

論文の内容の要旨

論文題目 マイクロ RNA 機能スクリーニング系による膵がん増殖抑制的マイクロ RNA の探索

指導教員 小池 和彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

泉谷 昌志

背景

近年、マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる小さな非コード RNA による遺伝子発現調節が注目されている。miRNA は 19-22 ヌクレオチド程度の 1 本鎖 RNA であり、標的となる mRNA の 3' 非翻訳領域の自身と完全にまたは部分的に相補的な配列に結合し、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるタンパク複合体に取り込まれることにより、標的遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制する。miRNA は、細胞の分化・増殖、細胞死をはじめとする正常の生命現象に関与しているのみならず、がんをはじめとする様々な疾患との関連についても報告されつつある。たとえば miR-21 や miR-17-92 クラスターは大腸がん、肺がん、悪性リンパ腫などで高発現しており、発がんやがんの維持に関与していると考えられている。また、let-7 や miR-34a は肺がんや大腸がんなどで発現低下がみられ、これらは腫瘍抑制的な作用があると考えられている。このような疾患メカニズムにおける miRNA の役割の探索のみならず、近年は miRNA を診断・治療へ応用しようという試みもある。しかしながら、ヒトで 1,000 以上、全生物種で 15,000 以上存在する miRNA の機能は

その大半が不明である。従来は、miRNA の発現異常をもとに重要と思われる miRNA を絞込む手法が一般的であるが、miRNA の発現異常は軽度なことが多く、また発現異常の程度とその重要性は必ずしも相関しないことから、発現解析と相補的な手法として miRNA 機能スクリーニング系を構築し、その有用性について検証することとした。すなわち、miRNA 発現ウイルスライブラリーとカスタムマイクロアレイを組み合わせることで、注目する形質と関連の強い miRNA を抽出しようとする試みである。

目 的

miRNA 発現ウイルスライブラリーならびにカスタムマイクロアレイを用いて miRNA 機能スクリーニング系を構成する。また、これを用いて膵がん細胞株 MIA PaCa2 の増殖を制御する miRNA を同定する。

方 法

- miRNA 前駆体発現ウイルスライブラリー: miRNA の stem loop 配列およびその周囲のゲノム配列 200 bp 程度 (合計 500~700bp 程度) を発現するレンチウイルスベクターが、454 種類混合されたプールライブラリーを用いた (Lenti-miR Virus, Library, System Biosciences)。
- カスタムマイクロアレイ: 上記 454 種類の miRNA 前駆体配列 (500~700 bp) の stem loop 以外のゲノム配列の部分を検出する、60mer のオリゴヌクレオチドプローブを 2 箇所設計した。これを、各プローブ 16 の繰り返しで Agilent の 8x15k フォーマットのマイクロアレイ上にプリントし、カスタムマイクロアレイを作成した。
- MIA PaCa-2 膵がん細胞株を用いた細胞増殖関連 miRNA のスクリーニング: 上記 miRNA 前駆体発現ウイルスライブラリーを MIA PaCa-2 膵がん細胞株へ感染させ、継代を繰り返した。感染直後 (t_1) と継代後 (t_2) の細胞株からゲノム DNA を抽出し、ウイルスベクター由来の前駆体のみ PCR で増幅した。これを、それぞれ Cy3, Cy5 で蛍光ラベル化し、カスタムマイクロアレイ上にハイブリダイゼーションし、レーザースキャナーで蛍光強度比を測定した。これにより、導入した miRNA 前駆体の $t_1 \rightarrow t_2$ におけるコピー数変化を得た (図1)。

