

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670078

研究課題名(和文) miR-27aによるMDR1発現調節：作用増強(癌組織)と副作用回避(正常組織)

研究課題名(英文) The role of miR-27a in regulation of P-gp expression

研究代表者

家人 一郎 (Ieiri, Ichiro)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60253473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにmiR-27がP-glycoprotein (P-gp)発現制御に関与する事を見出しており、本研究ではその制御メカニズムを解明するとともに、miR-27aのP-gp発現への影響が細胞間で異なるという現象に着目し、効果的ながん化学療法を指向した研究を行った。Caco2細胞におけるmiR-27aによるP-gp発現上昇作用は、miR-27aがHIPK2発現を抑制することで引き起こされることが示唆された。また、miR-27a発現量を変動させることでイリノテカン、ドキシルピシンに対する感受性が変化したことから、miR-27a発現量の制御に基づく効果的ながん化学療法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) is one of the best studied ATP-binding cassette transporters. Over-expressed P-gp in cancer tissues confers resistance to a broad range of anticancer drugs. It is important to clarify the regulation mechanism of ABCB1 gene expression. MicroRNA regulates the target genes expression negatively through translational repression or mRNA degradation. We had already shown that ABCB1 is the target of miR-27a. In this study, we analyzed the mechanism behind the regulation of P-gp expression by of miR-27a regulating P-gp expression and evaluated the effect of miR-27a on the sensitivity to anti-cancer drug in human cell lines. Our results suggest that miR-27a increased the expression of ABCB1 mRNA via down-regulated HIPK2 expression in Caco2 cells. Precursor miR-27a transfected Caco2 cells showed the decreased the sensitivity to irinotecan and doxorubicin. Regulating miR-27a expression levels may allow the application of individualized cancer chemotherapy.

研究分野：薬物動態学

キーワード：microRNA P-gp

1. 研究開始当初の背景

P-glycoprotein (P-gp / ABCB1) は生体内に広く存在し、様々な薬物を細胞外へ排出するトランスポーターである。がん細胞に高発現することで多剤耐性化をもたらすことが知られるが、発現制御機構は完全には明らかとなっていない。そこで発現制御機構解明への新たなアプローチとして microRNA (miRNA) に着目した。miRNA は内在性の non-coding small RNA の一種で、mRNA の 3' -非翻訳領域 (3' -UTR) に結合し、翻訳阻害や mRNA 切断によって遺伝子発現を抑制する。これまでに P-gp 発現制御に関わる miRNA として miR-27a を見出し、レポータージーンアッセイにより、これらの miRNA が ABCB1 3' -UTR に作用して発現を抑制することを明らかにした。また、miR-27a はヒト白血病由来細胞 K562 細胞とヒト結腸癌由来細胞 Caco2 細胞において P-gp に対してそれぞれ異なった影響を与えることを明らかにしてきた。miR-27a の P-gp 発現への細胞間での異なる作用に基づき、抗がん剤治療の効果増強・副作用軽減への展開が想起された。

2. 研究の目的

本研究では miR-27a 発現を調節することで効果的ながん化学療法を指向し、miR-27a が培養細胞において P-gp 発現および P-gp 基質薬物の抗腫瘍効果に及ぼす影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ABCB1、HIPK2、ZBTB10 mRNA、P-gp 発現への miR-27a の影響評価

miR-27a 前駆体をヒト白血病由来細胞 K562 細胞 (20 nM)、ヒト結腸がん由来細胞 Caco-2 細胞 (50 nM) に導入し、mRNA 発現量を qRT-PCR、P-gp 発現量を Western blotting により定量した。

(2) ABCB1 mRNA 発現への HIPK2、ZBTB10 の影響評価

HIPK2、ZBTB10 をそれぞれの siRNA でノックダウンし、ABCB1 mRNA 発現量に与える影響を qRT-PCR により定量した。

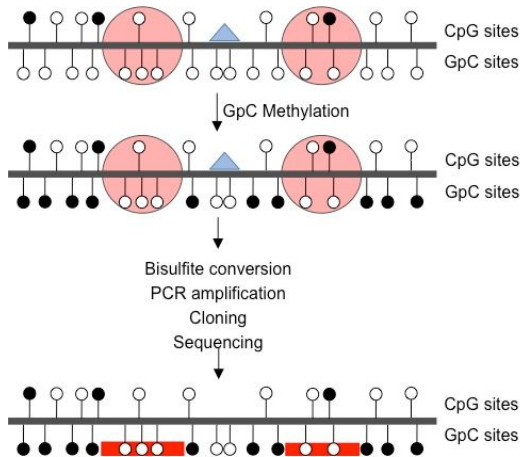
(3) ABCB1 遺伝子転写開始点近傍への転写調節因子結合への miR-27a の影響評価

