

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790670

研究課題名（和文）

癌の「microRNA 調節予防法」の開発

研究課題名（英文）

Development of “microRNA-regulating chemoprevention in cancer”

研究代表者

友杉 充宏 (TOMOSUGI MITSUHIRO)

京都市立医科大学 医学部 プロジェクト研究員

研究者番号：60533429

研究成果の概要（和文）：

既知の癌予防食品成分から microRNA の発現を調節している物質を見つけるため、RB 失活癌細胞に対して G1 期における細胞周期停止を促す物質の探索を行った。その結果、フラボンを見いだした。フラボンは RB 非依存的に G1 期における細胞周期停止を誘導した。そのメカニズムとして、RB ファミリーである p130、p107 の活性型フォームが観察された。また、転写因子である E2F1、E2F3 タンパク質の量が減少していることが見いだされた。そこで E2F3 をターゲットとしている microRNA である miR-34a の関与を検討したところ、miR-34a の発現量が上昇していることが明らかになり、miR-34a がフラボンによる G1 期停止に一部関与していることが示唆された。これらの結果から、食品成分による生体内 microRNA の調節は可能であると示唆され、microRNA を調節することによる癌の化学予防の実現が充分期待出来る。

研究成果の概要（英文）：

I searched for the food components that regulated microRNA expression. As a result from flow cytometry analysis, flavone was found, using RB inactivated cancer cells.

In mutated RB cell line, flavone increased phosphorylated RB family proteins p130 and p107. Flavone induced tumor suppressor microRNA miR-34a with reduction of E2F1 and E2F3, known to be downregulated by miR-34a, raising the possibility that miR-34a might partially contribute to G1 arrest by flavone.

These results suggested that food component could control expression of microRNA in vivo. The research of miR-34a regulated by flavone might realize “microRNA-regulating chemoprevention in cancer”.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：癌、microRNA、予防法開発、細胞周期停止、RB

## 1. 研究開始当初の背景

近年、non-coding RNA の 1 種である microRNA が全てのヒト遺伝子の約 3 分の 1 において、その発現量を調節することが解明されている。特に、癌分野において数多くの癌抑制および、癌促進的に働く microRNA が明らかになっている。しかしながら、癌予防に対する応用という点では、ほとんど研究がなされていなかった。そこで、この microRNA という新しい概念を癌予防研究に取り込み、新規癌予防方法の開発につながるという着想をえた。

## 2. 研究の目的

1. の背景から、本研究では癌細胞増殖抑制的に働く microRNA の発現を調節する新規癌予防物質を、食品成分から同定することを試みる。これは、日常における食生活を変容させることによる新規癌予防方法の開発につながることを考えたためである。

## 3. 研究の方法

### 「食品成分のスクリーニング」

p53 および RB 失活癌細胞 (ヒト前立腺癌細胞 DU145) を用いることでスクリーニングを行った。その方法として細胞数を調べることで、細胞増殖抑制効果を調べた後、当該効果の詳細をフローサイトメトリーによって解析し、G1 期細胞周期停止を誘導する化合物を見いだした。またその他の RB 失活腫瘍細胞 (Saos-2(骨肉腫)、HTB-9(膀胱癌)) に対する細胞周期解析も行った。

### 「G1 期停止関連タンパク質の解析」

スクリーニングによって見いだされた化合物による RB 非依存的 G1 期停止メカニズム解明のため、G1 期停止関連タンパク質の挙動をウエスタンブロット分析によって調べた。

### 「リアルタイム PCR」

ウエスタンブロット分析結果から、量的変化をみせたタンパク質の mRNA 解析を行った。また、ウエスタンブロット分析の結果から推測された microRNA の発現量の測定も行った。

### 「マウス線維芽細胞 (MEF) を用いた細胞周期解析」

スクリーニングによって見いだされた化合物による G1 期停止における RB ファミリーの関与を調べるため、RB ファミリーノックア

ウト MEF を用いたフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行った。

### 「分子標的薬を用いた細胞周期解析」

HDAC 阻害剤、トリコスタチン A、PI3K 阻害剤、LY294002 を用いて RB 失活癌細胞に対してフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行った。

### 「microRNA アンチセンス阻害剤による当該効果に対する影響」

miR-34a アンチセンス阻害剤を用いることで、食品成分による microRNA の寄与の程度を調べた。

## 4. 研究成果

### 「食品成分のスクリーニング」

様々な食品成分および、薬剤を用いて WST-8 アッセイを行った結果、数種類の細胞増殖抑制効果をもつ物質を見いだした。

さらに、それらの化合物を用いてフローサイトメトリー解析を行い、G1 期細胞周期停止を誘導する物質としてフラボンを見いだした (図 1、2)