結 果

- 454 の miRNA 前駆体配列に対して、890 のオリゴヌクレオチドプローブを設計し、これを搭載し

たカスタムマイクロアレイを作成した。

- ウイルスライブラリー導入した細胞株のゲノム DNA から、ウイルスベクター由来の miRNA 前駆体を PCR で増幅する過程の再現性を確かめるために、self-self hybridization 実験を行った。すなわち、同一のゲノム DNA から複数回の PCR を行い、これを混合し 2 つの PCR 産物プール (Pool I, Pool II) を得る。これをそれぞれ Cy3, Cy5 で蛍光ラベル化し、カスタムマイクロアレイ上へハイブリダイゼーションし、蛍光強度比を算出した。コピー数の少ないものから多いものまで蛍光強度比はほぼ 1 であり、良好な相関関係が得られたことから (相関係数 $R \sim 0.9$)、半定量的なスクリーニングには十分であると考えられた (図2)。
- この手法で実際に目的とする miRNA の同定が可能であるかを検証するために、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 にウイルスライブラリーを導入し、細胞増殖に関連する miRNA のスクリーニングを行ったところ、 \log_{10} (コピー数比) がほぼ -1 以下となる以下のクローン、すなわち細胞増殖抑制的 miRNA が同定された: miR-29b; miR-34a; miR-222; miR-224; miR-532。細胞増殖が亢進する miRNA (\log_{10} コピー数比 > 1) となるようなクローンは同定されなかった (表1)。
- スクリーニングで同定された細胞増殖抑制的な miRNA の細胞増殖抑制効果を、①これらを発現するレンチウイルスベクターならびに②合成 miRNA を用いて個別に検証したが、いずれの実験系においても細胞増殖抑制効果は確認された (図3, 図4)。
- これら細胞増殖抑制的 miRNA の作用機序を明らかにする一端として、PI 染色を行い flow cytometry による細胞周期の解析を行ったところ、アポトーシスはほとんどみられない一方で、G1 arrest (miR-34a, miR-224, miR-532) または G2 arrest (miR-222) がみられ、細胞周期の停止が主な機序であることが明らかとなった (図5)。

考 察

本稿では、数百ある miRNA の機能解析を効率的にすすめることを目的とした、miRNA 発現ウイルスライブラリーならびにカスタムマイクロアレイを用いた miRNA 機能スクリーニング法について提示した。本法では、カスタムマイクロアレイを用いる事で、ウイルスライブラリーを単独で用いた場合と比較して以下の利点を有する。

- ① 簡便な検出: positive screening は、マイクロアレイを用いずともウイルスライブラリー単独で可能

である。すなわち、注目する形質に関連する miRNA 前駆体が enrich されるような実験を行い、enrich された前駆体をクローニングならびにシーケンシングを行う事で各クローンを同定する。しかしながら、相当数のシーケンシングが必要となりかなりの労力を要する。カスタムマイクロアレイを用いた場合、一回の実験で各クローンのコピー数変化を半定量的に検出可能であり簡便な同定が可能である。

- ② 形質を負に制御する miRNA の同定 (negative selection): 形質を負に制御する miRNA については、そのクローン数が減少するため、上記の様な方法では同定不可能であり、本法のようにマイクロアレイを用いる必要がある。形質を負に制御する miRNA の例として、細胞増殖を抑制する miRNA や転移を抑制する miRNA があり、これらの同定は発がんメカニズムの解明や、これらを用いた新規治療法へとつながる可能性が期待される。

本稿ではまた、miRNA 機能スクリーニング系を用いて膵がん細胞株 MIA PaCa-2 の増殖抑制的 miRNA を 5 種類同定した (miR-29b, miR-34a, miR-222, miR-224, miR-532)。興味深いことに、このうちのひとつである miR-34a は、すでに腫瘍抑制的 miRNA として報告されているものであった。miR-34a は p53 により活性化され、CDK4 や E2F3 を主要な標的として抑制することにより腫瘍抑制効果を持つと考えられている。その他 4 種類の miRNA に関して、膵がんとの関連は明らかでないが、その細胞増殖抑制効果についてさらに検討をすすめたい。

結 論

- ・ マイクロ RNA 前駆体発現ウイルスライブラリーならびにカスタム作成マイクロアレイを組み合わせることにより、マイクロRNA機能スクリーニング系を構築することが可能であった。
- ・ この系を用いて、膵がん細胞株 MIA PaCa2 の増殖を抑制するマイクロ RNA 5 種類 (miR-29b, miR-34a, miR-222, miR-224, miR-532) を同定した。
- ・ このうち 4 種類については、細胞への導入により細胞周期の停止がみられた (miR-34a, -224, -532 における G1 arrest および miR-222 における G2 arrest)。

