

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）	基盤的研究開発育成事業共同研究補助金
研究開発テーマ名	マイクロRNAを標的とした新しい癌の診断・治療法の開発
研究代表者名	豊田 実【札幌医科大学内科学第一講座／講師】
共同研究者名	佐々木 泰史【札幌医科大学付属がん研究所分子生物学部門／講師】 明石 浩史【札幌医科大学付属情報センター／講師】

## 研究の背景と目的

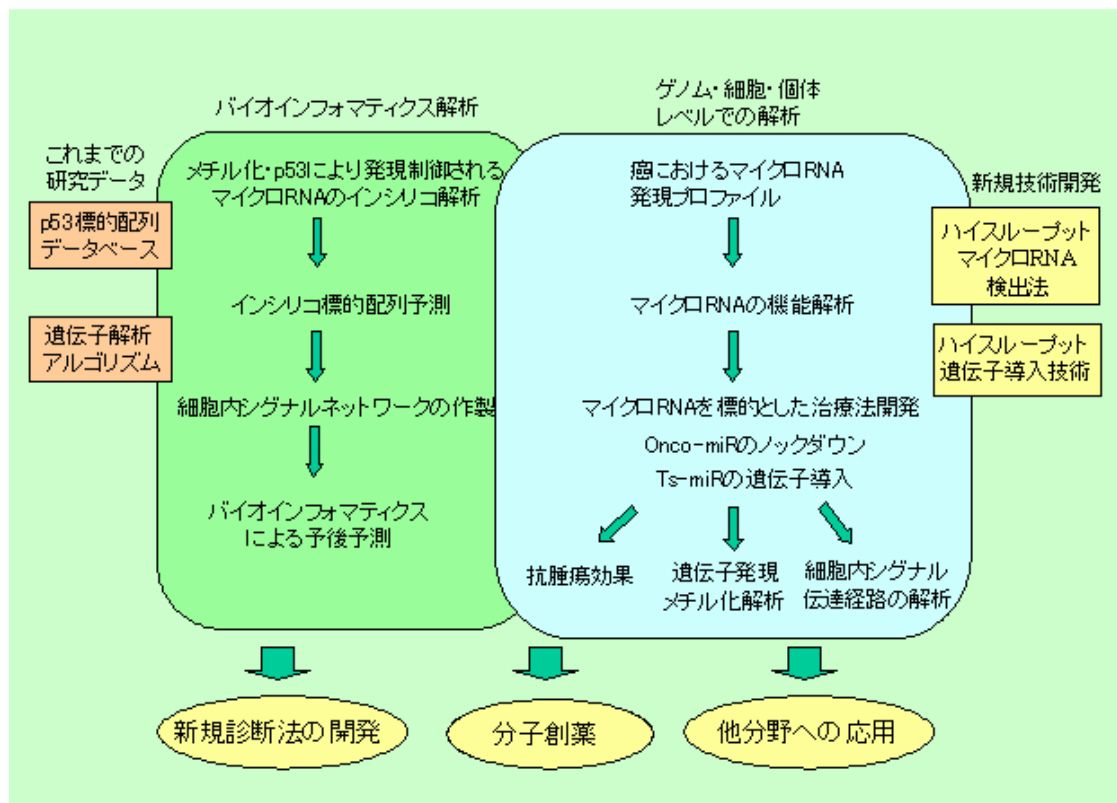
ヒトゲノムがほぼ全て解読され、個々の遺伝子の機能解析や遺伝子発現制御機構の解析がポストゲノム解析の重要な課題となってきた。がんの発生と進展には様々な遺伝子のゲノム構造異常が関与する。しかし、ゲノム構造に異常を認める領域には、タンパクをコードする遺伝子が存在しない場合が多く、標的遺伝子が不明な場合が多かった。ヒトゲノムプロジェクトによるcDNAのハイスループット解析により、ヒトにおいて、RNAに転写されるヒトゲノム情報の大部分、約98%が翻訳フレームを持たないRNA、いわゆるnon-coding RNA (ncRNA)であることが明らかとなった。これらncRNAの機能には不明な点が多いが、遺伝子量の補正やゲノムインプリンティングに関与することが示唆される。

