

## DICER1 症候群モデル細胞の解析

老 川 桂 生      大 野 慎一郎      黒 田 雅 彦

東京医科大学分子病理学分野

【要旨】 microRNA (miRNA) の生成に必須な DICER1 は、C 末端に二つの RNA 切断ドメイン (RNase IIIa, RNase IIIb) を有し、それぞれ miRNA-3p, miRNA-5p のプロセッシングを行う。近年、胸膜肺芽腫を含む多様な腫瘍で DICER1 遺伝子に変異が見つかり、このような DICER1 遺伝子変異を伴う腫瘍素因症候群は DICER1 症候群と呼ばれている。本症候群の患者組織では、DICER1 遺伝子の 2 つのアリルに各々特徴的な変異が認められる。1 つ目は、エクソン領域の非特異的なナンセンス変異であり、2 つ目は RNase IIIb ドメインのミスセンス変異である。このことから、miRNA のプロセッシング異常が DICER1 症候群発症の原因と考えられているが、その発症機構は不明である。そこで本研究は、DICER1 症候群患者に認められる DICER1 遺伝子変異をヒト細胞株で再現し、解析する事により DICER1 症候群の発症機構を解明することを目的とした。CRISPR/Cas9 システムを用いて DICER1 遺伝子を欠損させ、レンチウイルスにより DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体を発現させた細胞株を作製した。この DICER1 症候群モデル細胞株は、DICER1 症候群患者と同様に miRNA-5p のプロセッシング異常を示し、がん関連遺伝子の発現が増加していた。このことから、DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体は miRNA-5p の欠失およびがん遺伝子の発現増加により、DICER1 症候群における腫瘍素因の原因となっている可能性が示唆された。

## はじめに

microRNA (miRNA) は、20 塩基前後の non-coding RNA であり、相補的な配列を持つメッセンジャー RNA (mRNA) に結合しタンパク質発現の抑制に働く。miRNA による標的 mRNA の認識は、Seed 配列と呼ばれる 7 塩基ほどの配列で行われるため特異性が低く、ひとつの miRNA は複数の mRNA を標的とする。miRNA の生成経路は、はじめに核内で DNA から RNA polymerase II により primary miRNA (pri-miRNA) が転写されることから始まる。続いて、pri-miRNA は RNase III 酵素である DROSHA により切断され、precursor miRNA (pre-miRNA) となる。pre-miRNA は XPO5 を介して細胞質へ輸送され、DICER1 によってループ構造が切断される。20 塩基前後に切り出された二本鎖 RNA

は、AGO ファミリー (AGO1-4) から構成される RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体に取り込まれる。その際、RISC 内で二本鎖構造は解離し、成熟 miRNA となり相補的な配列を持つ標的 mRNA の 3' 末端非翻訳領域に結合する。RISC は、結合した mRNA の分解および翻訳阻害することで遺伝子発現を抑制する<sup>1-5)</sup>。miRNA の生成に必須である DICER1 は、ほとんどすべての miRNA のプロセッシングを担う。DICER1 は、C 末端に RNA 切断ドメインである RNase IIIa, RNase IIIb ドメインをもち、それぞれ pre-miRNA から miRNA-3p と miRNA-5p の生成を行う<sup>6,7)</sup> (Fig. 1)。DICER1 は miRNA のプロセッシングを通して、数多くの疾患と関係していることが報告されており、特に多くのがんで miRNA の発現が大きく変化することから、がんにおける DICER1 および miRNA の機

令和 2 年 11 月 30 日受付、令和 2 年 12 月 21 日受理

キーワード: DICER1 症候群、microRNA、プロテオーム解析

(別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1)

TEL: 03-3351-6141 (内線 235) FAX: 03-3352-6335

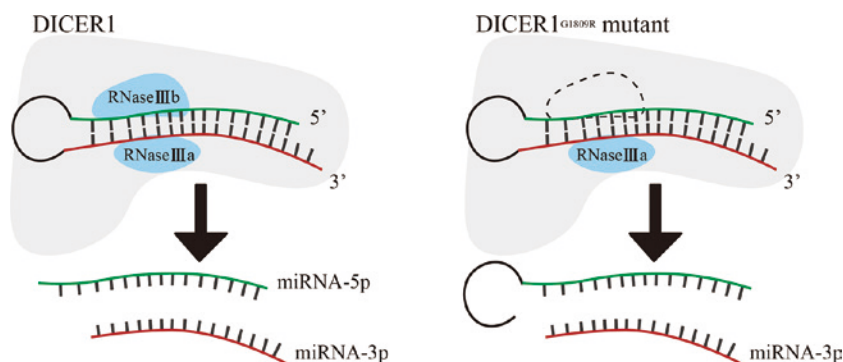


Fig. 1 Schematic Model for DICER1 cleaves a pre-miRNA hairpin.

