

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15923

研究課題名(和文)膵発癌を促進する反復配列RNAの発現機序解明と制御法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of expression mechanism to regulate repetitive RNA which acceralates pancreatic carcinogenesis

研究代表者

岸川 孝弘(kishikawa, takahiro)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：00724171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム上には反復配列と呼ばれる繰り返し配列が広く大量に存在しているが、その中で特定の反復配列が膵癌、およびその前癌病変において異常に発現することが分かっている。本研究ではこの反復配列からの転写産物(反復配列RNA)が発癌を促進する機能を有することを証明するために、反復配列RNAを全身で発現するトランスジェニックマウスを樹立した。このマウスではDNA損傷修復が遅延した結果、遺伝子変異が増加しており、また変異型KRASによる膵腫瘍形成を促進させることが分かった。これらの結果より、反復配列RNAがいわゆる内在性変異原として発癌過程を促進させる機能を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質をコードせず従来機能を持たないとされていた反復配列領域からの転写産物が、発癌早期から異常発現していること、さらにこの発現が発癌過程に伴う単なる副産物としてではなく、遺伝子変異原としての機能を有していることをマウスモデルを用いて証明した。これらの結果は発癌プロセスの進行にコーディング遺伝子の変異だけでなく、ノンコーディングRNAの発現変化も重要な役割を果たしていることを示唆しており、発癌メカニズムの解明に新しい側面からの解釈を加える一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：Repetitive sequences are widely and abundantly spread through the genome with huge varieties. They were considered to be epigenetically silenced in physiological setting, among which, however, some subsets are reported to be aberrantly expressed in pancreatic cancer and pre-cancer lesions. In order to elucidate the molecular function of the repetitive RNAs in oncogenesis, we developed transgenic mice model that express repetitive RNA in whole body. We found that DNA damage repair function was suppressed and DNA mutation rate was increased in the pancreas in repetitive RNA expressing mice. And also repetitive RNA expression increases tumor formation in the pancreas in KRAS mutant mouse model. These results suggest that repetitive RNA functions as an intrinsic mutagen in the process of pancreatic cancer development.

研究分野：膵癌

キーワード：反復配列RNA 膵癌 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ノンコーディング RNA は、近年 分子生物学において世界的に注目され、急速に発展を続ける領域の一つであり、その分子機構や疾患との関連、新規治療標的としての可能性について多数の報告がある。しかしその生理的機能についての研究が進んでいるものは、数万種類あると言われているノンコーディング RNA 全体のごく一部に過ぎず、多くは機能や発現動態が不明なままである。

一方、ゲノム上でタンパク質をコードする領域はわずか数%であるのに対して、その半数近くを占めているのが反復配列である。反復配列は全染色体に広く数百~数万コピーにわたって存在しており、多数のサブセットを有している。しかし通常は転写が強力に抑制されているため、その生物学的意義は乏しいとされてきた。

しかし、サテライト RNA と呼ばれる反復配列 RNA の一種が膵癌およびその前癌病変で異常高発現する事が報告された。我々はこの反復配列 RNA が膵癌患者の血液中でも検出されることを見出し、膵癌早期診断マーカーとしての可能性を有することを示した (Kishikawa T et al. JIC insight, 2016)。さらにマウス細胞株を用いた検討において、反復配列 RNA の過剰発現によって足場非依存性コロニーの形成能や細胞分裂異常の惹起など癌化を示唆する表現型が獲得されるだけでなく、長期培養後にゲノム DNA やミトコンドリア DNA の突然変異の獲得率が増加することを 次世代シーケンサーを用いた網羅的解析によって見出した (Kishikawa T et al. Nat Commun, 2016)。また、その分子生物学的機序として、サテライト RNA が遺伝子修復タンパク質 YBX1 と選択的に結合し、細胞質に存在する YBX1 の酸化ストレス応答性の核内移行を阻害すること、その結果として酸化損傷 DNA の修復が遅延し、突然変異率の上昇を来すことを示した。