癌の発生と進展には様々な癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化が蓄積する。最近、DNAメチル化やヒストン脱アセチル化など、遺伝子の一次構造の変異を伴わない、いわゆるエピジェネティックな異常の関与が示唆される。DNAメチル化やヒストン修飾の異常は、マイクロRNAと呼ばれる低分子RNAにより制御されることが明らかとなりつつある。しかし、癌におけるマイクロRNAの発現制御機構や発現異常、マイクロRNAの標的遺伝子に関しては、未知の点が多い。

われわれは、癌においてDNA異常メチル化により不活化される遺伝子が、特定のマイクロRNAにより制御されていることを見出した。マイクロRNAはpreマイクロRNAとして発現した後、マイクロプロセッサーにより、スプライスを受けて21塩基からなるマイクロRNAに変換される。マイクロRNAは、遺伝子制御領域に結合した後、転写抑制因子と複合体を形成し、遺伝子サイレンシングを引き起こす。これらの結果より、マイクロRNAを制御することにより、癌抑制遺伝子の機能回復や癌遺伝子の機能を抑制することが可能になると考えられる。

本研究では、癌におけるマイクロRNAを標的とした新しい治療法開発のため、(1)癌におけるマイクロRNA発現異常およびエピジェネティックな異常の解析、(2)マイクロRNAにより制御される遺伝子ネットワークの解析を行うことを目的とする。具体的には、DNAメチル化によりサイレンシングされているマイクロRNAを同定し、その標的遺伝子を明らかにする。また、細胞周期やアポトーシスなど、重要な細胞機能に関与する転写因子である、p53とそのファミリー遺伝子、p63およびp73の結合配列の近傍に存在し、p53/p63/p73により制御されるマイクロRNAを同定し、p53による遺伝子発現ネットワークにおける、マイクロRNAの役割について解析する。図1に本研究の概要を示す。

# 研究開発の概要



## 利用可能な研究シーズ

- ヒトゲノム上に存在するp53の標的配列と位置情報
- 癌において異常メチル化を認め、マイクロRNAの標的配列を有する遺伝子データベース
- マイクロRNA検出のためのハイスループット解析法

## 研究開発項目

- 各種癌におけるマイクロRNAの発現プロファイルおよび標的遺伝子の同定
- 癌で異常を認めるマイクロRNAの細胞機能および、癌抑制効果の解析
- マイクロRNAの発現制御による癌治療法の開発

図1. 研究の概要

## 研究内容・方法

### 1. 癌におけるマイクロRNAの発現異常とDNAメチル化の解析

これまで、約300種類のマイクロRNAが報告されているが、各種臓器、あるいは腫瘍における発現パターンに関しては未知の点が多い。本研究では、大腸癌、胃癌、膀胱癌、乳癌など、各種臓器由来の腫瘍におけるマイクロRNAの発現パターンについてリアルタイムPCR法をベースとした、ハイスループット解析を行う。マイクロRNAの発現解析はTaqMan PCR法を用いて検出する。各種腫瘍において、発現が増幅あるい

は、減弱しているマイクロRNAに関しては、独自に開発したバイオインフォマティクス解析により、標的遺伝子を同定し、マイクロRNAにより制御される遺伝子の発現解析、DNAメチル化解析およびヒストンアセチル化の解析を行う。得られたデータはデータベース化し、遺伝子ネットワーク解析ソフトにより、マイクロRNAが関与する遺伝子シグナル経路を可視化する。

大腸癌細胞株HCT116、DNAメチル化阻害剤5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) で処理したHCT116、DNMT1及びDNMT3bをノックアウトしたHCT116細胞 (DNMTs KO細胞) から、mirVana miRNA isolationキットを用いてsmall RNAを回収し、TaqMan MicroRNA Assayキットを用い、157種類のmicroRNA発現レベルを比較した。メチル化阻害処理により発現が誘導されたマイクロRNA近傍のCpGアイランドをデータベースにより同定し、メチル化の有無を解析した。大腸癌細胞株をNa-bisulfiteにて処理後、DNA精製用カラムにて精製し、methylation specific PCR (MSP) 法によりメチル化アレルおよび非メチル化アレルを検出した。図2にMSP法の原理を示す。

