

マイクロRNAを標的とした新しい癌の診断・治療法の開発

豊田 実 [札幌医科大学内科学第一講座／講師]
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]

背景・目的

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。本研究では、癌におけるマイクロRNAを標的とした新しい診断および治療法開発のため、(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。

内容・方法

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を回収した。TaqMan MicroRNA Assayキットを用い、157種類のマイクロRNA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microRNA近傍のCpGアイランドメチル化を解析した。大腸癌細胞株を亜硫酸にて処理後、DNA精製用カラムにて精製し、methylation specific PCR法によりメチル化アレルを検出した。これまでヒトゲノム上にマッピングした、p53結合配列とmiRNAの位置情報から、p53により発現が制御されるmiRNA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miRNAの発現が誘導されるか確認する。

結果・成果

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miRNAについて解析したところ、miR-368の発現が誘導されることが明らかとなった。hsa-mir-371、hsa-mir-372、hsa-mir-373の発現がDNAメチル化により抑制されている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。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。4カ所のメチル化を解析した結果、HCT116、RKO、DLD1いずれにおいてもメチル化が検出された。一方、DNMT1、DNMT3Bノックアウト細胞では脱メチル化が認められた。

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、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いる、p53の結合配列を認め、has-miR-142-3pがp53の標的遺伝子である可能性が示唆された。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。has-miR-142-3pの標的遺伝子のデータベース解析により、2つの遺伝子が標的遺伝子である可能性が示唆された。p53が欠失している骨肉種細胞株、Saos2および、p53の遺伝子変異を有する大腸癌細胞株DLD-1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。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。

今後の展望

マイクロRNAの標的遺伝子は多岐にわたり、癌や炎症性疾患、感染症、生活習慣病など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。欧米では、マイクロRNAの機能解析と医療への応用が試み始められているが、わが国では医学分野での研究例は少ない。以上の観点から、本研究で得られた知見は実用化の意義が極めて高いと考えられる。