2. 研究の目的

これらの研究成果を踏まえて、本研究では反復配列 RNA の発癌促進作用の機序解明についての検討を推し進め、*in vitro* で得られた結果をトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* での検証によって再現することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 反復配列 RNA を恒常的に発現するトランスジェニックマウスの作成と表現型の観察

恒常的プロモーター下にサテライト RNA を発現する plasmid vector からトランスジェニックマウス用に必要な配列部分を制限酵素で切り出し、エレクトロポレーションによって受精卵に導入した。マウス細胞においては通常使用される *cmv* プロモーターでは時間経過とともにエピジェネティックな発現抑制を認めることから、影響の少ない EF1 プロモーターを選択した。

2) 反復配列 RNA 発現マウスと Kras 活性型変異マウスの交配による前癌病変の悪性転化の検討

膵特異的に活性変異型 Kras を発現し腺腫様腫瘍性病変 (mPanIN) を形成するマウス (Pdx^{cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}) と反復配列 RNA 発現マウスの交配を行い、経時的に腫瘍形成能の変化について検討を行った。

3) 膵組織への酸化ストレスの導入と DNA 損傷蓄積および YBX1 の局在変化の検証

膵組織へ酸化ストレスを誘導するために、セルレインによる薬剤誘発性急性膵炎モデル (50 mg/kg を 1 時間毎に 8 回腹腔内投与し、2 日連続投与) を利用した。また、膵に軽度の慢性炎症を惹起させるため、超高脂肪飼料 (60kcal% 脂肪含有) を 12 週間投与した。膵組織の DNA 損傷を評価するために 8-OHdG の免疫染色を行った。また炎症惹起後の YBX1 の核内移行を評価するために YBX1 の免疫染色を行った。

4. 研究成果

1) 反復配列 RNA 発現マウスの表現型の観察

全身性に反復配列 RNA を発現するトランスジェニックマウスを作成して、その表現型を観察したところ、野生型と比較して肝臓や脾臓、胸腺などにリンパ腫の形成を有意に多く認めたが、膵臓に腫瘍を形成するには至らなかった。しかし、2 歳齢の高齢マウスの膵組織において、炎症細胞の浸潤や血管壁の肥厚が野生型マウスより多い傾向が認められた。

2) 反復配列 RNA 発現マウスと Kras 活性型変異マウスの交配による前癌病変の悪性転化の検討

次に腫瘍形成を促進させるために、膵特異的 Kras 変異マウスとの交配を行った。その結果、Kras 変異のみのマウス (PK) と反復配列 RNA 発現 Kras 変異マウス (PKM) 両群において良性腺腫様

病変の形成を認めたが、観察した期間内ではPKM マウスにおいても癌化を示唆する多臓器への浸潤や転移は認められなかった。しかしながら、若週齢のマウスに着目すると、PKM マウス群において腺腫様腫瘍の発生数が若齢から有意に増加しているという結果が得られた(図1)。また50週飼育した後では両群とも膵臓のほぼ全体に腫瘍を形成しており両者に差を認めなかった。