## MSP - methylation specific PCR

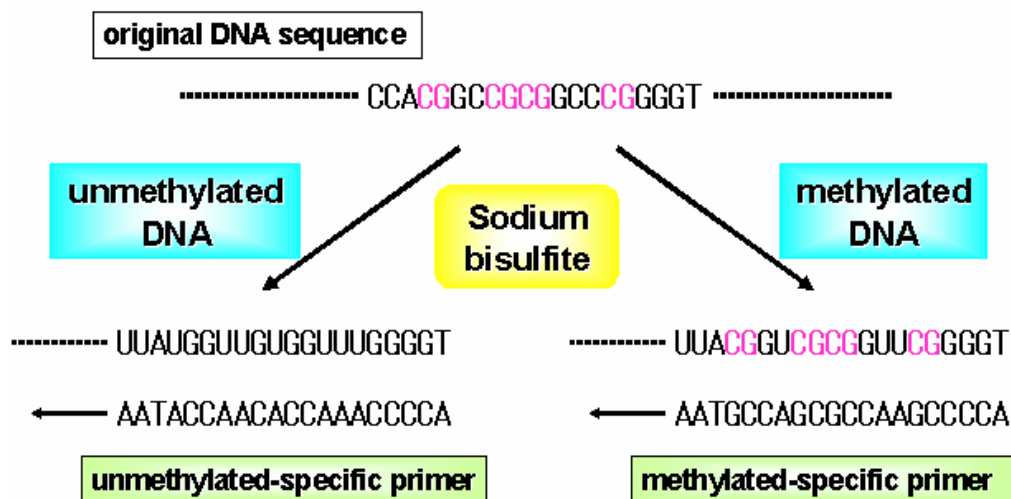


図2. MSP法の原理

### 2. マイクロRNAにより制御されるp53遺伝子ネットワークの解析

p53結合配列は(RRRCWWGYYY) (RRRCWWGYYY) (R=A or G, Y=C or T)からなる。独自に開発したアルゴリズムを用いて、合計約65,000通りものp53結合配列をヒトゲノムにマッピングし、転写因子p53の標的配列をゲノム上に、約40万箇所同定する。これらの研究で開発したアルゴリズムは、同様にあいまいな配列からなる、マイクロRNAの標的配列の解析に応用可能であり、これまでヒトゲノム上にマッピングした、p53結合配列とマイクロRNAの位置情報から、p53により発現が制御されるマイクロRNAをインシリコで同定する。また、p53が変異あるいは欠失した腫瘍細胞株に、アデノウイルスによりp53を遺伝子導入し、標的マイクロRNAの発現が誘導されるか確認する。また、p63やp73などのp53ファミリー遺伝子に関しても同様な検討を行う。p53で誘導されるマイクロRNAが同定されれば、そのマイクロRNAと相補的な配列を有する遺伝子をデータベースにて検索し、p53、p73、p63を導入した際、遺伝子発現が抑制されるか解析する。

## 研究結果

### 1. 癌におけるマイクロRNAの発現異常とエピジェネティックな異常の解析

大腸癌細胞株 HCT116 を DNA メチル化阻害剤、DAC にて処理することにより、発現が誘導されるマイクロ RNA について解析したところ、hsa-mir-368、hsa-mir-371、hsa-mir-372、hsa-mir-373 の発現が誘導されることが明らかとなった。サイレンシングされているマイクロ RNA が DNA メチル化によるものか、さらに確認する目的で、遺伝学的に DNA メチル基転移酵素、DNMT1 および DNMT3B をノックアウトした、大腸癌細胞株 HCT116 細胞を用いて、hsa-mir-371、hsa-mir-372、hsa-mir-373 の発現を検討したところ、発現誘導を認めた。データベース解析により、hsa-mir-371、hsa-mir-372、hsa-mir-373 は cluster を形成していた(図3)。