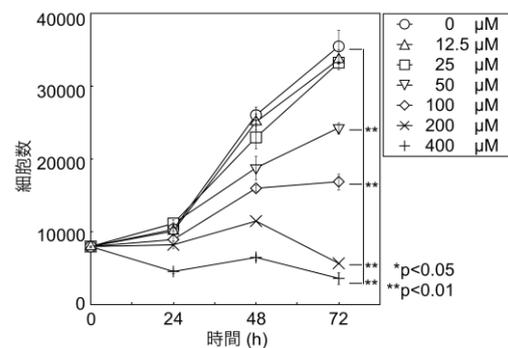


図1 フラボンによるDU145に対する影響

また、フラボンは、その他の RB 失活細胞に対しても G1 期における細胞周期停止を誘導することが明らかとなった。

### 「G1 期停止関連タンパク質の解析」

G1 期における細胞周期停止に関連するタンパク質の挙動をウエスタンブロット分析によって調べた。その結果、p21、p27 の上昇、CDK4、CDK6 の減少が確認された。また、RB ファミリーの P130、p107 の活性型フォームが確認された (図 3)。

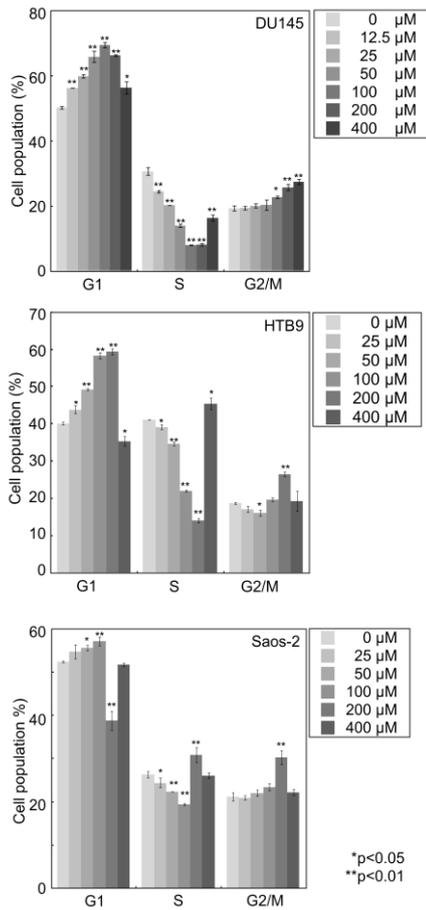


図2 フラボンによるRB失活癌細胞に対する細胞周期解析

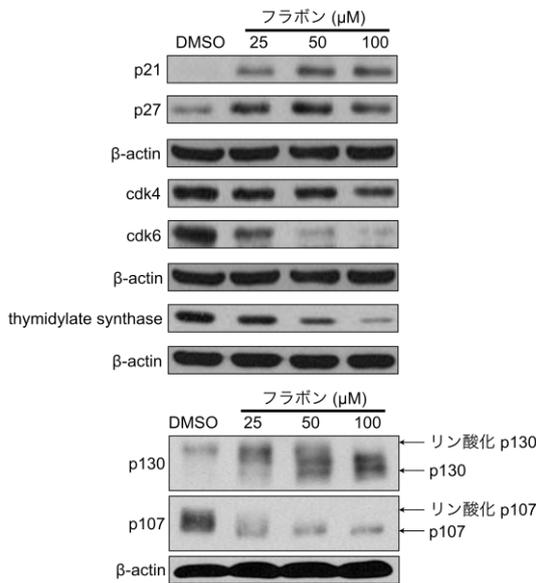


図3 フラボンによるG1期停止関連タンパク質の解析

「リアルタイム PCR」

ウェスタンブロットの結果から、量的変化

を示したタンパク質の mRNA 解析を行った結果、p21 mRNA の発現上昇がみられたが、p27 は変化がなかった。また CDK4、CDK6 は mRNA レベルでの減少がみられた (図 4)。

