を導入して確認した。また、MIR-22 により抗腫瘍効果を示したがん細胞でのトランスクリプトーム解析を行った。

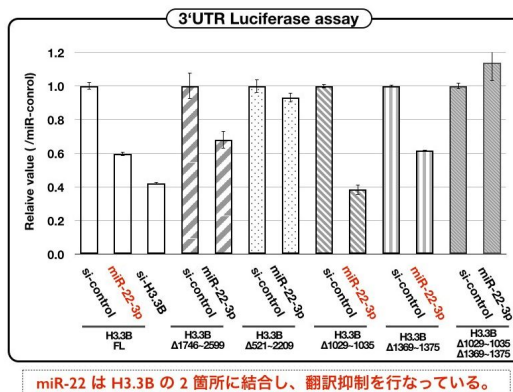
(7) miR-22 が癌細胞の増殖・転移を抑制可能な癌種の検索と *in vivo* 抗腫瘍活性の検証
乳癌の転移モデルマウス、膵がんのゼノグラフト、オルソトロピックマウスを構築するためにそれぞれのがん細胞でルシフェラーゼを発現する細胞株の樹立を行い、それらを用いてマウスの作成を行った。IN VIVO の腫瘍抑制効果は、MIR-22 処理による腫瘍の抑制をルシフェラーゼの発光量により評価した。

4. 研究成果

老化関連マイクロ RNA miR-22 の機能解析として以下の項目を実施した。(1) 老化関連マイクロ RNA の同定 (2) 老化関連マイクロ RNA miR-22 の正常細胞に対する影響 (3) 老化関連マイクロ RNA miR-22 のがん細胞での発現解析 (4) 老化関連マイクロ RNA miR-22 のがん細胞に対する影響 (5) miR-22 によるがん細胞およびがん幹細胞の細胞周期解析 (6) miR-22 によるがん細胞の増殖及び転移を抑制する詳細なメカニズムの解明 (7) miR-22 が癌細胞の増殖・転移を抑制可能な癌種の検索と *in vivo* 抗腫瘍活性の検証 (8) miR-22 の細胞内での発現と細胞外小胞として細胞外に分泌される miR-22 などのマイクロ RNA の発現解析

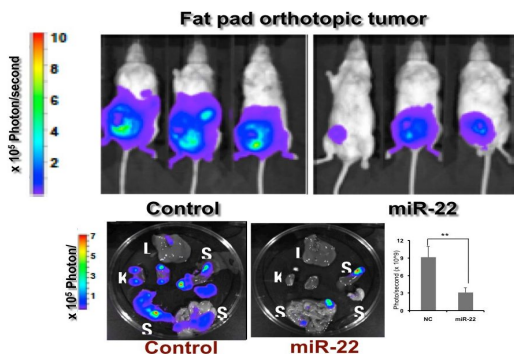
その結果、正常線維芽細胞 TIG-3 細胞の若い細胞 (50 代) と老化細胞 (80 代) から全 RNA を解析して網羅的なマイクロ RNA の発現解析を 3D Gene miRNA array 解析 (東レ株式会社) にて解析したところ、若い細胞に比べて 2 倍以上発現増加しているものを老化関連マイクロ RNA の候補を 20 種 (miR-22 など) 同定した。miR-22 の発現解析の結果、老化した正

常細胞で miR-22 の発現増加が見られた。一方、大腸癌、肺がん、子宮頸がん、乳癌、胃がんなどの複数のがん細胞株では、顕著な発現低下が見られた。さらに miR-22 は、正常細胞およびがん細胞での細胞増殖の抑制がみられ、これは老化細胞のマーカである老化関連 β タガラクトシダーゼ活性による緑色染色および DAPI の染色による SAHF の形成を顕著に示すことから、老化誘導による増殖停止と考えられた。FACS による細胞周期解析では、G1/S 期の増加と S 期移行の阻害が見られた。標的遺伝子としては、*in silico* 解析と 3-UTR-ルシフェラーゼ活性の解析により、SP1、SIRT1、CDK6、ヒストン H3.3 を標的にしていることを見いだした。3 種の seed 配列変異型 H3.3 では、miR-22 による 3' UTR ルシフェラーゼ活性の抑制が解除されたことから、これらはいずれも miR-22 のダイレクトターゲット遺伝子であることが明らかになった。