能解析が進んでいる<sup>8-10)</sup>。

近年、胸膜肺芽腫 (Pleuropulmonary blastoma; 以下 PPB と略す)、嚢胞性腎腫およびウィルムス腫瘍を含む多様な腫瘍で DICER1 遺伝子変異が報告され DICER1 症候群と呼ばれている<sup>11-13)</sup>。DICER1 症候群は 14q32.13 に存在する DICER1 遺伝子の変異を原因とし、小児期から成人期において多様な臓器で良性、悪性腫瘍の発生リスクが増加する腫瘍素因症候群である<sup>8)14)</sup>。DICER1 症候群の患者は、片方のアレルにナンセンス変異を有し、もう一方のアレルに RNase IIIb ドメインの金属イオン ( $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ ) 結合部位 (E1705、D1709、E1810、G1813) 付近にミスセンス変異を有する<sup>8)12)13)</sup>。また、DICER1 症候群の患者検体の解析から、健常人と比較して RNase IIIb ドメインへのミスセンス変異を有する検体は、miRNA-5p の発現が低下することが明らかになっている<sup>6)15)</sup>。これらのことから、正常な DICER1 を欠失し、DICER1 変異体のみ発現することによる miRNA-5p のプロセッシング異常が原因で発症すると考えられている。

これまでに DICER1 変異体の機能は、Dicer1 のコンディショナルノックアウトマウス (*Dicer1<sup>fl/fl</sup>*) 由来の間葉系幹細胞および ES 細胞に hDICER1 変異体遺伝子を導入した細胞を用いて解析されており、RNase IIIb ドメインへのミスセンス変異は miRNA-5p のプロセッシング異常を示すことが明らかになっている<sup>6)7)</sup>。

一方で、ヒト細胞株における DICER1 変異体の機能とその発現に伴うタンパク質の発現変動については明らかになっていない。そこで本研究は DICER1 症候群の特徴的な遺伝子型を再現する細胞を作製し、DICER1 症候群の腫瘍素因の原因を同定することを目的とした。CRISPR/Cas9 システムを用いて

DICER1 遺伝子を欠損させ、レンチウイルスにより DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体を発現させた細胞株を作製した。作製した DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体発現細胞株は、DICER1 症候群と同様に miRNA-5p のプロセッシング異常を示した。またパスウェイ解析によりがん関連遺伝子が最も大きく変動することを明らかにした。これらのことから DICER1 症候群の発症は DICER1 変異体の発現により、がん関連遺伝子の発現増加が関与していると考えられた。

## 方 法

### 細胞培養

細胞株はヒト胎児腎由来である HEK293T を使用した。培地には 10% Fetal Bovine Serum (FBS、GIBCO)、10 units/ml の Penicillin および 100  $\mu$ g/ml の Streptomycin (SIGMA) を含有する DMEM (life technologies) を使用し、5%CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。

### CRISPR/Cas9 system の GuideRNA のデザイン

Guide RNA のデザインは、CRISPR Genome Engineering Resource の CRISPR Design tool を使用した (<http://crispr.genome-engineering.org>)。標的部位は二本鎖 RNA の切断を行う RNase III ドメインの上流域にデザインした。

DICER1R#15S 5'-CACCGTCTCCAGAGCGTGTG-TACAC-3'

DICER1R#15AS 5'-AAACGTGTACACAC-GCTCTGGAGAC-3'

DICER1R#16S 5'-CACCGTATGCTGAATCAGC-GTCTGT-3'

DICER1R#16AS 5'-AAACACAGACGCT-GATTCAGCATAC-3'

### CRISPR/Cas9 ベクターの構築

デザインした Guide RNA をコードする二本鎖オ

リゴ DNA を pSpCas9(BB)-2A-puro (px459) (addgene) ベクターへ導入した。制限酵素 BbsI (New England BioLabs) で px459 を制限酵素処理し、DNA Ligation kit (TaKaRa) を用いて Guide RNA コードする二本鎖オリゴ DNA をライゲーションした。ライゲーションした px459-guide RNA は DH5 $\alpha$  competent cell (TOYOBO) にトランスフォームし、プラスミドの抽出 (FastGene Plasmid Mini、日本ジエネティックス社) を行った。Guide RNA の導入は、シーケンス解析 (ファスマック社) にて確認した。

#### DICER1 欠損細胞株の作製

作成したベクターを HEK293T に Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。2 日後に Puromycin (2  $\mu$ g/mL) でセクションを行った。さらに 2 日後にセクションを終了し、15 cm dish に 50-100 個の細胞を播種し、単細胞からなるコロニーを作成した。シリンドラーを用いてコロニーを単離し、24 well plate にて細胞を培養した。各クローンより、フレームシフト変異確認のために DNA 抽出を行った。フレームシフト変異を起こす部分を挟むようなプライマーをデザインし Ex Taq (TaKaRa) を用いて抽出した DNA の PCR を行った。

hDICER1 exon15F2 5'-TCGAGGTGCCTCTTC-TATTTC-3'

hDICER1 exon15R2 5'-TCCAAAGTGCTGGAGT-CATT-3'

