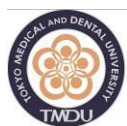


解禁日時:平成 29 年 3 月 28 日(火)午前 4 時(日本時間)

## プレス通知資料 (研究成果)



国立大学法人  
東京医科歯科大学



国立研究開発法人  
日本医療研究開発機構

報道関係各位

平成 29 年 3 月 23 日

国立大学法人 東京医科歯科大学

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

「新たな研究手法開発によりがん抑制microRNA-34aの標的遺伝子を同定」  
— microRNA-34aによる乳がん抑制機能に重要な標的遺伝子を同定 —

### 【ポイント】

- がんなどの疾患に関わる microRNA の新たな標的遺伝子の同定法を開発しました。
- 本手法により、がん抑制 microRNA-34a の標的遺伝子として、乳がん増悪化に関わる GFRA3 を同定しました。

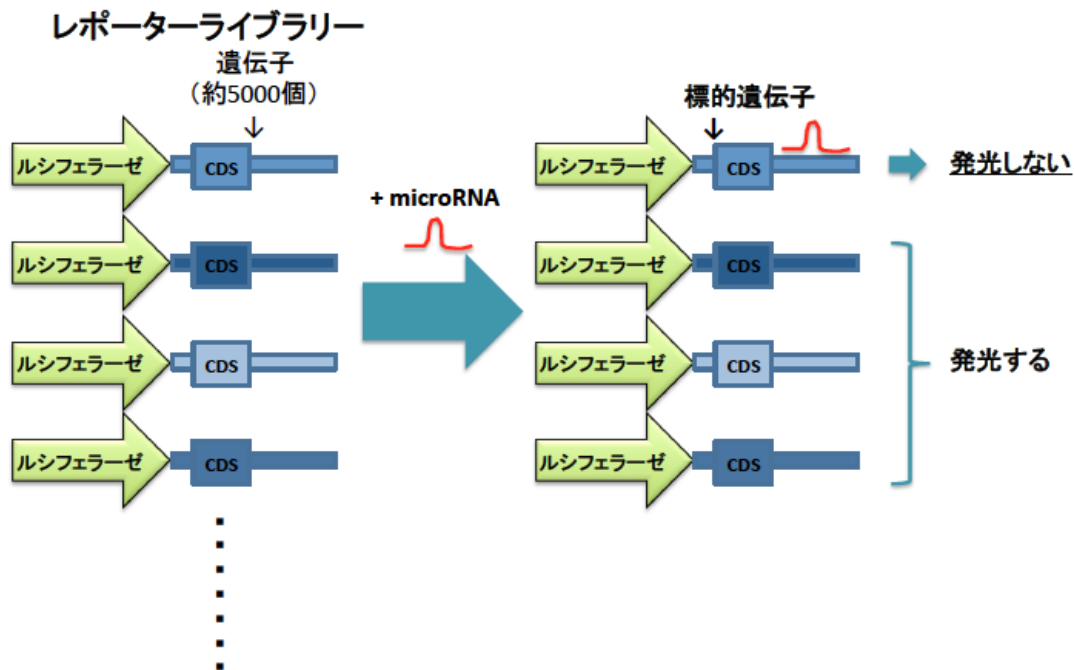
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科システム発生・再生医学分野の浅原弘嗣教授、伊藤義晃プロジェクト助教の研究グループは、国立成育医療研究センター、名古屋市立大学、インペリアル・カレッジ・ロンドン、カリフォルニア工科大学およびベックマン研究所との共同研究で、がんなど様々な疾患において重要な働きを担う microRNA の標的遺伝子を同定する新たな方法を開発し、がん抑制 microRNA-34a の新たな標的遺伝子として、乳がんの増悪化に関わる GFRA3 を同定しました。この研究は文部科学省科学研究費補助金、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業(AMED-CREST)「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域(研究開発総括:宮坂昌之)における研究開発課題「RNA 階層における炎症の時間軸制御機構の解明」(研究開発代表者:浅原弘嗣)ならびに米国国立衛生研究所(NIH,NIAMS)の支援のもとで行われました。なお、AMED-CREST の研究開発領域は、平成 27 年 4 月の日本医療研究開発機構の発足に伴い、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)より移管されたものです。この研究成果は、国際科学誌 *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (米国科学アカデミー紀要)に、2017 年 3 月 27 日(米国時間)の週に発表されます(文献)。