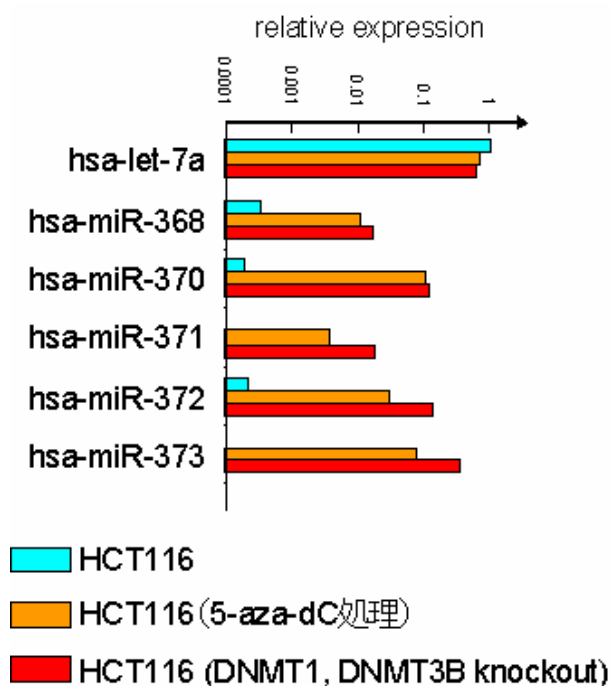


図3. 脱メチル化による、マイクロ RNA の発現誘導

マイクロ RNA 近傍の CpG rich な領域の DNA メチル化を methylation-specific PCR (MSP) 法により解析した。図4に示すように、has-mir-371、372、373 はクラスターを形成しており、この領域に4カ所のプライマーを設定してメチル化の解析を行った。その結果、HCT116、RK0、DLD1 いずれにおいてもメチル化が検出された。一方、DNMT1<sup>-/-</sup> DNMT3B<sup>-/-</sup> HCT116 細胞では脱メチル化が認められ、これらのマイクロ RNA は DNA メチル化によりサイレンシングされていると考えられた(図5)。