増幅した PCR 産物は 1% アガロースゲルを用いて電気泳動し、切り出しにより、PCR 産物の抽出 (QIAquick Gel Extraction Kit) を行った。抽出したサンプルをシーケンス解析 (ファスマック社) し、フレームシフト変異の有無を確認した。シーケンス解析に使用したプライマーは PCR で使用したプライマーを用いた。全てのアレルにフレームシフトが確認されたクローンは Western Blotting によりタンパク質発現を確認し、DICER1 のタンパク発現が欠失したクローンを DICER1 欠損細胞株とした。

#### DICER1<sup>G1809R</sup> を発現するレンチウイルスベクターの構築

レンチウイルスベクターは、pLVSIN CMV-pur (TAKARA) を用いた。5' 側に Xma I、3' 側に Not I サイトを付加した DICER1<sup>G1809R</sup> 変異を含む 619 bp の人工遺伝子を合成した。上記の制限酵素を使用し DICER1 遺伝子と人工遺伝子を処理し、2xLigation-

Mix (TAKARA) によりライゲーションした。その後作製した DICER1<sup>G1809R</sup> 遺伝子と pLVSIN CMV-pur を Not I で処理し、pLVSIN CMV-pur/DICER1<sup>G1809R</sup> 6xHis ベクターを作製した。

#### DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体発現細胞株の作製

HEK293T 細胞を 4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/2 mL/well で 6-well plate に播種した。24 時間後に、pLVSIN CMV-pur/DICER1G1809R6xHis、pPAX2、pMD2G を PEI MAX を用いてトランスフェクションした。さらに 48 時間後に、レンチウイルスを含む培養上清を回収した。HEK293T 細胞は、2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/2 mL/well で 6 well plate に播種し、24 時間後にレンチウイルスを含む培養上清に置換することでウイルス感染させた。感染 48 時間後から Puromycin (2  $\mu$ g/mL) を培地に添加し、1 週間かけて感染細胞のセクションを行った。

#### Western Blotting

細胞を RIPA Buffer で氷上 30 分間、溶解しタンパク質を可溶化した。遠心 10,000 g 30 分で不溶画分を取り除き、上清をタンパク質サンプルとして回収した。タンパク質サンプルに SDS sample buffer を加え、5 分間煮沸、急冷した。6% ポリアクリルアミドゲルに 20  $\mu$ g のタンパク質サンプルを 20 mA で 90 分間、泳動した。ブロッキングはウェット式で行い、PVDF メンブレンには Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore) を使用した。ブロッキング条件は、30 V、o/n で転写した。5% スキムミルク PBST (Phosphate Buffered Saline, Tween20 0.05%) で 1 時間ブロッキングし、PBST で洗浄した。1 次抗体を 5% スキムミルク-PBST にて 1,000 倍希釈し、メンブレンのタンパク質吸着面に添加し、室温にて 3 時間反応させた。1 次抗体は Anti-Dicer1 抗体 (Proteintech 20567-1-AP)、anti-His-tag (CST D3I10) および Anti- $\beta$ -Actin 抗体 (C4) (Santa Cruz Biotechnology sc-47778) を使用した。PBST で洗浄後、2 次抗体を 5% スキムミルク-PBST で 5,000 倍希釈し、室温にて 1 時間反応させた。2 次抗体は Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (CST#7076) と Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (CST#7074) を使用した。PBST 洗浄後、発光基質として Amersham ECL Select (GE healthcare) を使用し、ChemiDoc Touch (Bio-Rad) で化学発光を検出した。

#### Small RNA-sq

total RNA は、Qiazol 試薬を用いて、標準的なプ



ロトコール (Qiagen) に従って各細胞株から調製した。スモール RNA ライブラリーは、Macrogen 社の TruSeq Small RNA Library Prep Kit のスモール RNA ライブラリー調製法を用いて調製し、得られたライブラリーを HiSeq2500 上でシーケンスした。得られたリードは、ヒトゲノムの UCSC hg19 と miR-Base (v22.1) 配列にマッピングされた。マップされたリードは、miRBase の既知の前駆体および成熟した miRNA 配列の両方に基づいてアノテーションされた。

#### Heatmap の作成

Heatmap は Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) を用いて Z-score を算出し作成した。small RNA-seq では HEK293T 細胞に発現する miRNA を miRNA-5p と miRNA-3p の二つの群に分け、それぞれの群から Normalized\_Value が高い順に 100 個の miRNA を使用した。プロテオーム解析では HEK293T 細胞と DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株を比較して 4 倍以上もしくは、0.25 倍以下の発現変動を示した遺伝子を使用した。

#### TaqMan Real-timePCR

RNA 抽出は ISOGEN II (ニッポンジーン) を使用した。抽出した Total RNA 10 ng から、TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystems) を用いて、miRNA の cDNA 化および定量的 PCR を行った。サーマルサイクラーは、LightCycler96 (Roche) を使用した。PCR の条件は、95°C1 分、95°C15 秒と 60°C1 分を 45 サイクルで行った。