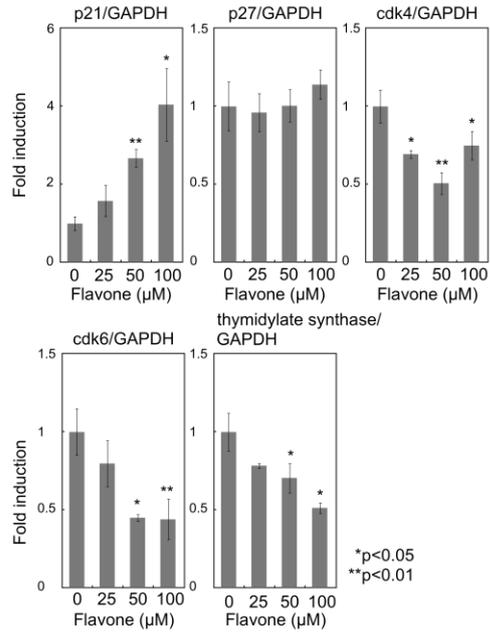
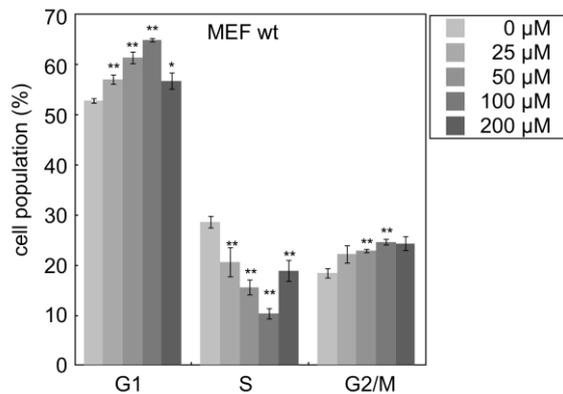


図4 フラボンによるG1期停止関連mRNAの解析

「マウス線維芽細胞(MEF)を用いた細胞周期解析」

フラボンによる G1 期停止において、RB ファミリーである、p130、p107 の関与が考えられる。そこで、RB ノックアウト MEF (RB<sup>-/-</sup>)、RB ファミリートリプルノックアウト MEF (tko) を用いて RB ファミリーの関与を検討したところ、MEF (wt)、p130、p107 が存在する MEF (RB<sup>-/-</sup>) では G1 期停止が誘導されたが、すべての RB ファミリーがノックアウトされた MEF (tko) では、G1 期停止は誘導されなかった (図 5)。



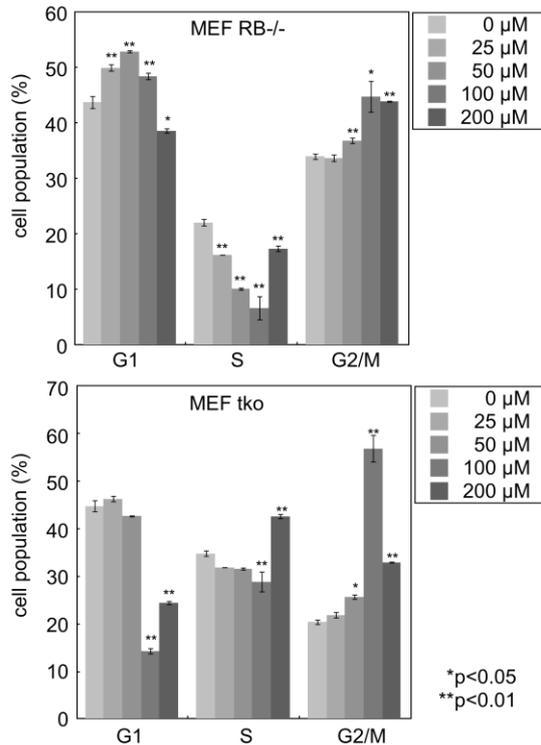


図5 フラボン誘導G1期停止におけるMEFを用いたRBファミリーの関与

「分子標的薬を用いた細胞周期解析」

一般的に G1 期停止を誘導する分子標的薬 (HDAC 阻害剤、トリコスタチン A (TSA) と PI3K 阻害剤、LY294002) について、RB 失活癌細胞に対して G1 期における細胞周期を誘導することが可能かどうかを検討した (図 6)。その結果、両薬剤とも、G1 期停止を誘導することが明らかとなった。さらにフラボン同様 RB ファミリーの活性型が観察された。

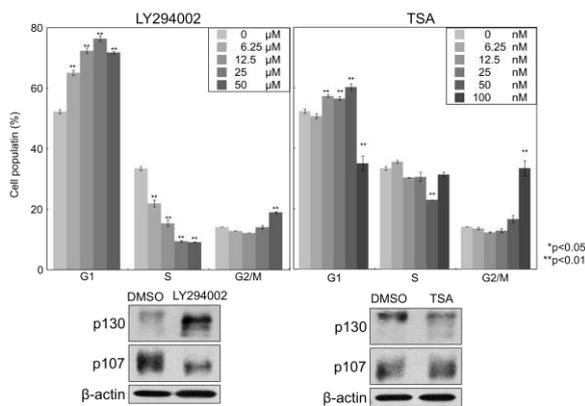


図6 分子標的薬によるRB非依存的G1期停止の誘導

「microRNA の関与」

フラボンによる G1 期に停止に関連するタンパク質の挙動において、E2F1、E2F3 の減少も確認された (図 7)。そこで、E2F3 をターゲットにしている癌抑制的に働く miR-34a の関与を考え、リアルタイム PCR を用いて miR-34a の発現量を測定した (図 8)。その結果、フラボンによって miR-34a が誘導されていることが明らかになった。