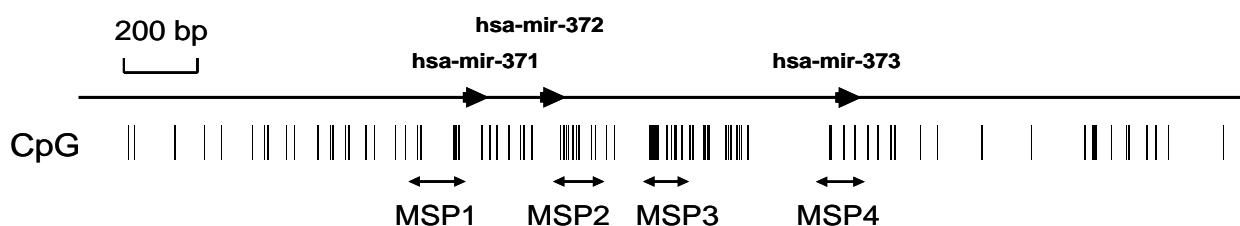


図4. has-mir-371、372、373 クラスター周辺の CpG アイランド

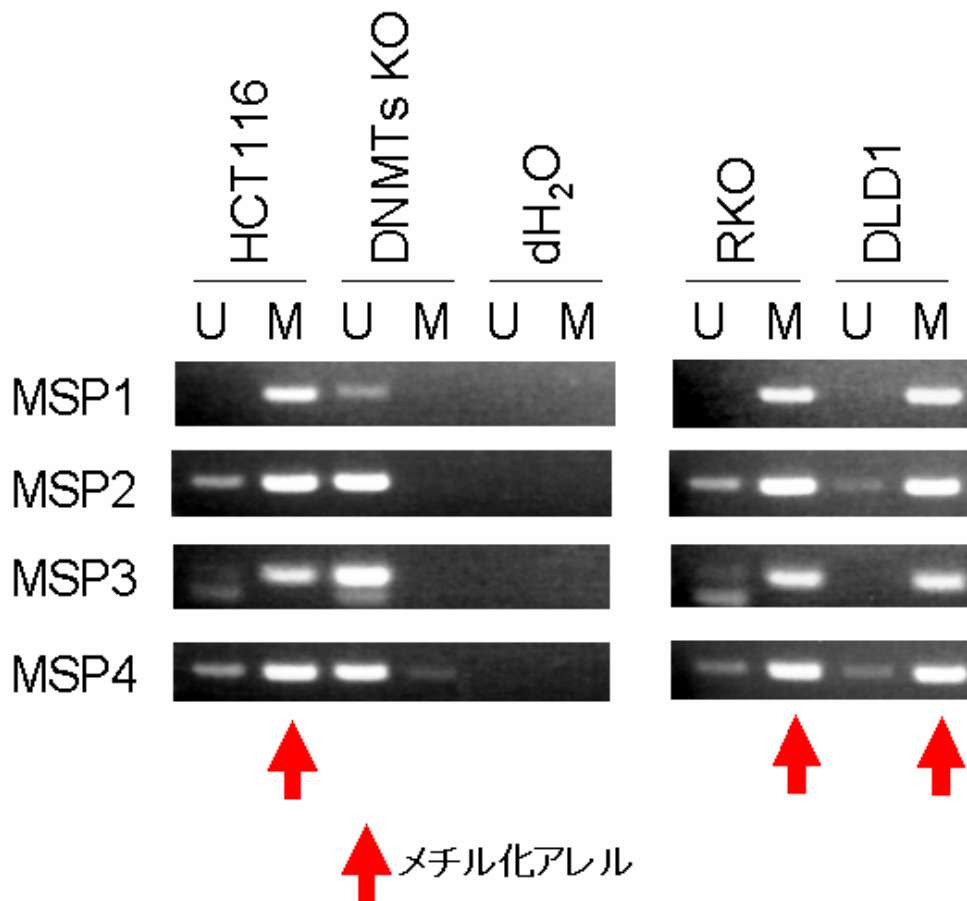


図5. マイクロ RNA 発現制御領域のメチル化解析

## 2. マイクロ RNA により制御される p53 遺伝子ネットワークの解析

インシリコによる p53 結合配列の解析により、has-miR-142-3p の近傍に、ミスマッチ 3、スパーサー 2 と p53 結合配列のコンセンサス配列と高度に類似した配列を同定した。この配列は、ヒト、マウス、ラットおよびイヌにおいて種を超えて保存されており、p53 の結合配列として生物学的に機能する可能性を有すると考えられた(図4)。

```

RRRCWWGYYY--RRRCWWGYYY
+1731 Human AAGCcAGTTTc-AGcCAAGgTC
      Mouse -----caAGcCAAGgTC
      Rat  AAGCcAGTCTcaAGcCAAGgTC
      Dog  AAGCcAGCgTc-cGcCAAGgTT

```

図4. 種を超えて保存されている has-miR-142-3p 近傍の p53 結合配列

p53 が欠失している骨肉種細胞株、Saos2 および、p53 が遺伝子変異している大腸癌細胞株に、アデノウイルスベクターにより p53 を遺伝子導入したところ、has-miR-142-3p の発現誘導を認めた。また、p53 ファミリー遺伝子、p63 の導入でも has-miR-142-3p の発現が誘導された(図5)。

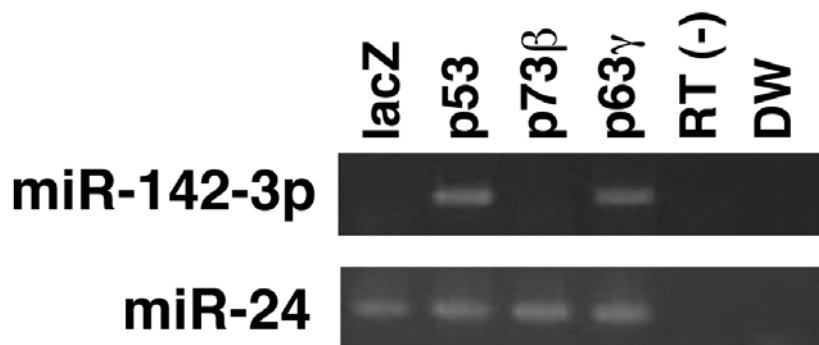


図5. p53 および p63 による has-miR-142-3p の発現誘導

has-miR-142-3p の標的遺伝子のデータベース解析により、2つの遺伝子の3' UTRに has-miR-142-3p と相補的な配列が存在することを明らかにした。これら2つの遺伝子、Target A および Target B は p53 により、has-miR-142-3p を介して発現調節を受ける遺伝子である可能性が示唆された。そこで、p53 が欠失している骨肉種細胞株、Saos2 および、p53 が遺伝子変異している大腸癌細胞株に、アデノウイルスベクターにより p53 を遺伝子導入したところ、2つの遺伝子の発現抑制が確認され、p53 が has-miR-142-3p を介して遺伝子発現を抑制している可能性が示唆された(図6)。Target A および Target B の発現抑制は、p73 や p63 など p53 ファミリー遺伝子の導入によっても認められた。以上の結果から、p53 がマイクロ RNA を介して、間接的に遺伝子発現抑制しているという、新しいモデルが示された(図7)。