#### DIA (Data independent acquisition) プロテオーム解析

各細胞を  $1 \times 10^6$  個以上、用意し、0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル中で超音波処理を行った。遠心分離により上清を除き、100 mM Tris pH 8.5, 0.5% ドデカン酸ナトリウムを加え、密閉式超音波破碎機によってタンパク質を溶解した。BCA アッセイによりタンパク質濃度を測定し、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  になるように調整した。サンプル 20  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}$ ) に終濃度 10 mM になるように DTT を添加して 50°C で 30 分間処理し還元化した後、終濃度 30 mM になるようにヨードアセトアミドを添加して室温 (遮光) で 30 分間処理しアルキル化を行った。アルキル化は終濃度 60 mM になるようにシステインを添加して室温で 10 分間処理し反応を止めた。ペプチドの断片化は 50 mM 重炭酸アンモニウムを 150  $\mu\text{L}$  添

加し、Lys-C 400 ng とトリプシン 400 ng を添加して、37°C で一晩処理した後、5%TFA を加えて溶液を酸性にし、遠心 (15,000 g、室温、10 分) して上清を回収した。C18 スピнкаラムを用いて塩を除き、遠心エバポレーターで乾燥させた。3% アセトニトリル 0.1% ギ酸を加え、サンプル密閉式超音波破碎機によってペプチドを溶解し、ペプチド濃度 200 ng/ $\mu\text{L}$  になるように 3% アセトニトリル 0.1% ギ酸で調整し LC-MS 分析を行った。

#### パスウェイ解析

プロテオーム解析結果から HEK293T と DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株と比較して発現が 2 倍以上高くなっている遺伝子を選択し、DAVID Bioinformatics Resources6.8 の Gene Functional Classification Tool (<https://david.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>) を用いて行った。

#### 統計解析

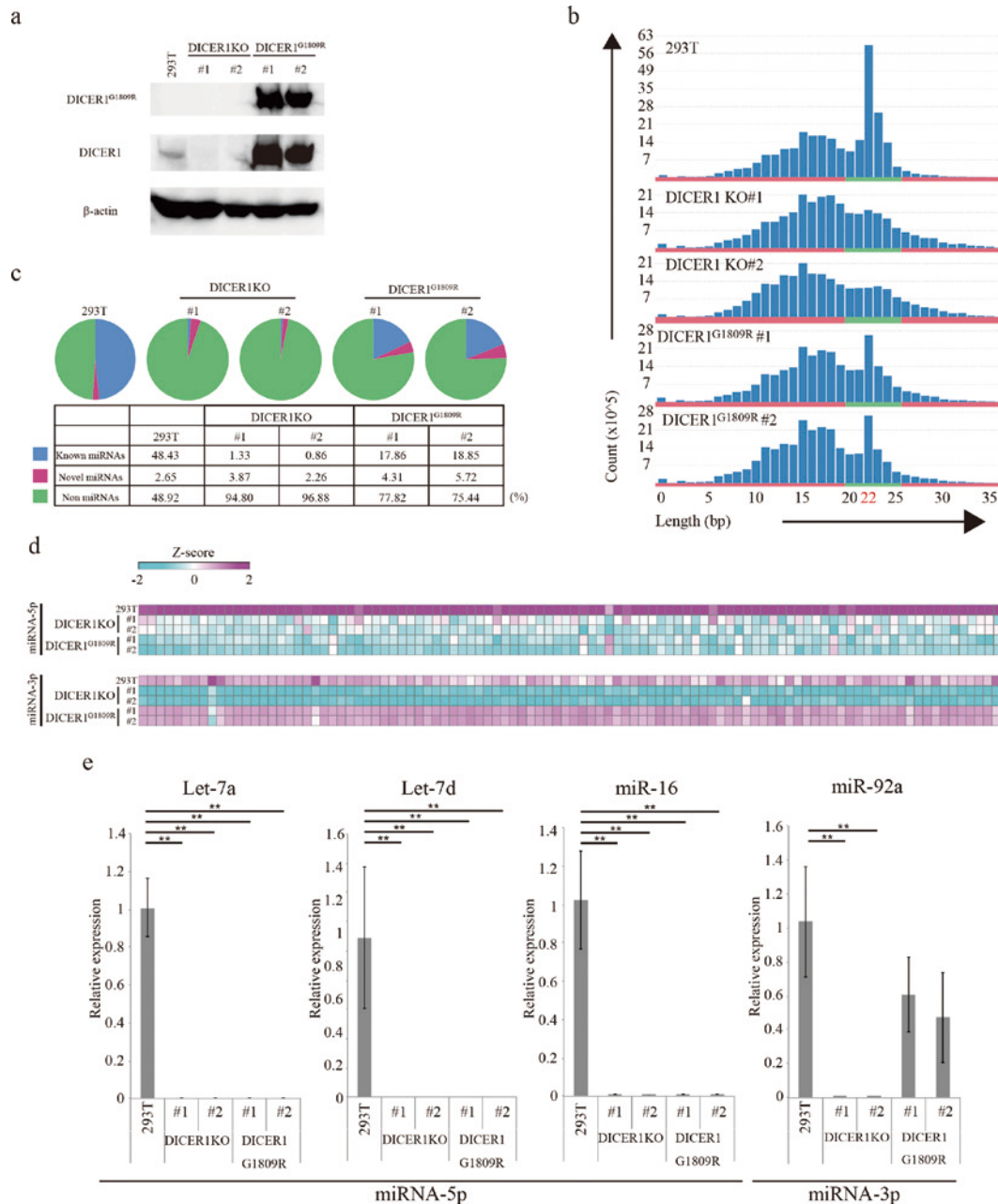
多重比較検定 (Tukey 法) を行い、統計的な差異を評価した。 $P$  値  $< 0.05$  を統計的に有意であるとした ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ )。