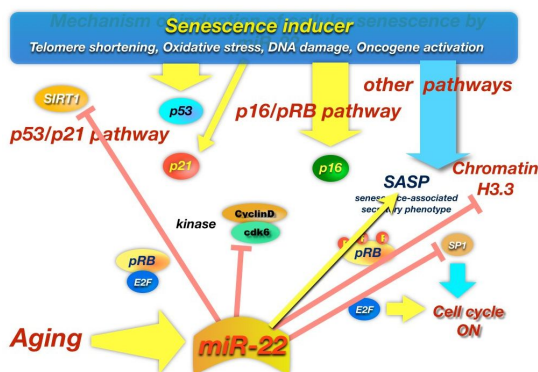


さらに、H3.3A および H3.3B を認識する抗体を用いてタンパク質レベルでの解析を行ったところ、H3.3B のタンパク質が顕著に抑制された。以上の結果から、miR-22 は、H3.3B の 3' UTR に結合してその翻訳を抑制していることを明らかにできた。さらに H3.3 に対する siRNA を構築し、H3.3 を抑制できる siRNA を用いて、正常細胞に対する効果を検討した。その結果、H3.3 siRNA は、正常細胞の増殖を顕著に抑制した。乳癌の転移モデルマウスを用いた評価では、miR-22 は腫瘍増殖

および転移の抑制がみられた。



細胞内の miRNA およびエクソソーム中の miRNA を qRT-PCR により解析したところ、細胞内では老化と共に顕著に miR-22 の発現が増加するのに対して、エクソソーム中の miR-22 の発現量は極めて低かった。miR-22 と同じ機能を持つ老化関連マイクロ RNA である miR-34a, miR-30 など同様にエクソソーム中に排出されるマイクロ RNA が極めて低いことを見いだした。miR-22 により増殖抑制が見られるがん細胞でのトランスクリプトーム解析により、IGFBP3 や PAI1 などの複数の細胞老化のシグナル系が活性化されており、miR-22 は、細胞老化のスイッチマイクロ RNA として重要なマイクロ RNA であることを明らかにできた。



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)

[雑誌論文](計9件)

Miyagi T, Shiotani B, Miyoshi R, Yamamoto T, Oka T, Umezawa K, Ochiya T, Takano M, Tahara H., DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins., *Cancer Sci.*, 査読有、in press, 2014, in press 10.1111/cas.12420.

Shiotani B, Nguyen HD, Hakansson P, Marechal A, Tse A, Tahara H, Zou L. Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1., *Cell Rep.*, 査読有、3(5), 2013, 1651-62, 10.1016/j.celrep.2013.04.018

Mikihiisa Takano, Chieko Yamamoto, Keisuke Sambuichi, Keisuke Oda, Junya Nagai, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, and Ryoko Yumoto Introduction of a Single Transporter Gene ABCA3 Directs RLE— 6TN to More Type II— like Alveolar Epithelial Cells, *EMBRANE*, 査読有、Vol.38(5), 2013, 246-253

Sato, M., Shin-ya, K., Lee, J.I., Ishihara, M., Nagai, T., Kaneshiro, N., Mitani, G., Tahara, H. & Mochida, J. Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential., *BMC Musculoskelet Disorders*, 査読有、13, 2012, 1-10, 10.1186/1471-2474-13-51

D. Xu, H. Tahara The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 査読有、65(3), 2012, 368-375, 10.1016/j.addr.2012.07.010.