miR-27a 前駆体を導入した K562 細胞 (20 nM)、Caco-2 細胞 (50 nM) について NOME-Seq を行い (Fig. 1)、miR-27a が転写調節因子の ABCB1 遺伝子転写開始点近傍への結合に与える影響を評価した。

(4) P-gp 基質薬物 IRT、DOX の薬効への miR-27a の影響評価

anti-miR-27a を導入した K562 細胞 (50 nM)、miR-27a 前駆体を導入した Caco-2 細胞 (50 nM) を 96 well plate に播種し、イリノテカン (IRT)、ドキソルピシン (DOX) 曝露 48 時間後の細胞生存活性を WST-8 assay により評価した。

Fig. 1 Flow chart of NOME-Seq methodology  
White circles: unmethylated, black circles: methylated. The blue triangle represents the bound transcription factor. Red bars represent regions to accommodate a nucleosome.



4. 研究成果

(1) miR-27a が P-gp 発現に与える影響

K562 細胞、Caco-2 細胞に miR-27a を導入したところ、K562 細胞では P-gp 発現を有意に低下させるのに対し、Caco-2 細胞では P-gp 発現を有意に上昇させた。このことから、K562 細胞と Caco2 細胞で miR-27a が P-gp 発現を制御する機構が異なることが考えられる。

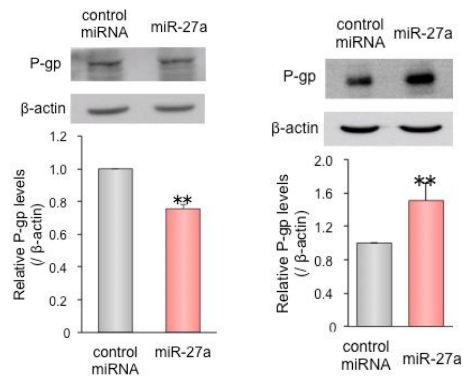


Fig. 2 A The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into K562 cells at 20 nM. Relative P-gp expression levels were determined by western blot. (n = 3) B The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into Caco-2 cells at 50 nM. Relative P-gp expression levels were determined by western blot. (n = 8) (bars, S.D.; \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01, compared with the control.)

(2) HIPK2、ZBTB10 が ABCB1 mRNA 発現に与える影響

HIPK2、ZBTB10 が ABCB1 の抑制因子であるか確かめるために、これらの因子をノックダ

ウンしたところ、K562、Caco2 両細胞において ABCB1 mRNA 発現量は上昇した。このことから、これらの因子は Caco2 細胞、K562 細胞において P-gp の発現を抑制する転写調節因子であることが示唆された。

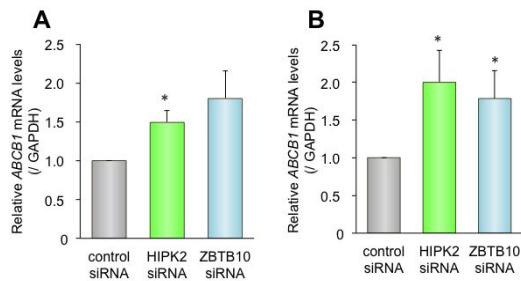


Fig. 3 **A** The siRNA for HIPK2 or ZBTB10 or control siRNA was transfected into K562 cells at 100 nM. Relative ABCB1 mRNA expression levels in K562 cells were determined by Real-time RT-PCR. (n = 3) **B** The siRNA for HIPK2 or ZBTB10 or control siRNA was transfected into Caco-2 cells at 10 nM and 20 nM, respectively. Relative ABCB1 mRNA expression levels in Caco-2 cells were determined by Real-time RT-PCR. (n = 4) (bars, S.D.; \*, p < 0.05, compared with the control.)