### 結 果

DICER1 症候群の患者組織は、DICER1 遺伝子の 1 つのアリルにナンセンス変異とミスセンス変異を有することが明らかになっており、正常な DICER1 を欠失し、DICER1 変異体のみが発現している状態と考えられている。このことから、DICER1 症候群患者の遺伝子型を細胞株で再現するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて内在性の DICER1 遺伝子を欠損させ、レンチウイルスにより患者検体で高頻度に認められる DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体を発現させた。細胞株は、ヒト胎児腎臓由来の HEK293T 細胞を用いた。HEK293T 細胞は、培養および遺伝子導入が容易であるため細胞生物学の研究に広く用いられている。また、核型など遺伝子型がよく解析されており、DICER1 遺伝子に変異がないことは、当研究室で確認している。ガイド RNA は DICER1 の RNase III ドメインの上流に 2 種類デザインし、フレームシフト変異を誘導した。変異はサンガーシーケンスにより確認し、全てのアリルにフレームシフト変異が確認できたクローンを選択した。2 種類のガイド RNA (#15、#16) を用いて、各々 DICER1 欠損細胞クローン株 (#1、#2) を樹立した。次に、この DICER1 欠損細胞株にレンチウイルスを用いて

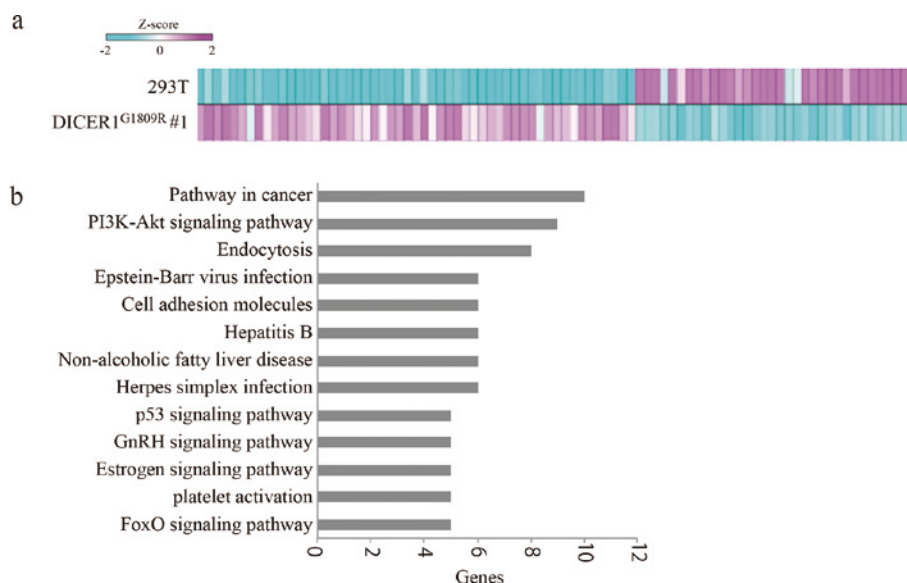
DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体を発現させた細胞株を作製した。これらの細胞株における内在性 DICER1 の欠失と DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体の発現を Western blot により確認した。その結果、DICER1 欠損細胞株における DICER1 タンパク質の欠失および、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株における DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体の発現が確認

できた (Fig. 2a)。続いて、作製した DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株における miRNA のプロセッシングを解析するために、次世代シーケンサーによる small RNA シークエンス解析を行った。その結果、DICER1 欠損細胞株において、miRNA と思われる 22 塩基長の RNA の顕著な減少が観察された。また、



**Fig. 2** DICER1<sup>G1809R</sup> mutants deplete miRNA-5p processing.

- Western blot validation of normal DICER1 and DICER1<sup>G1809R</sup> mutant proteins. DICER1<sup>G1809R</sup> mutant, normal DICER1 and β-actin was detected using Anti-His-Tag, Anti-Dicer1 and Anti-β-Actin Antibody, respectively.
- Histogram of read length distribution. The bars indicate the count by read length. (n=1)
- Pie charts of small RNA expression. The pie chart shows the percentage of Known miRNAs (blue), Novel miRNAs (red), and Non miRNAs (green). (n=1)
- Heat map of miRNA-5p and miRNA-3p expression. Top: miRNA-5p. Bottom: miRNA-3p. (n=1)
- miRNA assay of miRNA-5p and miRNA-3p expression. miRNA-5p: Let-7a, Let-7d, miR-16. miRNA-3p: miR-92a. (n=3) Data are presented as mean ± SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.001



**Fig. 3** Pathway in cancer is enhanced in DICER1<sup>G1809R</sup> cell.

- a. Heat map of protein expression. ( $n=1$ )  
b. Pathway analysis using DAVID.

DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株における miRNA の減少は約 50% に留まった (Fig. 2b)。miRNA のリード数は、無処置の HEK293T 細胞において総リード数の 51.08% を占めるのに対して、DICER1 欠損細胞株 (#1, #2) においては各々 5.2% および 3.12% であり、大半の miRNA が欠失していた。このことから、作製した DICER1 欠損細胞株において、DICER1 の機能的欠失が確認できた。一方で、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株 (#1, #2) に発現する miRNA の割合は各々 22.17% および 24.57% で、無処置の HEK293T 細胞のおよそ半分であった (Fig. 2c)。DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体は、miRNA-5p の生成に必要な RNase IIIb ドメインに変異を有するため、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株で発現する miRNA は miRNA-3p に偏ることが予想される。したがって、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株で発現する miRNA を miRNA-3p と miRNA-5p に分けて解析した (Fig. 2d)。HEK293T 細胞に発現する miRNA を miRNA-5p と miRNA-3p の二つの群に分け、それぞれの群から Normalized\_Value が高い順に 100 個の miRNA を選択しヒートマップに示した。その結果、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株において、miRNA-5p の発現は減少し、miRNA-3p の発現は維持していることが示された。続いて、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株における miRNA-5p の欠失を定量性の高い Real-time PCR 法を用いて確認した (Fig. 2e)。miRNA-5p の代表として let-7a、let-7d、miR-16 と miRNA-3p の代表として miR-92a の定量的 PCR を行った。そ

の結果、DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株では、miRNA-5p である let-7a、let-7d、miR-16 の発現はほとんど欠失する一方で、miRNA-3p の miR-92a の発現は 50-70% 維持されていた。

DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株では、miRNA-5p の欠失により標的遺伝子のタンパク質の発現が増加すると予想される。したがって、プロテオーム解析により DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株におけるタンパク質の発現を網羅的に解析した。HEK293T 細胞と DICER1<sup>G1809R</sup> 発現細胞株を比較して 4 倍以上もしくは、0.25 倍以下の発現変動を示した遺伝子数はそれぞれ 53、34 遺伝子であった (Fig. 3a)。より広く解析するために発現が 2 倍以上に増加した 237 遺伝子を選択しパスウェイ解析を行うと、がん関連遺伝子の発現が増加していた (Fig. 3b)。このことから、DICER1<sup>G1809R</sup> 変異体は miRNA-5p の欠失およびがん遺伝子のタンパク質発現を増加させることにより、がんに促進的に働いている可能性が示唆された。

## 考 察

合成 miRNA を細胞株に過剰発現させると、相補的な配列を有する数十もしくは数百種類の mRNA の発現低下が観察される<sup>16)</sup>。これは、RNA 干渉作用によるノックダウンであるが、siRNA の RNA 干渉作用が概ね 90% 以上であるのに対して、miRNA の RNA 干渉作用は数%~数十% 程度と弱い。過剰発現でこの程度ということは、生体内における



miRNA の遺伝子抑制効果は更に弱いことが想像される。また miRNA は、しばしば“Fine-tuner (微調節するもの)”と表現されることから、広く弱い遺伝子発現調節が miRNA の本質であると一般的に理解されている<sup>17)</sup>。一方で、ほとんどの miRNA を欠失する Dicer1 欠損マウスおよび一部の miRNA 欠損マウスは、胎生致死の表現形を示す<sup>18)</sup>。これは、発生・分化の過程で miRNA が、“Key regulator”として重要であることを示唆している。

著者等は、がんにおける miRNA の研究過程で、miRNA は“Fine-tuner”でしかないのか、“Key regulator”となりうるのかという疑問を持ち、一貫して研究を続けている。近年、次世代シーケンサーの普及により、PPB 患者の約 9 割に DICER1 遺伝子変異が見つかり、この DICER1 遺伝子変異が PPB 発症の原因と報告された<sup>11)</sup>。また、Dicer1 欠損マウスの細胞に DICER1 変異体を発現させた実験から、PPB 患者で発現する DICER1 変異体は、miRNA-3p のみを生成することが明らかとなった<sup>6)7)</sup>。これらのことから、miRNA-5p の欠失が DICER1 症候群の腫瘍素因性を表現形とし、PPB の決定的な原因となることが示唆された。このように、“Fine-tuner”と考えられていた miRNA は、「発生・分化」の研究領域に続いて「がん」の研究領域においても“Key regulator”として認識を変えられつつある。一方で、そのメカニズムの解析は容易でない。現在、ヒトで発現する miRNA は、約 2,600 種類あり、miRNA-5p はその半分である。さらに 1 つの miRNA が標的とする mRNA は数百種類と考えられており、特定の経路 (miRNA-mRNA axis) を同定して重要性を議論することは現実的でない。したがって本研究は、遺伝子型を再現した細胞株における網羅的なタンパク質発現解析により、生物学的機能の変化を明らかにした。

