

博士論文 (要約)

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)

旭川医科大学大学院医学研究科医学専攻博士課程  
小西弘晃

## 研究目的

大腸癌は分子標的薬や化学療法の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。

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の発現亢進は、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。

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。

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。

## 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% CO<sub>2</sub>, 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 は mirVana miRNA isolation kit を用いて回収、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  $1 \times 10^4$ /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<sub>510nm</sub> を測定した。

#### 8. 遺伝子導入

miRs は miRbase を参照に北海道システムサイエンス社に合成を依頼した。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。

### 結果

#### 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-1299\* は細胞増殖能に影響を及ぼさなかった (n=5)。Western blot 法により 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い、hnRNP A1 と特異的に結合する 26 種類の mRNA が同定した (n=3)。また、Western blot 法により hnRNP A1 発現抑制 SW620 細胞における CDK6 の発現は低下していた (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)。

## 考察

本研究によって、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 RNA 結合蛋白など hnRNP A1 以外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た。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である。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

miR-26a および-584 が大腸癌細胞において hnRNP A1 を標的とし、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. 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, Huettner CS, Bhatia R, Roy DC, Liebhaber 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.
2. 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.