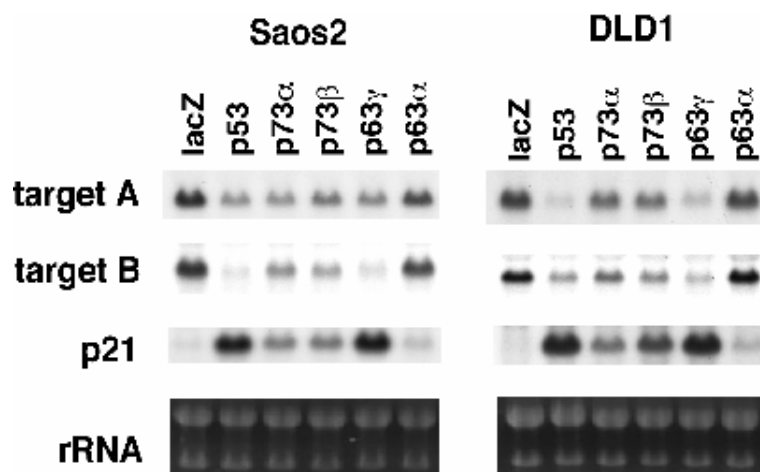


図6. p53 および p53 ファミリー遺伝子による has-mir-142-3p 標的遺伝子の発現抑制

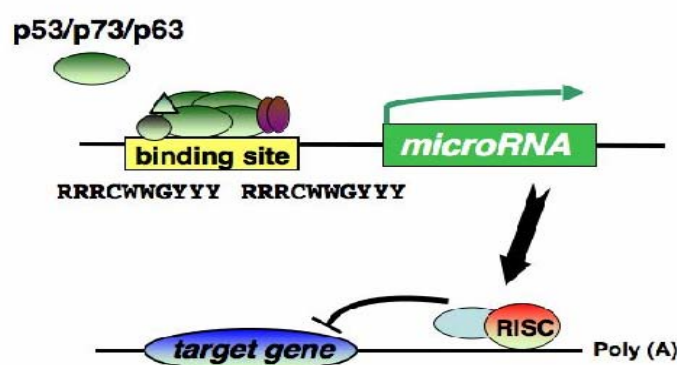


図 7. p53 によるマイクロ RNA を介した遺伝子調節ネットワーク。

p53 は遺伝子発現を誘導するだけでなく、しばしば遺伝子発現抑制に働くが、その分子機構に関しては不明な点が多かった。本研究により、p53 はマイクロ RNA の発現を直接誘導し、誘導されたマイクロ RNA がその標的遺伝子の発現を誘導するという、新しいメカニズムが存在することが示唆された。

インシリコ解析の結果、p53 の結合配列を有するマイクロ RNA は、ゲノム上に多数存在し、今後、p53 や DNA 損傷などのストレスにより発現誘導されるか検討を有する(表 1)。

