

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	小西 弘晃
<p>学位論文題目</p> <p>microRNA-26a and -584 inhibit the colorectal cancer progression through inhibition of the binding of hnRNP A1-CDK6 mRNA (microRNA-26aおよび-584はhnRNP A1とCDK6 mRNAの 結合を阻害することで大腸癌の発育を抑制する)</p> <p>共著者名</p> <p>藤谷 幹浩, 上野 伸展, 盛一 健太郎, 笹島 順平, 生田 克哉, 田邊 裕貴, 田中 宏樹, 高後 裕</p> <p>印刷公表の方法及び時期</p> <p>Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 27;467(4):847-52.</p> <p>研究目的</p> <p>大腸癌は分子標的薬や化学療法 of 進歩により予後は改善しつつあるが、依然として大腸癌の致死率は高く、新たな治療標的の開発が望まれている。</p> <p>heterogeneous ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1)はRNA結合蛋白の一種であり、大腸癌組織において過剰発現していること、その発現は大腸癌の進行度と相関することが明らかとなっている。hnRNP A1は、c-MycやCyclin D1のmRNAの安定化による発現亢進や、ピルビン酸キナーゼmRNAのスプライシング調節による発現亢進、染色体末端テロメアとの結合による安定化などの作用を発揮し、大腸癌の発生・進展を促進することが知られており、大腸癌治療の有望な標的分子になると考えられている。</p> <p>我々の研究室ではmicroRNA (miR)-18aがhnRNP A1と直接結合してこれを分解し、大腸癌細胞にアポトーシスを誘導する新しい癌制御システムの存在を明らかにした。すなわち、miRsの中には腫瘍促進蛋白であるhnRNP A1との直接結合を介して、強力な抗腫瘍効果を発揮するものが存在する可能性があると考えられる。</p> <p>本研究では、hnRNP A1と結合するmiRsの網羅的解析によって、hnRNP A1との直接結合を介して腫瘍抑制効果を発揮するmiRsを同定し、その作用メカニズムを解明することを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 細胞培養

大腸癌細胞株SW620細胞は10%(vol/vol) ウシ胎児血清, 2 mM L-グルタミン, 50 U/ml ペニシリン, 50 µg/mlストレプトマイシンを含有するRPMI 1640培地中で5% CO₂, 37度で培養した。

2. マイクロアレイ解析

細胞溶解液にIgGあるいはhnRNP A1抗体を加えて免疫沈降を行い、沈殿物中のRNAを回収、精製した。miRの発現解析は3D-Gene[®] microRNA tipを用いて行った。

3. トランスクリプトーム解析

RNAライブラリーはIon Total RNA-Seq Kit v2を用いて構築した。続いて、エマルジョンPCRを行い、テンプレート陽性エマルジョンをチップにロードし、high-throughput sequencing反応を行った。GRCh37/hg19を参照配列としてシークエンスデータをマッピングして発現量解析を用いて行った。

4. Western blotting

回収した蛋白を12.5% SDS-PAGEにて泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、各種一次抗体と4°Cで16時間反応させた。その後、特異的二次抗体と1時間反応させ、Super-Signal West Picoを用いて発色させた。アクチンの発現量を内部コントロールとして蛋白発現量を標準化した。

5. Real-time PCR

ランダムプライマーを用いてRNAを逆転写し、CDK6特異的プライマーを用いてPCRを行った。18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した。

6. Bindingアッセイ

NP-40バッファーに細胞を溶解し、抗IgGあるいは抗hnRNP A1抗体を用いて免疫沈降を行った。沈殿物中の核酸を回収してReal-time PCRを行った。

7. スルフォローダミンB (SRB) アッセイ

細胞を96 wellマイクロプレートに1×10⁴/wellで播種し、遺伝子導入を行った。細胞を4°Cの5%トリクロロ酢酸中で固定し、蒸留水で洗浄した。マイクロプレートを室温で乾燥させ、0.057%SRB液で染色し、0.1%酢酸で洗浄したのち、室温で再び乾燥させた。染色した細胞を10mM Tris液で溶解し、OD_{510nm}を測定した。

