

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Mahmoud Khatiri Mohamed Kamel
<p>学位論文題目</p> <p>microRNA-18aによるheterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1の機能抑制を介した大腸癌細胞アポトーシス誘導に関する研究</p> <p>共著者名</p> <p>なし</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>大腸癌は癌死亡原因の上位を占める疾患で、その発生・進展メカニズムの解明にもとづいた新規治療の開発が求められている。大腸癌の発生・進展には<i>k-ras</i>、<i>p53</i>、<i>Apc</i>の遺伝子変異や<i>p16</i>の異常メチル化などが関与しているが、最近、これらDNAの異常に加え、非翻訳RNAの発現異常が明らかにされた。非翻訳RNAとは、アミノ酸配列をコードしないRNAの総称であり、全RNAのおよそ97%を占め、主にmicroRNA, snRNA, snoRNA, miRNAの4種類が含まれる。中でもmicro RNAは、ほぼ全ての真核細胞に発現している20塩基ほどの短いRNAであり、相補的な配列を持つmessenger RNA (mRNA)と結合して、蛋白翻訳を阻害する働きを持つ¹⁾。大腸癌においては、micro RNA-15、-16、-21、-22、-365、let7、17-92 clusterなどの発現異常が認められており、<i>k-ras</i>、<i>Fra-1</i>などの癌関連遺伝子のmRNA翻訳を阻害し、癌の発生・進展に関与すると考えられている。一方最近、白血病芽細胞において、microRNA-328がRNA結合蛋白heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E2に直接結合して、その機能を阻害する可能性が示された²⁾。すなわち、micro RNAがmRNAだけではなく、蛋白自身を直接標的として細胞機能を制御すると思われる。しかし、この新しいmicroRNAの作用が腫瘍の発生・進展にどのように影響するかは不明である。我々は、癌細胞において、micro RNAが、mRNAとRNA結合蛋白の両者を標的にしているとの仮説を立てた。本研究では、大腸癌細胞で過剰発現しているmicroRNA-18a、およびmicroRNA-18aとの結合部位を持つ腫瘍増殖促進分子hnRNP A1を対象として、この仮説を検証した。</p>			

方 法

1. 細胞培養とMTT assay

ヒト腸上皮細胞株Caco2bbe、HT-29、SKCO-1、SW-480、SW-620を5% CO₂下、37°Cの湿潤状態で培養した。細胞を96穴のプレートに蒔き(1.0 × 10⁴/well)、10 μLのMTT labeling reagent を加え4時間後に100 μLのsolubilization solutionを添加した。16時間暗室にて反応させ、吸光度計にて590 nmの波長のOD値を測定した。

2. プラスミドとsiRNAの作製および遺伝子導入の方法

Caco2細胞からRNAを抽出しRT-PCRにてhnRNP A1の全長 cDNAを作製した。このcDNAをpIRES puro2 vector (CLONTECH Lab., Inc)に移入した。microRNA-18aはgene bank上の配列にもとづき2本鎖RNAを作製した。hnRNP A1のsiRNAは、Santa Cruz Biotechnologyより購入した。細胞培養を開始してから24時間後に、HVJ Envelope VECTOR KIT (Ishihara Sangyo, Osaka, Japan)を用いて、プラスミドおよびRNAを遺伝子導入した。

3. Western blots

細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄後、protease阻害剤を加え可溶化した。可溶化物内の蛋白質濃度が5-30 μgになるように調整し12.5% SDS-PAGEで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜の非特異的反応をブロックした後、各種一次抗体と4°Cで16時間反応させた。3回洗浄し、特異的二次抗体で1時間反応させた後に発色させた。

4. Real-time PCR

細胞からRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを作製した。microRNA-18a およびhnRNP A1に特異的なプライマーを用い、それぞれのmRNAをreal-time PCRで検出した。

5. Binding assay

細胞を可溶化した後、抗hnRNP A1単クローン抗体(Novus Biologicals)を用いて免疫沈降を行った。沈降物からフェノールクロロホルム処理でRNAを抽出した。microRNA-18a特異的プライマーを用いreal-time PCRでmRNAの発現を検出した。