## 【研究の背景】

microRNAは、標的となるmRNAの主に3' UTRに結合してその遺伝子を抑制する働きを持つ、タンパク質をコードしない小さなRNAで、がんを始めとした様々な疾患において重要な役割を持つことが知られています。microRNAの機能を明らかにする上でその標的遺伝子を同定することはもっとも重要と言えますが、従来の標的遺伝子探索方法では不十分な点がいくつかありました。通常、マイクロアレイやRNA-sequenceなど、mRNAの発現変化を網羅的に解析するトランスクリプトーム解析と、miRNAの配列情報からターゲットを予測するTargetScanなどの予測ツールを用いた解析を組み合わせるスクリーニングする方法が最も一般的ですが、miRNAはmRNAの不安定化だけでなく、翻訳抑制を介して標的遺伝子を抑制するため、タンパク質レベルではなくmRNAレベルでの発現変化を観察するトランスクリプトーム解析では、翻訳抑制される標的遺伝子を同定するには十分ではありません。またTargetScanなどの予測ツールは、ターゲットとなるmRNAの3' UTRのみの情報で予測する 경우가多く、近年、コーディング領域や5' UTRを介したmiRNAの制御についても報告されていますが、そのような標的遺伝子を同定することができません。本研究では、5' UTR、コーディング領域、3' UTRを含む全長遺伝子配列をレポーターとして用いて、タンパク質レベルでの発現変化を測定できるルシフェラーゼアッセイをベースにした、短期間でかつ効率的にmicroRNAの標的遺伝子を同定する手法を開発しました。この手法を用いて、がんを抑制する機能を持っていることが分かっているものの、その詳細な機能は未知の部分が多かったmicroRNA-34a (miR-34a)の標的遺伝子の同定を試みました。

## 【研究成果の概要】

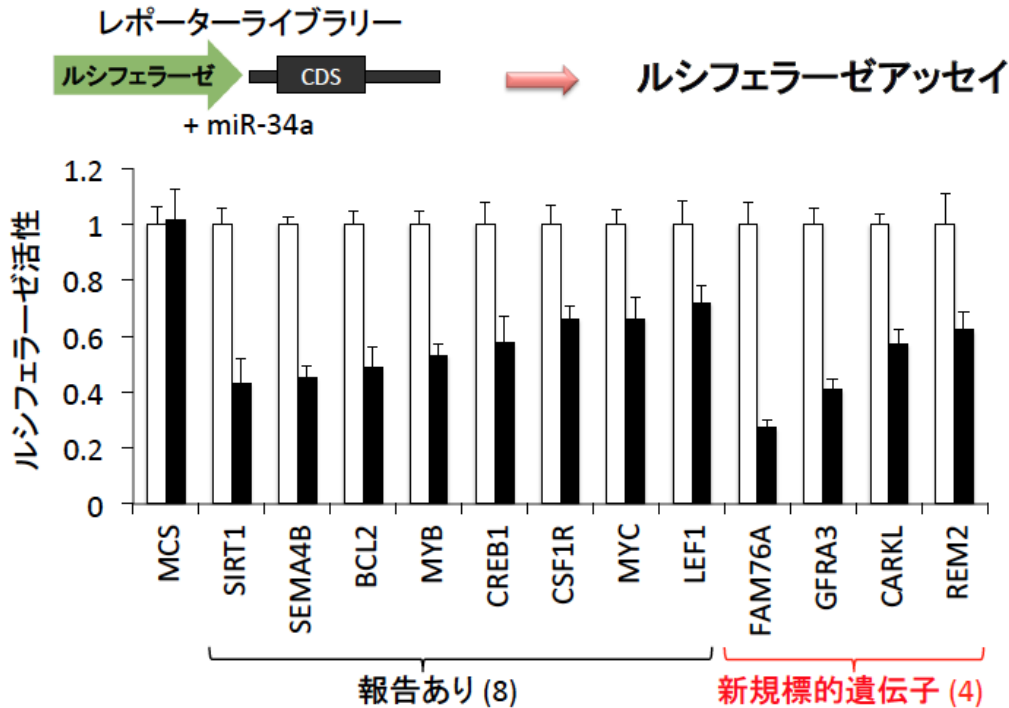
研究グループは、microRNA の標的遺伝子を同定する新しい手法(レポーターライブラリーシステム)を開発しました。本手法は、ホタルの発光を媒介する酵素遺伝子(ルシフェラーゼ)を用いたシステムで、約 5000 の全長遺伝子配列をルシフェラーゼ遺伝子の後ろ側にある 3' 非翻訳領域(3' UTR)に挿入した遺伝子ライブラリー(レポーターライブラリー)を作製し、標的遺伝子の配列を含んだルシフェラーゼ遺伝子では、microRNA によりルシフェラーゼ遺伝子が機能しなくなり、発光ができなくなるという現象を利用しました(図1)。