8. 遺伝子導入

miRsはmiRbaseを参照して配列を決定した。無作為配列のRNAを遺伝子導入のコントロールとして使用した。hnRNP A1 siRNAはSanta Cruz社より購入した。遺伝子導入はHVJ Envelope VECTOR KITを用いて行った。

9. 統計処理

Student's t-testを用い、p<0.05を統計学的に有意な差と判断した。

成 績

1. hnRNP A1のmiR結合パートナーの同定

SW620細胞の溶解物を用いて抗hnRNP A1抗体による免疫沈降を行い、免疫沈降沈殿物からRNA回収した。回収物のマイクロアレイ解析を行い、抗hnRNP A1抗体に特異的に結合する34種類のmiRsを同定した。Bindingアッセイにて、この34種類のmiRsのうち、miR-26a, -29a, -29b, -107, -584, -1229*の6種類のmiRsとhnRNP A1の結合を確認した (n=3)。

2. hnRNP A1との結合を介して細胞死を誘導するmiRsの同定

1. で結合が確認された6種類のmiRsの抗腫瘍効果を検証するためSRBアッセイを行ったところ、miR-26aおよび-584は細胞増殖抑制作用が確認された (n=5)。一方、miR-29aおよび-107は細胞増殖能を亢進させ、miR-29bおよび-1229*は細胞増殖能に影響を及ぼさなかった (n=5)。miR-26aまたは-584過剰発現SW620細胞では断片化Caspase-3の発現亢進を認めた (n=3)。miR-26aおよび-584がhnRNP A1を介して増殖抑制効果を発揮するか否かを検証するため、hnRNP A1発現抑制SW620細胞にmiR-26aまたは-584

を導入し、SRBアッセイで細胞増殖抑制作用を検討した。その結果、hnRNP A1の発現抑制SW620細胞では、miR-26aを導入しても増殖抑制効果は認めなかった。一方、miR-584を導入すると、わずかではあるがより強力な増殖抑制効果が確認された。(n=5)。

3. miR-26aと-584によるhnRNP A1とCDK6 mRNAの結合阻害作用の検討

SW620細胞におけるhnRNP A1の主要な標的mRNAを明らかにするため、抗hnRNP A1抗体を用いた免疫沈降の沈殿物からRNAを回収してトランスクリプトーム解析を行った。その結果、hnRNP A1と特異的に結合する26種類のmRNAが同定できた (n=3)。この中で細胞増殖に関連するCDK6の蛋白発現をWestern blot法にて検討した結果、hnRNP A1発現抑制SW620細胞において発現が低下していた (n=3)。Binding assayでは、miR-26aまたは-584過剰発現によりCDK6 mRNAとhnRNP A1の結合は減弱し、miR-26aまたは-584発現抑制により増強していた (n=3)。Western blotにより、miR-26aおよび-584過剰発現SW620細胞におけるCDK6の発現減弱を認めた (n=3)。

考 案

miR-26aおよび-584は大腸癌細胞においてhnRNP A1を標的としてhnRNP A1-CDK6 mRNAの結合を阻害し、抗腫瘍効果を発揮することを初めて明らかにした。miR-26aはhnRNP A1発現抑制細胞において相加効果を認めなかったがmiR-584はhnRNP A1発現抑制細胞よりもわずかではあるが強力な抗腫瘍効果が確認された。この現象から、miR-26aはhnRNP A1を標的として大腸癌細胞に抗腫瘍効果を発揮していると考えられたが、miR-584はhnRNP A1のみならずmRNAや他のRNA結合蛋白なども標的として抗腫瘍効果を発揮している可能性が示唆された。