本研究で作製した内在性の DICER1 を欠損し、かつ DICER1 変異体を発現する細胞株は、DICER1 症候群患者の遺伝子型を再現した初めてのヒト細胞株である。異なる遺伝子型の組織や血球細胞を含む患者組織と比較して、単純化されていることから、miRNA を始め遺伝子発現の変化を正確に捉えることができる利点がある。この細胞株の解析から DICER1 変異体による miRNA-5p のプロセッシング異常および、がん関連遺伝子の発現増加が明らかになった。がん関連遺伝子の発現増加は、DICER1 症

候群の腫瘍素因性の原因である可能性が示唆された。Dicer1 欠損マウス由来の培養細胞に DICER1 変異体を導入した研究から、CCND1 の発現増加が DICER1 症候群の原因と報告されている<sup>6)</sup>。一方で、本研究で作製した DICER1 症候群モデルのヒト細胞株では CCND1 の発現増加は認めず、マウス細胞を用いた先行研究と異なる結果となった。ヒトとマウスの miRNA 配列は高度に保存されているが、結合標的となる mRNA の 3' 末端非翻訳領域の配列および発現量などは、ヒトとマウスで異なることが予想される。

また細胞株による解析には限界がある。1 つは、HEK293T 細胞は既に腫瘍化した細胞であるため、腫瘍化する過程を観察することが出来ない点である。HEK293T 細胞において、既に発現が亢進しているがん遺伝子の発現変化は検出が困難である。もう 1 つは、組織特異的な遺伝子発現の再現が出来ない点である。癌遺伝子変異と腫瘍化する臓器の組み合わせは決まっていることから、腫瘍化には遺伝子変異と組織特異的なエピジェネティクスの状態が重要であると考えられている。したがって、がんの発症機構の観察の為には DICER1 症候群を発症する組織もしくは、発生過程の特定の時期に遺伝子型を再現する必要がある。以上のことから、DICER1 症候群の遺伝子型を再現するモデル動物の開発が今後の研究課題である。

miRNA-5p の欠失以外が原因となる可能性として、DICER1 による pre-miRNA 以外の RNA の分解異常も考えられる。例えば、DICER1 は Poly(C)-binding protein2 (PCBP2) と結合してレトロトランスポゾンである Alu の分解を行う。加齢黄斑変性症の網膜色素上皮において、過剰な鉄イオンが PCBP2 と DICER1 の結合を阻害することで、Alu が蓄積し細胞死が誘導されることが報告されている<sup>9)19)</sup>。レトロトランスポゾンは、がんの原因となる遺伝子変異を誘発することから、DICER1 変異によるレトロトランスポゾン抑制の低下は、発癌の原因になる可能性が考えられる。もう 1 つの可能性は、異常な miRNA-5p の影響である。DICER1<sup>G1809R</sup> が Pre-mRNA より miRNA を切り出す際に、miRNA-5p には Pre-miRNA のループ配列が残る状態になる。このような長鎖の RNA は RISC に取り込まれないため、miRNA として機能しないと考えられる。したがって本稿では、成熟 miRNA-5p が無いことを

miRNA-5p の欠失と表現しているが、ループ配列が残っている異常な miRNA-5p の発現が新たに獲得されたという見方もできる。一般的に RISC に取り込まれなかった miRNA は、速やかに分解されるため、このような異常な miRNA-5p の蓄積は考えにくい。が、何らかの影響がある可能性が考えられる。

本研究では、ヒト細胞株を元に DICER1 症候群の患者組織の遺伝子型を再現し、DICER1 症候群モデルヒト細胞株を樹立した。DICER1 症候群の患者組織と同様に miRNA-5p を欠失し、ヒト遺伝子の発現変化を再現することができる本モデル細胞は、DICER1 症候群の腫瘍素因性のメカニズム解明に有用であると考えられる。

### 結 語

- ・ DICER1 症候群患者の遺伝子型を再現した DICER1 症候群モデルヒト細胞株を作製した
- ・ DICER1 症候群モデル細胞株において miRNA-5p の発現がほとんど欠失した
- ・ DICER1 症候群モデル細胞株においてがん遺伝子のタンパク質発現が増加した