6. 免疫細胞染色

細胞をchamber slideで培養した。このslideを固定し、非特異的反応をブロックした後、一次抗体を加え1時間室温で反応させた。PBSで洗浄後二次抗体を加え

さらに1時間反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

7. テロメア長の測定

細胞をPBSで洗浄後proteaseを加え可溶化し、フェノールクロロフォルム処理でDNAを抽出した。テロメア長はTeloTTAGGG telomere length assay (Roche Applied Science)を用いてサザンブロット法にて検討した。

尚、統計学的処理にはt検定を用い $p < 0.05$ をもって有意差ありと判断した。

成 績

1. microRNA-18a過剰発現による癌細胞死の誘導

大腸癌細胞株Caco2/bbe、HT29、SKCO-1、SW480、SW620にmicroRNA-18aを導入した結果、SW620細胞で最も導入効率が高かったため、以降の実験にはSW620細胞を用いた。MTT assayで細胞増殖および障害を調べた結果、microRNA-18a過剰発現細胞では72時間以降の細胞障害が有意に増加しており、さらにアポトーシス関連分子アネキシンVの発現が有意に高くなっていた(Western blots、免疫細胞染色)。以上から、microRNA-18aは大腸癌細胞にアポトーシスを誘導すると考えられた。

2. microRNA-18aと相補的配列のmRNAから翻訳される細胞増殖およびアポトーシス関連分子の発現

細胞増殖およびアポトーシス関連分子のmRNAの中でmicroRNA-18aと結合する塩基配列をもつ分子をTargetscanで検索した(http://www.targetscan.org/vert_50/)。その結果、cyclin D2、RUNX 1、NEDD9、PTP4A3、IGF-1、エストロゲン受容体(ER) α 、CD166が候補として選択された。そこで、これらの蛋白の発現を検討したが、microRNA-18a過剰発現細胞とコントロール細胞との間で、いずれの分子においても発現に差が無かった。従って、大腸癌細胞においてmicroRNA-18aは、細胞増殖、アポトーシス関連分子のmRNA翻訳に影響しないと考えられた。

3. hnRNP A1の発現抑制によるmicroRNA-18aの細胞死誘導能の低下

hnRNP A1発現抑制細胞に対して、microRNA-18aを過剰発現させてMTT assayを行った結果、この細胞ではmicroRNA-18aの細胞死誘導作用が打ち消された。したがって、microRNA-18aの細胞死誘導作用はhnRNP A1の発現制御を介して発揮されると考えられた。

4. microRNA-18a によるhnRNP A1への結合とその機能抑制

Binding assayの結果、対照細胞およびmicroRNA-18a過剰発現細胞の両者でmicroRNA-18aとhnRNP A1との結合が認められ、この結合量は後者で有意に高かった。hnRNP A1は大腸癌細胞においてcyclin D1 の発現を誘導し、テロメアを安定化することでアポトーシスを抑制している。そこで、cyclin D1 発現とテロメア長を検討した結果、microRNA-18a過剰発現細胞ではcyclin D1発現が減少しテロメア長が短縮していた。

以上から、microRNA-18aはhnRNP A1と結合することでその作用を阻害し、大腸癌細胞にアポトーシスを誘導すると考えられた。

考 案

本研究によりmicroRNA-18aは大腸癌細胞にアポトーシスを誘導すること、この作用はhnRNP A1が持つ抗アポトーシス作用を阻害することで発揮されることを初めて明らかにした。この成果によって、癌細胞におけるmicroRNAの作用には、mRNAを標的とした機序のみではなく、癌関連蛋白分子と直接結合してその働きを阻害する機序が存在することを示した。