また、hnRNP A1-CDK6 mRNAの結合はmiR-26aおよび-584によって阻害された。hnRNP A1はRNA中のUAGGGA/Uおよびその類似配列に結合することが知られており、CDK6 mRNA, miR-26aおよび-584にもUAGGGA/U類似配列が存在している。このことからmiR-26aおよび-584はhnRNP A1-CDK6 mRNAの結合部位に競合的に働きかけることでCDK6の発現を抑制しているものと考えられた。miRはmRNAと結合し翻訳を阻害することで蛋白発現の制御を行うことが主な作用メカニズムとされている。しかし大腸癌においては、miRが蛋白のRNA結合部位を競合的に阻害し蛋白発現を制御するメカニズムが存在することが明らかになった。これは、新規の治療標的として臨床応用が期待できる。

結 論

大腸癌細胞において、miR-26aおよび-584がhnRNP A1-CDK6 mRNAの結合を阻害することで抗腫瘍効果を発揮していることを明らかにした。hnRNP A1とmiR-26aおよび-584の結合を標的とした新規大腸癌治療法の開発が期待される。




引 用 文 献

1. Fujiya M, Konishi H (equal contribution), Mohamed Kamel MK, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene*. 2014 Oct 2;33(40):4847-56.
2. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ, Becker H, Chandler JC, Andino R, Cortes J, Hokland P, Huettnner CS, Bhatia R, Roy DC, Lieberhaber SA, Caligiuri MA, Marcucci G, Garzon R, Croce CM, Calin GA, Perrotti D. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*. 2010 Mar 5;140(5):652-65.

参 考 论 文

1. Ando K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Ikuta K, Tanabe H, Ohtake T, Kohgo Y. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Improves the Intestinal Injury by Regulating Apoptosis Through Trefoil Factor 2 in Mice with Anti-CD3-induced Enteritis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Jul;21(7):1541-52.
2. Nata T, Fujiya M, Ueno N, Moriichi K, Konishi H, Tanabe H, Ohtake T, Ikuta K, Kohgo Y, microRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating NF- κ B and improving epithelial barrier function, *J Gene Med*, 15(6-7):249-60. 2013

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	小西 弘晃
審査委員長 西川 祐司 			
審査委員 鳥本 悦宏 			
審査委員 古川 博之 			
学 位 論 文 題 目			
<p>microRNA-26a and -584 inhibit the colorectal cancer progression through inhibition of the binding of hnRNP A1-CDK6 mRNA (microRNA-26a および-584 は hnRNP A1 と CDK6 mRNA の結合を阻害することで大腸癌の発育を抑制する)</p>			
<p>本研究は大腸癌の進展を抑制する機構を microRNA (miR) の観点から検討したものである。著者らは以前、heterogenous ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) と miR-18a が直接結合し、大腸癌細胞株のアポトーシスを促進することを報告しているが、本研究では hnRNP A1 と結合する miR を hnRNP 抗体による免疫沈降とマイクロアレイを組み合わせた方法でスクリーニングした。その結果、増殖を促進する miR (miR-29a, miR-107 など) とともに、増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する miR (miR-26a, miR-584) が見出され、今回は後者に注目し、これらの作用機序についての検討を行った。</p> <p>hnRNP A1 と結合する mRNA を免疫沈降とマイクロアレイでスクリーニングした結果、結合性が認められる mRNA が 26 個抽出された。その中に癌細胞の増殖に深く関わる CDK6 mRNA が含まれており、これが hnRNP A1 の RNA 認識部位に結合する遺伝子配列を含むことが確認された。そこで、hnRNP A1 は CDK6 mRNA を安定化させる</p>			

ことで癌細胞の増殖を促進するが、miR-26a、miR-584 は、両者の結合を競合的に阻害し、増殖を抑制するとの仮説を立て、これを大腸癌細胞の培養系で検証した。大腸癌細胞でこれらの miR を過剰発現させると CDK6 mRNA 発現が低下し、逆に siRNA で miR 発現を抑制すると CDK6 mRNA 発現が増加することが確認された。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は大腸癌の新しい治療法の開発に示唆を与えるもので、新しい知見を含んでおり、学術的にも十分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。