【図 1】 レポーターライブラリーシステム

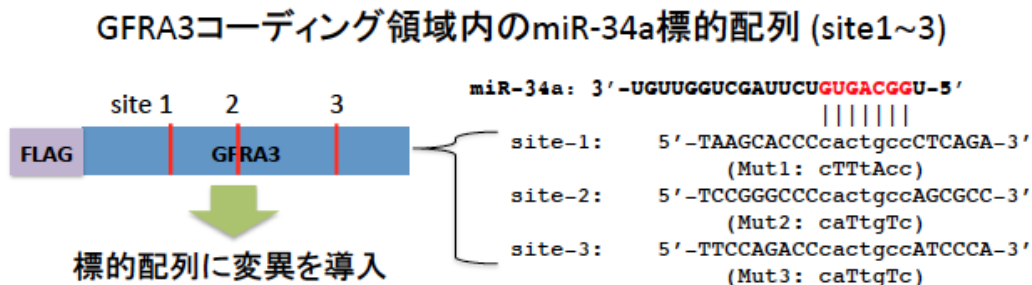
ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に約 5000 遺伝子の全長 cDNA が含まれるレポーターライブラリーと microRNA を細胞内に導入し、ルシフェラーゼ活性の低下の有無により microRNA の標的遺伝子であるかを判定するシステムを開発した。

本手法を用いてがん抑制 microRNA である miR-34a の標的遺伝子の探索を行いました。その結果、既に報告されている標的遺伝子に加え、新規な標的遺伝子として、GFRA3、FAM76A、REM2 および CARL1 を同定しました(図 2)。また、microRNA は主に標的遺伝子の 3' UTR を介して制御されていますが、GFRA3 はタンパク質をコードしているコーディング領域 (CDS) を介して直接制御されていることが明らかになりました(図 3)。

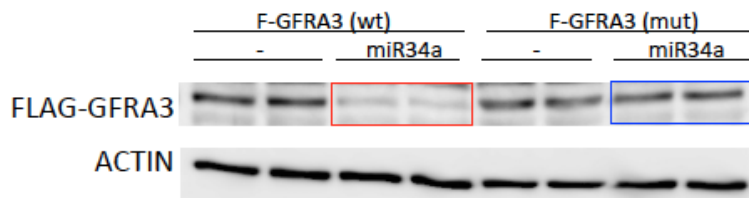


【図 2】レポーターライブラリーシステムによる miR-34a 標的遺伝子の同定

レポーターライブラリーシステムを用いてがん抑制 microRNA である miR-34a の標的遺伝子のスクリーニングを行い、新規標的遺伝子の同定に成功した。



標的配列に変異を導入



miR-34aを強制発現させた場合、導入したGFRA3の発現は抑制されるが(□)、標的配列に変異があるGFRA3を導入した場合には、miR-34aを強制発現させても抑制されない(□)

【図 3】GFRA3 は 3' UTR を介して制御される

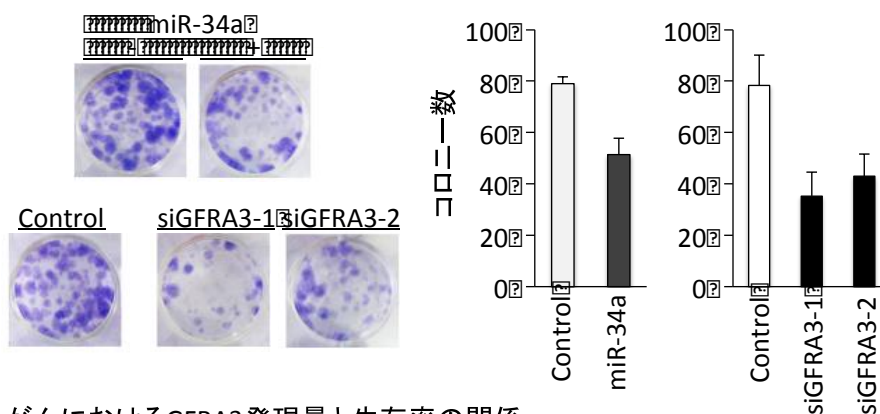
新たに miR-34a の標的遺伝子として同定した GFRA3 は、コーディング領域に標的配列があり、通常の GFRA3 (wt)では miR-34a によりその発現は抑制されるが (□)、その標的配列に変異を導入した GFRA3 では (mut)、

