



## miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling

Momose, Kenji

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6375号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006375>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling

マイクロ RNA-214 と低酸素環境は Necl-2/CADM1 の発現を抑制し、ErbB2/ErbB3 シグナルを増強する。

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

(指導教員：東 健教授)

百瀬 健次

## はじめに

ネクチン様分子-2 (Necl-2) はネクチン様分子ファミリーに属する免疫グロブリン様細胞接着タンパク質である。Necl-2 は、さまざまな組織に広く発現がみられ、細胞極性、増殖、分化、生存などに関与し、各種のがんにおいてがん抑制因子として機能する。また、受容体チロシンキナーゼである ErbB3 はさまざまながん組織で発現が上昇している。私共は Necl-2 ががん抑制遺伝子として機能する機構として、Necl-2 が ErbB3 と結合してヘレグリン刺激による ErbB3 のリン酸化およびその下流の Rac と Akt の活性化を抑制して細胞運動と細胞死を抑制すること、および Necl-2 による ErbB3 の活性化の抑制機構には、Necl-2 の細胞質領域に結合する脱リン酸化酵素PTPN13によるErbB3の脱リン酸化が関わっていることを示してきた。

マイクロ RNA は 20~25 塩基程度の低分子 RNA の一種で、メッセンジャー RNA の 3'非翻訳領域の標的配列と相補的に結合し、その翻訳を抑制する。マイクロ RNA は分化、増殖、アポトーシス、血管新生などさまざまな機能を制御し、さらに、がん遺伝子およびがん抑制遺伝子としてがんの発生や、増殖、転移にも関与する。例えば、マイクロ RNA の一種であるマイクロ RNA-214 (miR-214) は、肺臓がんや胃がん、乳がん、卵巣がん、悪性黒色腫などのがん種で発現が上昇している。

肺がんなどのがんにおいて Necl-2 の発現を抑制する因子として、Necl-2 遺伝子のプロモーター領域の高度メチル化や 11q23.2 におけるヘテロ接合性の消失 (LOH) が報告されてきた。しかしこれらの変化による Necl-2 の抑制は、がんの 30~60% に見られるのみであることから、他にも Necl-2 抑制機構があると推測される。本研究ではこれらの他の Necl-2 を抑制する因子について検討した。

## 方法

miR-214 による Necl-2 の発現抑制能を評価するため、miR-214 の標的配列を含む Necl-2 の 3'非翻訳領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドを作成し、miR-214 の前駆体およびコントロールプラスミドと共にヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイ法を行った。さらに miR-214 発現細胞における Necl-2 のタンパク質の発現量をウエスタンプロット法にて検討した。miR-214 によるヘレグリン誘導性の ErbB2/ErbB3 シグナルへの影響を評価するため、ヒト大腸がん Caco-2 細胞を 24 時間血清飢餓状態にした後にヘレグリン刺激を行い、10 分後までの ErbB3 のチロシン 1289 残基のリン酸化をウエスタンプロット法にて検討した。また、低酸素環境における Necl-2 タンパク質の発現量の変化を、48 時間 1%酸素濃度下で培養した Caco-2 細胞を用いて、ウエスタンプロット法にて検討した。さらに、同様の低酸素環境下で培養した Caco-2 細胞を用いて Necl-2 のメッセンジャー RNA および miR-214 の発現量の変化をリアルタイム PCR 法にて検討した。HIF-1 $\alpha$ による Necl-2 の発現への影響を評価するため、HIF-1 $\alpha$ を siRNA でノックダウンした Caco-2 細胞を 48 時間 1%酸素濃度下で培養しウエスタンプロット法にて解

析した。タンパク質の発現量に関しては、ウエスタンプロット法により検出したバンドをコンピューターソフトの ImageJ にて数値化して検討した。

## 結果

### 1. miR-214 は Necl-2 を直接標的とし、その発現を抑制する。

miR-214 による Necl-2 の発現抑制能を、ルシフェラーゼアッセイ法にて評価した。miR-214 の共発現により、miR-214 の標的配列を含む Necl-2 の 3'非翻訳領域を組み込んだルシフェラーゼベクターの活性は 40% 抑制された。しかし、miR-214 の標的配列に 2 塩基の変異を入れたベクターではルシフェラーゼベクターの活性は低下しなかった。