miRNA name	match(x/20)	spacer	position	sequence	chrom
hsa-miR-10b	19	2	-4289	AGACATGCCCCACCACTAGCCT	chr2
hsa-miR-372	18	1	-4180	GGTCAAGTCTTAACTGGTCT	chr19
hsa-miR-371	18	1	-3965	GGTCAAGTCTTAACTGGTCT	chr19
hsa-lei-7g	18	1	-3830	AGACCAAGTTTAAAGCTTGCTC	chr3
hsa-miR-198	18	2	-3775	AAACCAAGCTCTGTAACTTGCTC	chr3
hsa-miR-326	18	2	-3768	TTGCAATGTCTGTAGGCAAGTTT	chr11
hsa-miR-105-2	18	1	-3643	AAACCAAGCTTAAAGCTTGCTC	chrX
hsa-miR-191	18	2	-3347	GAACCAAGCTCTGGCACTGGCTC	chr3
hsa-miR-22	18	1	-3290	GGGCAAGCTCTCGGCTTGCTC	chr17
hsa-miR-199b	18	1	-2423	CAACATGCCCTGAAGGCAAGCTC	chr9
hsa-miR-193	18	2	-2110	GCAACCAAGCTCTGGCACTTGCTC	chr17
hsa-miR-214	18	2	-1954	TAAACAGTTTAAAGGCAAGTTT	chr1
hsa-miR-151	18	2	-966	CAGCTGGCTTTTGAACATGCTT	chr8
hsa-miR-130b	18	2	800	GAAGCTGACCCAGGCAATGCTT	chr22
hsa-miR-135a1	18	2	862	GAAGCTGACCCAGGCAATGCTT	chr3
hsa-miR-7-3	18	0	1138	GAACCAAGTGTGAACCTTGCTC	chr19
hsa-miR-374	18	0	1159	AAACCAAGCTTAAAGCTTGCTT	chrX
hsa-miR-26a2	18	2	1610	GAAGTTGTTTCAAGCAAGCAAT	chr12
hsa-miR-198	18	0	1768	CGGCTTGTTGAAGCTTGCTT	chr3
hsa-miR-25	19	2	1848	GAAGTTGTTCAACCAACTGGTTT	chr7
hsa-miR-128b	18	0	1996	AGTCAATGTTTAACTTGCTT	chr3
hsa-miR-95	18	2	2040	ATGCAAGTTTCTGAAGCAATGTTT	chr4
hsa-miR-95	18	1	2052	GAAGCAATGTTTAAAGCAAGCTT	chr4
hsa-miR-93	19	2	2056	GAAGTTGTTCAACCAACTGGTTT	chr7
hsa-miR-106b	19	2	2281	GAAGTTGTTCAACCAACTGGTTT	chr7
hsa-miR-150	18	2	2818	GAACCAAGTGTGAAGCAATGTTT	chr19
hsa-miR-129-1	18	1	3442	GAAGCAATGCTTCAAGCAATGCTT	chr7
hsa-miR-328	19	1	3458	GAAGCAATGCTTCAAGCAATGTTT	chr16
hsa-miR-199a2	18	2	3674	TAAACAGTTTAAAGGCAAGTTT	chr1

表 1. 近傍に p53 結合配列を有するマイクロ RNA

## 今後の展望

マイクロRNAに関する研究は歴史が浅く、特に癌における発現異常や下流の標的遺伝子に関しては報告が少ない。しかし、ヒトゲノムに存在する遺伝子の約20%がマイクロRNAにより制御を受けているという報告も認められ、マイクロRNAは癌治療の新しい分子標的として重要である。本研究では、マイクロRNAの標的遺伝子が、DNAメチル化やヒストン脱アセチル化など、癌において高頻度に認められるエピジェネティック異常の標的遺伝子であるという知見によっている。

癌におけるエピジェネティックな異常は、細胞周期やアポトーシス、転移・浸潤や腫瘍抗原の提示など、癌における様々な生物学的異常の原因となっており、これまで多くの遺伝子の異常が報告されてきた。マイクロRNAとDNAメチル化の関連が明らかになれば、マイクロRNAの高感度検出法などの開発により、より早期の癌の発見や、癌の再発のモニタリングが可能になると考えられる。さらに、癌抑制遺伝子を制御するマイクロRNAが同定されれば、エピジェネティックな異常により不活化されている遺伝子を、正常細胞に損傷を与えることなく、回復することが出来、より効果的で副作用の少ない治療法の開発が可能と考えられる。最近、Saitoらは、膀胱癌細胞株において、mir-127がDNAメチル化により不活化されていることを明らかにした(Cancer Cell, 9:435,2006)。mir-127は標的遺伝子であるbcl-6を抑制することにより、癌抑制的に働く機能性RNAである可能性があり興味深い。

マイクロRNAの標的遺伝子は多岐にわたり、癌だけでなく、再生医療や、炎症性疾患、感染症、生活習慣病など癌以外の研究分野への応用が期待される。その結果、マイクロRNAを用いた創薬や、遺伝子診断法の開発、疾患の病気判定や高リスク群の予測など、薬剤開発や診断薬開発により雇用の拡大が期待できる。またマイクロRNAを用いた創薬の結果生じる、疾患の治療期間の短縮により医療費の抑制などの経済効果も期待できる。

本研究の遂行にあたり、貴重な共同研究補助金を交付頂いたノーステック財団に深謝申し上げます。