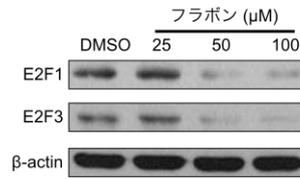


図7 フラボンによるE2Fの制御

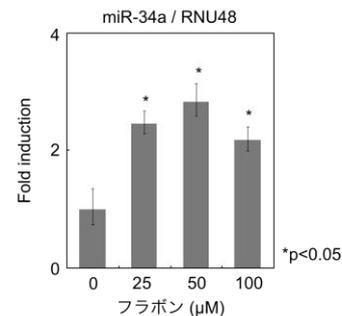


図8 フラボンによるmiR-34aの発現誘導

「microRNA アンチセンス阻害剤による当該効果に対する影響」

図 7、図 8 の結果から、フラボンが miR-34a を誘導することが明らかとなった。そこで、フラボンによる効果における miR-34a の関与を miR-34a アンチセンス阻害剤を用いることで調べた (図 9)。また、E2F の発現量についても調べた (図 10)。

その結果、一部ではあるが、フラボンによる G1 期における細胞周期停止に、miR-34a の関与が示唆された。

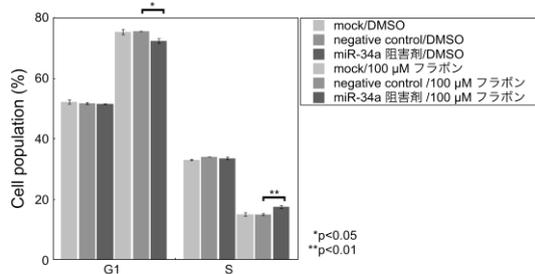


図9 フラボンによるG1期停止におけるmiR-34aの関与 (細胞周期解析)

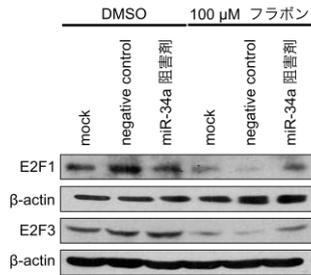


図10 フラボンによるG1期停止におけるmiR-34aの関与 (ウエスタンブロット解析)

以上の結果から、従来 G1 期停止は RB を介した経路でのみ誘導されると考えられていたが、フラボンや分子標的薬が RB 非依存的に G1 期停止を誘導することを見いだした。そのメカニズムとして RB ファミリーである p130、p107 の活性化が考えられる。これらのことから RB のステータスは治療や予防において問題にならないことがわかった。

また、フラボンは miR-34a の発現を誘導し、当該効果に関与していたことから、食品成分による microRNA の発現コントロールは可能であると考えられる。このことから日常生活における食生活の変容からの癌予防は可能であると考えられ、microRNA を指標とした「分子標的癌予防法」の開発は可能であると考えられる。

今後は、さらにスクリーニングを続け、「癌の分子標的予防法」の確立を目指す。

#### 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 1 件)

Tomosugi M, Sowa Y, Yasuda S, Tanaka R, te Riele H, Ikawa H, Koyama M, Sakai T, Retinoblastoma gene-independent G1 phase arrest by flavone, phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, and histone deacetylase inhibitor, Cancer Science、査読有、103、2012、 2139-2143

[学会発表] (計 3 件)

- ① 友杉充宏、曾和義広、安田周祐、田中良一、井川陽菜、小山真、酒井敏行、フラボンや分子標的薬による RB 非依存的な G1 期停止の誘導、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 25 日、石川県金沢市金沢大学鶴間キャンパス
- ② 友杉充宏、曾和義広、安田周祐、小山真、酒井敏行、RB independent G1-phase

arrest by molecular-targeting agents and flavone (フラボンや分子標的薬による RB 非依存的な G1 期停止の誘導)、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道札幌市ロイトン札幌

- ③ 友杉充宏、曾和義広、酒井敏行、フラボンによる RB 非依存的 G1 期停止の誘導、がん予防大会 2011 京都、2011 年 6 月 21 日、京都府京都市京都府立医科大学図書館ホール

[その他]

ホームページ等

ホームページアドレス

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

友杉 充宏 (TOMOSUGI MITSUHIRO)

京都府立医科大学 医学部 プロジェクト研究員

研究者番号：60533429

研究者番号：

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：