### COI 申告開示

本論文発表内容に関連して特に申告なし

### 謝 辞

本稿を終えるにあたり本大学院医学研究科分子病理学分野の皆様へ感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Ha M, Kim VN: Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Rev* **15**: 509-524, 2014
- 2) Towler BP, Jones CI, Newbury SF: Mechanisms of regulation of mature miRNAs. *Biochem Soc Trans* **43**: 1208-1214, 2015
- 3) Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D: Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* **2**: 100-113, 2015
- 4) Melo SA, Esteller M: Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. *FEBS Letter* **585**: 2087-2099, 2011
- 5) Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415-419, 2003
- 6) Anglesio MS, Wang Y, Yang W, Senz J, Wan A, Heravi-Moussavi A: Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage. *J Pathol* **229**: 400-409, 2013
- 7) Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A, Sharp PA: In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA* **18**: 1116-1122, 2012
- 8) Foulkes WD, Priest JR, Duchine TF: DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer* **10**: 662-672, 2014
- 9) Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, Kleinman ME, Ponicsan SL, Hauswirth WW, Chiodo VA, Karikó K, Yoo JW, Lee D, Hadziahmetovic M, Song Y, Misra S, Chaudhuri G, Buas FW, Braun RE, Hinton DR, Zhang Q, Grossniklaus HE, Provis JM, Madigan MC, Milam AH, Justice NL, Albuquerque RJC, Blandford AD, Bogdanovich S, Hirano Y, Witta J, Fuchs E, Littman DR, Ambati BK, Rudin CM, Chong MMW, Provost P, Kugel JF, Goodrich JA, Dunaief JL, Baffi JZ, Ambati J: DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* **471**: 325-330, 2011
- 10) Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK: Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **359** (25): 2641-2650, 2008
- 11) Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D: DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* **325**: 965, 2009
- 12) Doros LA, Rossi CT, Yang J, Field A, Williams GM, Messinger Y, Cajaiba MM, Perlman EJ, Schultz KA, Cathro HP, Legallo RD, LaFortune KA, Chikwava KR, Faria P, Geller JI, Dome JS, Mullen EA, Gratias EJ, Dehner LP, Hill DA: DICER1 mutations in childhood cystic nephroma and its relationship to DICER1-renal sarcoma. *Mod Pathol*; **27** (9): 1267-1280.
- 13) Rakheja D, Chen KS, Liu Y, Shukla AA, Schmid V, Chang TC: Erratum: Publisher Correction: Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun* **8**: 16177, 2017
- 14) Slade I, Bacchelli C, Davies H, Murray A, Abbaszadeh F, Hanks S: DICER1 syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *J Med Genet* **48**: 273-278, 2011
- 15) Murray MJ, Bailey S, Raby KL, Saini HK, de Kock L, Burke GA: Serum levels of mature microRNAs in DICER1-mutated pleuropulmonary blastoma.



- Oncogenesis **3**(2) : e87, 2014
- 16) Ohno S, Itano K, Harada Y, Asada K, Oikawa K, Kashiwazako M, Okuyama H, Kumagai K, Takanashi M, Sudo K, Ikeda N, Kuroda M : Development of Novel Small Hairpin RNAs That do not Require Processing by Dicer or AGO2. *Mol Ther* **24**(7) : 1278-1289, 2016
- 17) Siomi H, Siomi CM : Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Mol Cell* **38**(3) : 323-332, 2010
- 18) Kumar MS, Pester RE, Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J, et al : Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* **23** : 2700-2704, 2009
- 19) Gelfand BD, Wright CB, Kim Y, Georgel P, Dunaief JL, Ambati J : Iron Toxicity in the Retina Requires Alu RNA and the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep* **11**(11) : 1686-1693, 2015

## Analysis of model cells for DICER1 syndrome

Keiki OIKAWA, Shin-ichiro OHNO, Masahiko KURODA

Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

DICER1 is an RNase III enzyme essential for microRNA processing and the RNase IIIa and RNase IIIb domains, located at the C-terminus of DICER1, process miRNA-3p and miRNA-5p. In recent years, mutations in the DICER1 gene have been found in various tumors, which are collectively denominated as DICER1 syndrome. In this syndrome, two alleles of the DICER1 gene have characteristic mutations, a nonsense mutation, and a missense mutation in the RNase IIIb domain, respectively. This suggests that abnormal miRNA processing may be the cause of the development of DICER1 syndrome, but the pathogenesis of DICER1 mutations has yet to be clarified. Therefore, the aim of this study was to investigate the pathogenesis of DICER1 syndrome by generating a novel cell lines model of the DICER1 syndrome. We constructed DICER1 deficient human embryonic kidney cells (293T) using the CRISPR/Cas9 system and these cells expressed DICER1<sup>G10809R</sup> mutant using lenti-virus. This cell line showed abnormal miRNA-5p processing, as well as DICER1 syndrome, and increased expression of cancer-related genes. This suggests that the DICER1 mutant may be tumor-promoting due to deletion of miRNA-5p and increased expression of cancer-related genes. The cell lines are useful as a model cell for DICER1 syndrome to elucidate the pathogenesis of the disease and to investigate new therapeutic targets, as further research is expected.

---

〈Key words〉 : microRNA, DICER1 syndrome, proteomic analysis

---