### (3) miR-27a が HIPK2、ZBTB10 mRNA 発現に与える影響

miR-27a が HIPK2、ZBTB10 の発現抑制に関与しているのかを明らかにするために、K562、Caco-2 細胞に miR-27a を導入した。その結果、K562 細胞では miR-27a によって HIPK2、ZBTB10 mRNA はどちらも抑制されなかったのに対し、Caco-2 細胞では HIPK2 は miR-27a によって抑制、ZBTB10 は有意ではなかったものの、miR-27a による発現低下傾向を認めた。このことから、K562 細胞と Caco2 細胞における miR-27a の P-gp 発現への作用が異なる要因として miR-27a による転写因子発現抑制の有無が関与している可能性が示された。

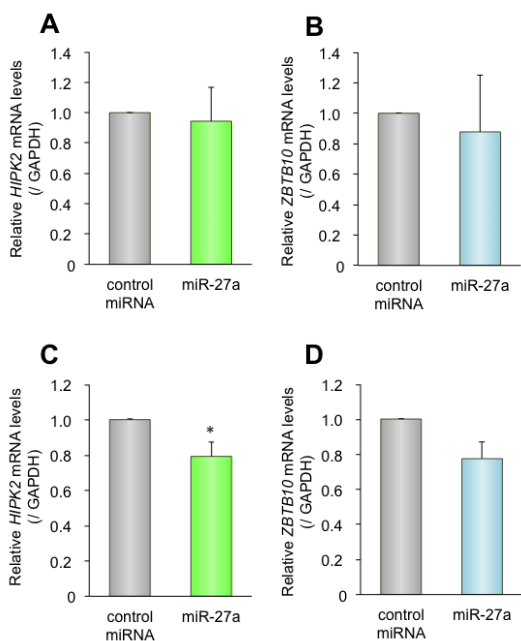


Fig. 4 **A, B** The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into K562 cells at 20 nM. Relative HIPK2 (**A**) and ZBTB10 (**B**) mRNA expression levels in K562 cells were determined by Real-time RT-PCR. (A, B: n = 4) **C, D** The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into Caco-2 cells at 50 nM. Relative HIPK2 (**C**) and ZBTB10 (**D**) mRNA expression levels in Caco-2 cells were determined by Real-time RT-PCR. (C, D: n = 3)

### (4) miR-27a による P-gp 発現上昇への HIPK2、ZBTB10 の関与

Caco-2 細胞において、HIPK2、ZBTB10 の 2 種の転写調節因子をノックダウンすることで、miR-27a による ABCB1 mRNA 発現上昇への影響を評価した。その結果、HIPK2 をノックダウンすることで、miR-27a による有意な ABCB1 mRNA 発現上昇を認めなくなった一方で、ZBTB10 のノックダウン条件下における miR-27a による ABCB1 mRNA 発現上昇はコントロール siRNA と同程度であった。このことから、Caco2 細胞における miR-27 による P-gp 発現上昇には HIPK2 が主要な役割を果たしている可能性が示された。

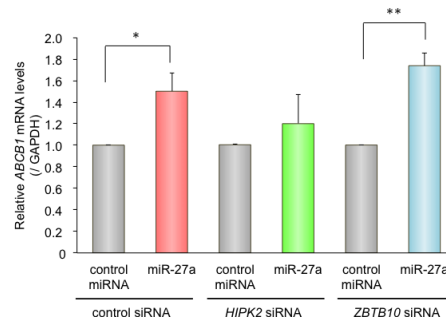


Fig. 5 The siRNA for HIPK2 or ZBTB10 or control siRNA was transfected into Caco-2 cells at 20 nM. The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into the cells at 50 nM after 24 hr from HIPK2, ZBTB10 knockdown. Relative ABCB1 mRNA expression levels were determined by Real-time. (n = 3, bars, S.D.; \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01, compared with the control.)