miR-34a による抑制が見られない (□)。

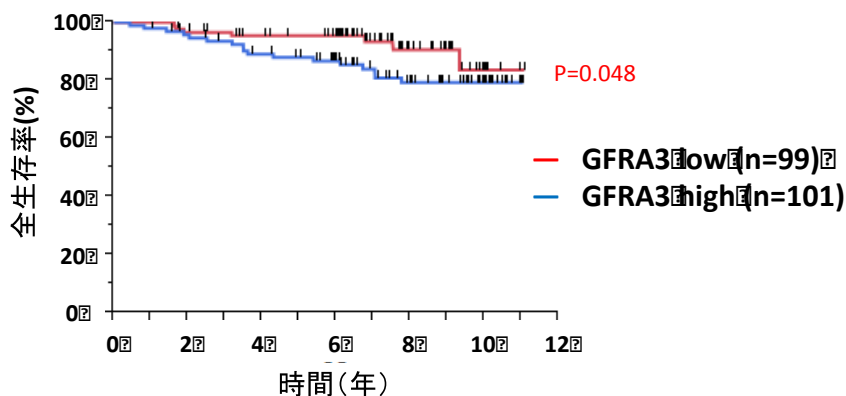
この GFRA3 を MDA-MB-231 という乳がん細胞においてノックダウンすると、MDA-MB-231 細胞の増殖が抑制されました。また GFRA3 の発現が高い乳がんを持つ患者は、GFRA3 の発現が低い乳がんを持つ患者に比べて生存率が低いことが分かりました(図 4)。これらの結果から、GFRA3 は乳がん増悪化に関わる重要な遺伝子であることが明らかになりました。

### A GFRA3を抑制した乳がん細胞では増殖が抑制される

コロニーフォーメーションアッセイ



### B 乳がんにおけるGFRA3発現量と生存率の関係



### 【図 4】 GFRA3 は乳がんの増悪化因子である

(A) GFRA3 の発現を抑制した乳がん細胞 (MDA-MB-231)では、miR-34a を強制的に導入した細胞と同様に乳がん細胞の増殖が抑制され、がん細胞塊(コロニー)が減少する。(B) GFRA3 の発現量が高い乳がん患者は、発現量が低い乳がん患者と比べて有意に生存率が減少する。

### 【研究成果の意義】

本研究において作製したレポーターライブラリーシステムにより、がん抑制 microRNA である miR-34a の標的遺伝子を探索した結果、新しい標的遺伝子の同定に成功しました。同定した新たな miR-34a の標的遺伝子の中で、GFRA3 は乳がんの増悪化に関わる遺伝子であり、miR-34a の乳がん抑制機能において重要な標的遺

伝子であることが分かりました。miRNA はがんだけでなく、様々な疾患に関与していることが明らかになりつつありますが、本手法を用いた miRNA の標的遺伝子の同定により、がんやその他の疾患の病態解明に寄与することが期待されます。

## 文献

Ito, Y., et al., Identification of targets of tumor suppressor microRNA-34a using a reporter library system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. xx(x): p - .

図2-4は文献より引用、一部改変。

## 【問い合わせ先】

### <研究に関すること>

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 浅原 弘嗣(アサハラ ヒロシ)

伊藤 義晃(イトウ ヨシアキ)

TEL:03-5803- 5015 FAX:03-5803- 5810

E-mail: [asahara.syst@tmd.ac.jp](mailto:asahara.syst@tmd.ac.jp)

ホームページ: <http://www.tmdusystemsbiomedicine.com/>

### <報道に関すること>

東京医科歯科大学 広報部広報課

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: [kouhou.adm@tmd.ac.jp](mailto:kouhou.adm@tmd.ac.jp)

### <事業に関すること>

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

戦略推進部 研究企画課

TEL:03-6870-2224 FAX:03-6870-2243

E-mail: [kenkyuk-ask@amed.go.jp](mailto:kenkyuk-ask@amed.go.jp)