次に、miR-214 が Necl-2 タンパク質の発現に及ぼす影響をウエスタンプロット法にて検討した。10 nM の miR-214 前駆体を導入した Caco-2 細胞ではコントロールマイクロ RNA を導入したものと比較し、48 時間後に Necl-2 タンパク質の発現量は約 40% 低下した。以上のことから、miR-214 は Necl-2 を直接標的としそのタンパク質の発現量を抑制することが示された。

### 2. miR-214 によるヘレグリン刺激下での ErbB2/ErbB3 シグナルの増強

次に、miR-214 がヘレグリン誘導性の ErbB2/ErbB3 シグナルへ及ぼす影響を、Caco-2 細胞を用いて評価した。miR-214 前駆体を導入した Caco-2 細胞とコントロールマイクロ RNA を導入した Caco-2 細胞共に、ヘレグリン刺激後に ErbB3 のチロシン 1289 残基のリン酸化を認めた。しかし、miR-214 前駆体を導入した Caco-2 細胞では、コントロール細胞と比し Necl-2 タンパク質の発現が低下するとともに、より著明な ErbB3 のチロシン 1289 残基のリン酸化を認めた。

### 3. 低酸素環境下における Necl-2 の発現抑制

低酸素環境やそれに伴う転写因子 HIF-1 $\alpha$  の発現誘導は、がん細胞の浸潤や転移の促進などを通じてがんの進展に関わると考えられている。Caco-2 細胞を 48 時間低酸素環境下で培養したところ、Necl-2 タンパク質の発現は約 25% 低下した。低酸素環境では、さまざまなマイクロ RNA の発現に変化がみられることが報告されているが、低酸素環境下で miR-214 の発現量には有意な変化は認めなかった。また低酸素環境下で Necl-2 のメッセンジャー RNA の発現量にも変化は認められなかった。したがって、低酸素環境下での Necl-2 タンパク質の発現量の低下は、miR-214 の発現誘導や Necl-2 のメッセンジャー RNA への転写抑制によるものではないと考えられた。次に低酸素環境下で発現量の増加する HIF-1 $\alpha$  は転写因子として働くのみならずタンパク質分解にも関与することから、HIF-1 $\alpha$  が Necl-2 タンパク質の発現量の低下に関与しているか検討した。低酸素環境下で 20 nM の HIF-1 $\alpha$  の siRNA を導入した Caco-2 細胞においても Necl-2 の発現量の変化は認められなかった。このことから低酸素環境下での Necl-2 のタンパク質の発現量の低下には、HIF-1 $\alpha$  は関与し

ていないことが分かった。

## まとめ

がん抑制遺伝子 Necl-2 の発現の抑制には、従来からプロモーター領域の高度メチル化や LOH が関与していることが示されてきたが、今回の検討で、新たに miR-214 および低酸素環境が Necl-2 の発現を抑制する因子であることが判明した。miR-214 は Necl-2 のメッセンジャー RNA を直接標的とし、そのタンパク質発現量を低下させた。一方、低酸素環境も Necl-2 タンパク質の発現を抑制する因子であった。今回私共は、低酸素環境下における Necl-2 の発現低下の分子機構について、マイクロ RNA の発現誘導や HIF-1 $\alpha$  の関与の面から検討したが、これらの因子の関与は認められなかった。従って低酸素環境下における Necl-2 タンパク質の発現低下には、タンパク質の分解や低酸素で誘導される他のマイクロ RNA による Necl-2 タンパク質の発現抑制など他の因子が関与している可能性が示唆された。Necl-2 は正常の臓器発生から腫瘍発生まで幅広い作用をもつ分子であることから、今回解明したようにさまざまな発現制御機構があるものと考えられた。特に miR-214 と低酸素環境はともにがんの進展と関連する因子であることから、従来から知られているプロモーター領域の高度メチル化や LOH と協調または独立して、さまざまながら Necl-2 の発現抑制を介したがんの進展機構に関与していると考えられた。

(3277 字)

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2489 号	氏名	百瀬 健次
論文題目 Title of Dissertation	miR-214 and hypoxia down-regulate Necl-2/CADM1 and enhance ErbB2/ErbB3 signaling マイクロ RNA-214 と低酸素環境は Necl-2/CADM1 の発現を抑制し、ErbB2/ErbB3 シグナルを増強する。		
審査委員 Examiner	主査 田嶋尚 Chief Examiner 副査 久坂敏郎 Vice-examiner 副査 斎地吾介 Vice-examiner		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

【背景・目的】

Necl-2 はネクチン様分子ファミリーに属する細胞接着分子であり、ErbB3 と相互作用することによって細胞運動や生存を促進する ErbB2/ErbB3 シグナルに対して抑制的に働くがん抑制因子として機能することが知られる。