### (5) miR-27a が ABCB1 遺伝子転写開始点近傍への転写調節因子結合に与える影響

これまでの結果より、miR-27a は HIPK2 を介して ABCB1 遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆されていることから、miR-27a が ABCB1 転写調節においてどの領域に作用しているのかを明らかとするため、転写因子の結合変化を検出することができる NOMe-Seq assay を行った。ABCB1 遺伝子の 5' -UTR の解析の結果、miR-27a 導入により Caco-2 細胞においてのみ一部領域においてメチル化頻度の上昇を認めた。本アッセイにおけるメチル化頻度の上昇は転写調節因子の結合低下を示していることから、miR-27a によりこれらの領域を介して作用する転写調節因子の結合が低下することが示唆された。

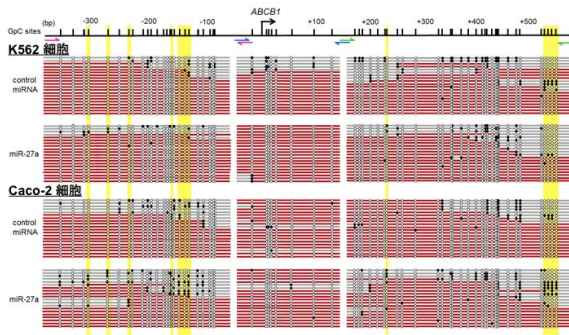


Fig. 6 The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into K562 and Caco-2 cells at 50 nM. Methylation profiles of GpC sites were determined by NOME-Seq assay. White circles: unmethylated, black circles: methylated. Red bars indicate the location of nucleosomes on individual DNA molecules as determined by GpC profile. The positions are related to the transcriptional start site.

(6) miR-27a 発現変動が P-gp 基質薬物 IRT、DOX の抗腫瘍効果に与える影響

K562 細胞は P-gp 発現が比較的低い細胞であるので、miR-27a を阻害することで P-gp 発現を上昇させ、抗腫瘍効果を評価した。その結果、miR-27a を阻害することで、イリノテカン、ドキソルビシンどちらの IC50 も有意に上昇した。Caco-2 細胞においては K562 細胞とは逆に miR-27a を導入することで P-gp 発現が上昇させ、抗腫瘍効果を評価した。その結果、miR-27a 導入により細胞生存率は上昇し、IC50 も上昇傾向を認めた。

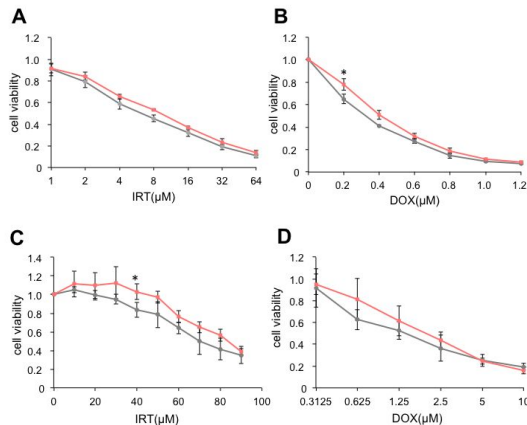


Fig. 7 **A, B** Anti-miR-27a or control anti-miR was transfected into K562 cells at 50 nM. Sensitivity of IRT (**A**) and DOX (**B**) in K562 cells were determined by WST-8 assay. **C, D** The precursor for miR-27a or control miRNA was transfected into Caco-2 cells at 50 nM. Sensitivity of IRT (**C**) and DOX (**D**) in Caco-2 cells were determined by WST-8 assay. The data are described as the ratio of cell viability of samples without drugs. (n = 3, bars, S.D.; \*, p < 0.05, compared with the control.)

以上の結果より、miR-27a は K562 細胞に

おいて P-gp 発現を低下、Caco-2 細胞においては HIPK2 を介して上昇させ、Caco-2 細胞での miR-27a による P-gp 発現上昇は、ABCB1 遺伝子転写開始点近傍への転写調節因子の結合量変動が関与していることが考えられる。また miR-27a 発現量を変動させることで、P-gp 基質薬物のイリノテカン (IRT)、ドキソルビシン (DOX) の感受性が変動したことから、miR-27 発現量を指標とするまたは、miR-27a 発現量をコントロールすることでより効果的ながん化学療法への応用が期待される。

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 1 件)

水永茉莉、廣田豪、安井俊貴、山口晃平、家入一郎

miR-27a, 374a による P-gp の発現制御機構の解明

日本薬学会第 135 年会

2015 年 03 月 26 日

神戸サンボーホール (兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://doutai.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家入 一郎 (IEIRI, Ichiro)

九州大学・薬学研究院・薬物動態学分野・教授

研究者番号: 60253473

(2) 研究分担者

廣田 豪 (HIROTA, Takeshi)

九州大学・薬学研究院・薬物動態学分野・助教

研究者番号: 80423573