图 1

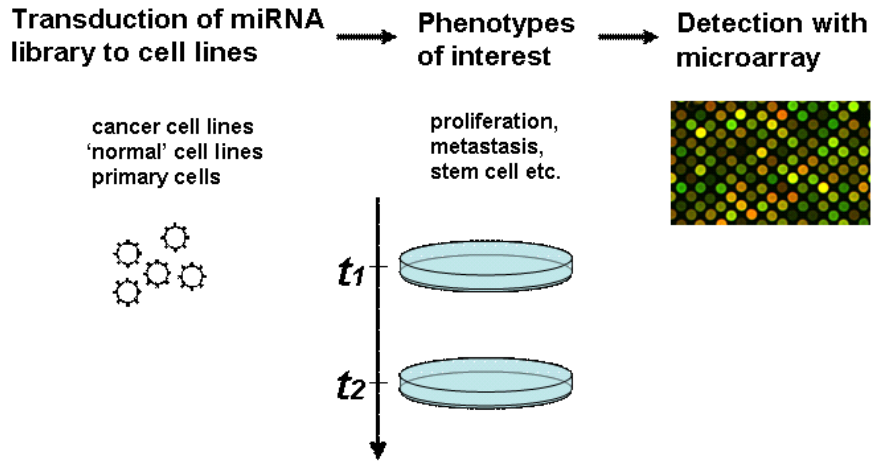


图 2

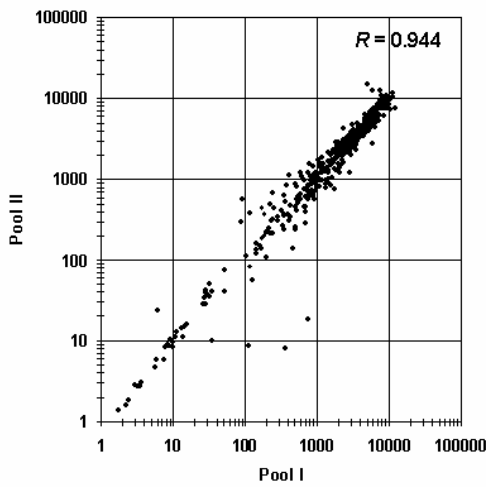


表 1

| miRNA clones | Mean \log_{10} ratio of two independent screenings (P9 vs. P0) |
|----------------|--|
| <i>miR-532</i> | ? 1.668 |
| <i>miR-224</i> | ? 1.639 |
| <i>miR-29b</i> | ? 1.211 |
| <i>miR-34a</i> | ? 1.153 |
| <i>miR-222</i> | ? 0.970 |

图 3

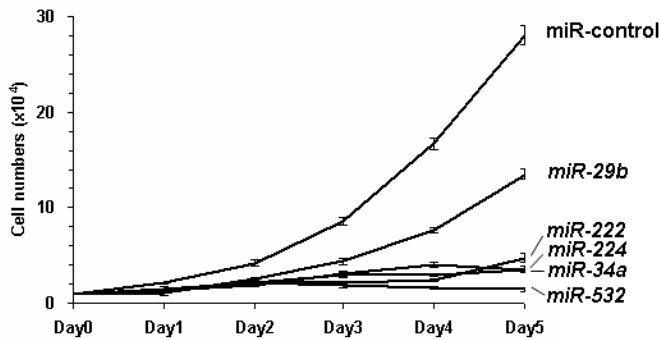


图 4

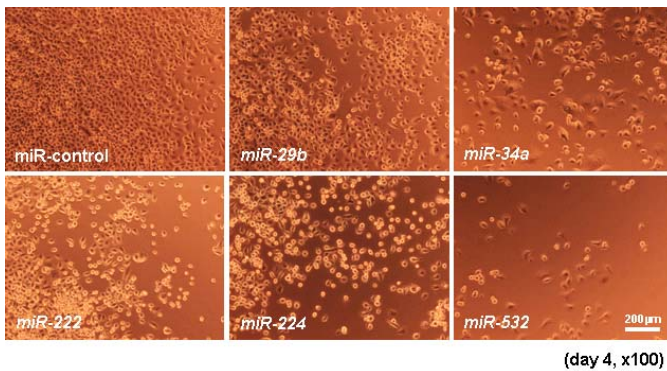


图 5