これまで、癌細胞におけるmicroRNAの作用として、MYC、k-ras、ER α 、Fra-1などの癌関連分子の発現抑制が報告されている。いずれも、microRNA とmRNAとの二重鎖形成による翻訳阻害がその作用機序と考えられていた。一方、白血病芽細胞において、micro RNA-328がRNA結合蛋白質hnRNP E2に直接結合して、その機能を阻害する可能性が提唱されている[2]。我々はmicroRNAによる大腸癌細胞の増殖や細胞死の制御についても同様の機序が存在すると考え、本研究でそれを証明した。

以前から、大腸癌細胞においてmicroRNA-18aが過剰に発現していることが報告されていたが、その役割については不明であった。本研究によって、microRNA-18aがhnRNP A1蛋白の機能を阻害して癌細胞にアポトーシスを誘導することが初めて明らかになった。一方、他臓器の癌におけるmicroRNA-18aの作用についてみると、肝細胞癌や乳癌ではER α のmRNAが、膀胱癌ではDicerのmRNAがmicroRNA-18aの標的になっている。すなわち、ひとつのmicroRNAが発生臓器によって異なった分子を標的にすると推測される。今後、発生臓器別に癌細胞におけるmicroRNAの標的を明らかにしていくことで、RNA結合蛋白をターゲットとした新規治療が開発されるものと期待される。




結 論

microRNA-18aは大腸癌細胞のアポトーシスを誘導すること、この作用はhnRNP A1 蛋白との直接の結合を介して発揮されることを初めて明らかにした。この成果により、microRNAは、癌関連分子のmRNAのみではなく、癌関連蛋白そのものに結合してその機能を阻害することで癌の進展を制御するという新しい抗腫瘍メカニズムを明らかにした。今後、種々のmicroRNAの直接の標的となる癌関連蛋白分子を明らかにしていくことで、新規治療法の開発を目指したい。

引 用 文 献

1. Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 2008. 132(1): p. 9-14.
2. Eiring, A.M., et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 2010. 140(5): p. 652-65.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	マハモード・ハテリ・モハメド・カメル
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> 審査委員長 奥村 利勝  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> 審査委員 谷口 隆信  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> 審査委員 高後 裕  </div>			
<p>学位論文題目</p> <p>microRNA-18a による heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 の機能抑制を介した大腸癌細胞アポトーシス誘導に関する研究</p>			
<p>RNA は生体の基本的普遍的分子であり、ゲノム翻訳の仲介者と捉えられてきたが、近年、翻訳に関わるものはむしろ少数であり、大部分の RNA は非翻訳 RNA として、種々の生体機能の調節に働いていることが明らかにされつつある。microRNA もその一つであり、翻訳 RNA に結合してその翻訳効率を制御していると考えられている。Kamel 氏は様々の癌で発現が増加している microRNA-18a について、大腸癌における発現とその意義を検討した。大腸癌由来の細胞株である SW620 細胞に microRNA-18a を高発現させるとアポトーシスによる細胞死が増加した。アポトーシス関連分子の mRNA の中で microRNA-18a と結合する塩基配列をもつ分子を Targetscan で検索した結果得られた、cyclinD2、RUNX1、NEDD9、PTP4A3、IGF-1、エストロゲン受容体 (ER) α、CD166 などの mRNA 発現に microRNA-18a 過剰発現は影響を及ぼさなかったことから、アポトーシスの誘導にはこれらの遺伝子発現が関与しないことが推定された。</p>			

RNA蛋白質複合体のhnRNP A1の発現抑制細胞を作成し、その細胞に microRNA-18aを過剰発現させてもアポトーシスの誘導はブロックされたことから、microRNA-18a過剰発現によるアポトーシス誘導はhnRNP A1を介したものであり、microRNA-18aは hnRNP A1に結合してその機能を阻害し、結果としてcyclinD1の減少とテロメアの短縮を招来することにより、細胞死を誘導していると考察している。本論文の論旨は明確であり、microRNA機能のこれまでに無い側面を示すものとして、消化器領域にとどまらず新しい知見と方向性をもたらすものと考えられる。論文提出者は関連領域に関する質問にも十分な知識を背景に不足なく返答した。以上総合して、学位論文として必要十分と判断した。