これまでに Necl-2 の発現量の減少は様々な種類のがんにおいて報告されており、その原因としてはプロモーター領域の高度メチル化や LOH が報告されている。一方で、様々ながんにおいて発現上昇が認められる miRNA である miR-214 に認識される配列が Necl-2 mRNA の 3'UTR に存在することから、本研究では miR-214 による Necl-2 の発現抑制への影響を検証した。さらに、がん細胞の浸潤、転移、アポトーシスと関連があるとされる低酸素環境も Necl-2 の発現抑制を誘導する可能性も検証した。

【方法】

1. miR-214 による Necl-2 の抑制の解析

miR-214 による Necl-2 の抑制能を評価するため、miR-214 の標的配列を含む Necl-2 の 3'非翻訳領域を組み込んだルシフェラーゼ発現プラスミドを作製し、miR-214 の前駆体およびコントロールプラスミドと共に HEK293 細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイ法を行った。また、miR-214 発現細胞における Necl-2 のタンパク質の発現量をウエスタンプロット法にて検討した。

2. Necl-2 の抑制状態でのヘレグリン刺激下での ErbB2/ErbB3 シグナルの解析

miR-214 によるヘレグリン誘導性の ErbB2/ErbB3 シグナルへの影響を評価するため、ヒト大腸がん Caco-2 細胞を 24 時間血清飢餓状態にした後にヘレグリン刺激を行い、ErbB3 のチロシン 1289 残基のリン酸化をウエスタンプロット法にて検討した。

3. 低酸素環境下における Necl-2 の発現、HIF-1 $\alpha$ との関連の解析

低酸素環境における Necl-2 タンパク質の発現量の変化を、48 時間 1%酸素濃度下で培養した Caco-2 細胞を用いて、ウエスタンプロット法にて検討した。また、低酸素環境下で培養した Caco-2 細胞を用いて Necl-2 の mRNA および miR-214 の発現量の変化をリアルタイム PCR 法にて検討した。さらに、HIF-1 $\alpha$  による Necl-2 の発現への影響を評価するため、HIF-1 $\alpha$  を siRNA でノックダウンした Caco-2 細胞を低酸素濃度下で培養しウエスタンプロット法にて解析した。

【結果】

1. miR-214 は Necl-2 を直接標的とし、その発現を抑制する

miR-214 の発現により、miR-214 の標的配列を含む Necl-2 の 3'非翻訳領域を組み込んだルシフェラーゼベクターの活性は抑制された。一方、標的配列に 2 塩基の変異を入

れたベクターではその活性は低下しなかった。また、miR-214 前駆体を導入した細胞ではコントロール miRNA を導入したものと比較し、Necl-2 タンパク質の発現量は低下した。

### 2. miR-214 によるヘレグリン刺激下での ErbB2/ErbB3 シグナルの増強

miR-214 前駆体を導入した細胞では、コントロール細胞と比し、ヘレグリン刺激下でより著明な ErbB3 のリン酸化を認めた。

### 3. 低酸素環境下における Necl-2 の発現抑制

低酸素環境下で培養した細胞の Necl-2 タンパク質の発現は低下した。しかし低酸素環境下で miR-214 の発現量には有意な変化は認めなかった。また Necl-2 の mRNA の発現量にも有意差は認められなかった。低酸素環境下で HIF1 $\alpha$  の siRNA を導入したが Necl-2 タンパク質の発現量は低下した状態であり変化を認めなかった。

#### 【考察】

本研究では miR-214 は Necl-2 を直接標的として抑制することを示した。また、miR-214 によって Necl-2 の発現が抑制された細胞ではヘレグリン刺激による ErbB2/ErbB3 シグナルが増強され、細胞運動や細胞生存が促進されることも示唆された。

一方、低酸素環境も Necl-2 タンパク質の発現を抑制する因子であったが、この発現抑制に miR-214 の発現誘導や mRNA の転写抑制は関与しておらず、さらに HIF1 $\alpha$  の関与も認められなかった。従って低酸素環境下における Necl-2 タンパク質の発現低下には、Necl-2 タンパク質の分解や低酸素で誘導される他の miRNA による翻訳抑制など他の因子が関与している可能性が示唆された。

#### 【結論】

本研究では、がんの進展と関与が認められる miR-214 の発現や低酸素環境ががん抑制因子として機能する Necl-2 の発現抑制を誘導することを示し、がんの進展機序の一端を明らかにした点で価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。