Kudo, Y., Iizuka, S., Yoshida, M., Tsunematsu, T., Kondo, T., Subarnbhesaj, A., Deraz, E.M., Siriwardena, S.B., Tahara, H., Ishimaru, N., Ogawa, I., Takata, T. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis., *J Biol Chem.*, 査読有、287(46), 2012, 38716-28, 10.1074/jbc.M112.373159

D. Xu, F. Takeshita, Y. Hino, S. Fukunaga, Y. Kudo, A. Tamaki, J. Matsunaga, R. Takahashi, T. Takata, A. Shimamoto, T. Ochiya, H. Tahara, miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence, *J. Cell Biology*, 査読有、193, 2011, 409-442, doi: 10.1083/jcb.201010100

Y. Matsumoto, T. Miyamoto, H. Sakamoto, H. Izumi, Y. Nakazawa, T. Ogi, H. Tahara, S. Oku, A. Hiramoto, T. Shiiki, Y. Fujisawa, H. Ohashi, Y. Sakemi, S. Matsuura, Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly, *DNA Repair (Amst)*, 査読有、10, 2011, 314-321, doi: 10.1016/j.dnarep.2010.12.002

H. Tahara, Telomere G-overhang length measurement method 2: G-tail telomere HPA, *Methods Mol Biol*, 査読有、735, 2011, 55-61,

DOI: 10.1007/978-1-61779-092-8_6

〔学会発表〕(計 35件)

田原栄俊 Therapeutic role of microRNAs in cancer and cellular senescence, Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting 2013年11月25日～2013年11月25日 東京大学山上会館

田原栄俊 テロメア・マイクロRNAを用いた次世代健康診断システム,第3回臨床ゲノム医療学会大阪大会(招待講演) 2013年11月23日～2013年11月23日 大阪大学谷口記念講堂

田原栄俊 テロメア・マイクロRNAを用いた次世代健康診断システム,ゲノムドクター&キャスターセミナー特別講演(招待講演) 2013年10月06日～2013年10月06日 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂

田原栄俊 老化を誘導する抗腫瘍核酸医薬の可能性,第72回日本癌学会学術総会(招待講演) 2013年10月05日～2013年10月05日 パシフィコ横浜

田原栄俊 マイクロRNAを用いた革新的ながん診断・治療,第14回ホルモンと癌研究会(招待講演) 2013年07月12日～2013年07月12日 東京大学山上会館

Hidetoshi Tahara Senescence-associated microRNAs, a novel approach to tumor suppression,9th AACR-JCA Joint Conference (招待講演) 2013年02月22日～2013年02月22日 Hyatt Regency Maui (アメリカ)

Hidetoshi Tahara Senescence associated microRNAs and exosomes coordinately regulate cellular senescence and tumor microenvironment,CSH Asia / ICMS (The International Cancer Microenvironment Society) Joint Conference on TumorMicroenvironment(招待講演) 2012年10月14日～2012年10月14日 Suzhou Dushu Lake Conference Center (中国)

田原 栄俊 Micromanagement of cancer by senescence-associated micro RNA,第71回日本癌学会学術総会 2012年09月20日～2012年09月20日 ホテルロイトン札幌

Hidetoshi Tahara Senescence-associated miRNA and Extracellular Vesicles in Aging and Cancer,The 22nd HCS / 4th JARI Joint Symposium(招待講演) 2012年08月30日～2012年08月30日 グランドプリンスホテル広島

Hidetoshi Tahara Micro RNAs regulate

cellular senescence through targeting common senescence pathways、The 11th Korea-Japan-Germany Joint Symposium on Cancer and Ageing Research 2012年07月06日～2012年07月06日 Gyeongju Hilton Hotel (韓国)

田原 栄俊 マイクロRNAが変える未来の次世代診断と治、BIOtech 2012(招待講演) 2012年04月26日～2012年04月26日 東京ビッグサイト

〔その他〕

ホームページ等

<http://cell.pharm.hiroshima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00271065

(2)研究分担者

落谷 孝広 (OCHIYA TAKAHIRO)

国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・分野長

研究者番号：60192530