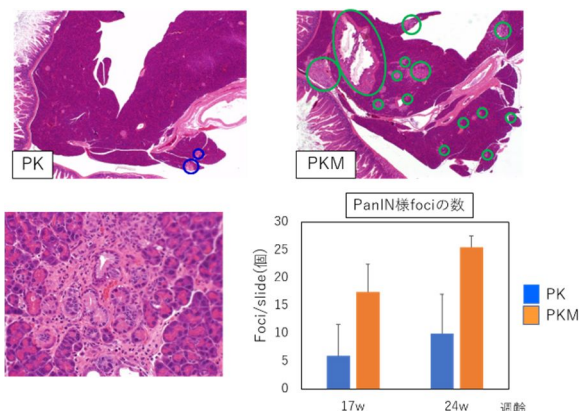


図1 反復配列 RNA 発現による膵腫瘍形成の促進

3) 酸化ストレスが惹起する DNA 損傷の修復における反復配列 RNA の分子生物学的影響についての検討

次に in vitro の系で認められた反復配列 RNA 発現による DNA 損傷増加、遺伝子修復タンパク質 YBX1 の核内移行阻害、突然変異の蓄積が再現可能かどうか検討を行った。高脂肪食の継続投与によって、肝細胞の脂肪沈着、膵臓の軽微な炎症が生じることが報告されている。野生型、及び反復配列 RNA 発現マウスに高脂肪食を12週間投与した後の組織に対して8-OHdGの免疫染色を行ったところ、反復配列 RNA 発現マウスにおいて DNA 損傷の蓄積を反映する8-OHdG陽性細胞の増加が見られた。また、セルレイン投与による急性膵炎モデルでは、反復配列 RNA 発現マウスにおいて YBX1 の核内移行を認める細胞数が有意に減少していた。またミトコンドリアゲノムのコピー数はミトコンドリア DNA の突然変異蓄積に逆相関して減少することが知られており、突然変異増加のサロゲートマーカーとして使用されている。セルレイン誘発性急性膵炎後の膵組織のミトコンドリアゲノムのコピー数を比較したところ、反復配列 RNA 発現マウスでコピー数が有意に減少していた。

図1 反復配列 RNA 発現による膵腫瘍形成の促進

4) 考察と総括

本研究では、膵臓の発癌過程の早期から高度に発現する反復配列 RNA が、単なる発癌プロセスの副産物ではなく、むしろ突然変異を蓄積するという発癌を促進する機能を有しているという、細胞株を用いた以前の研究成果を、トランスジェニックマウスを用いた in vivo の系においても再現することが可能であった(Kishikawa et al. Mol Cancer Res. 2018)。反復配列 RNA はこれまでも細胞分裂異常を惹起することにより染色体不安定性を高めるという報告がなされているが、今回の研究成果は、反復配列 RNA が DNA 損傷修復促進能を有する YBX1 の機能を局在部位依存的に減弱させ、残存した損傷 DNA によって突然変異誘導の機会が増加するという新たな発癌促進機序について明らかにした。これは日常的に細胞に生じている酸化ストレスが点突然変異を蓄積させていくという癌化の自然史を促進することを示唆しており、反復配列 RNA が、いわゆる「細胞内変異原」としてゲノム不安定性を高める誘因の一つである可能性を示していると考えられる(図2)。

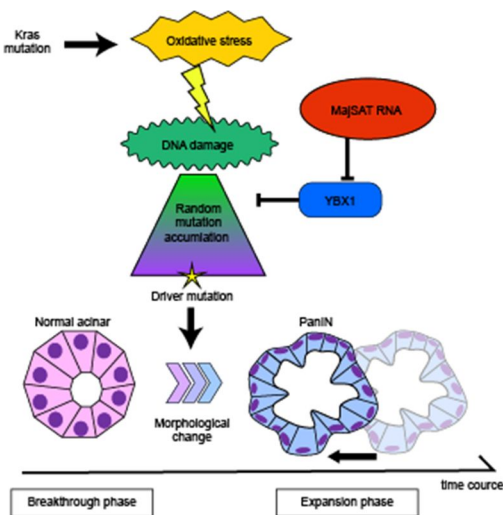


図2 反復配列 RNA 発現による癌化促進のメカニズム

なお、反復配列 RNA が発癌早期から異常に発現してくる分子機序については依然明確にされておらず、今後エピジェネティックな観点、細胞外微小環境の観点からその発現機序についての検討を加える予定である。それらの研究結果をもとに反復配列 RNA の発現制御法を開発することができれば、発癌予防医学の観点からも重要な意義を有すると考える。

<引用文献>

1. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, and Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. JCI Insight. 2016;1(8):e86646 DOI: 10.1172/jci.insight.86646
2. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, and Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic process via the dysfunction of YBX1. Nat

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Kishikawa T, Otsuka M, Suzuki T, Seimiya T, Sekiba K, Ishibashi R, Tanaka E, Ohno M, Yamagami M, Koike K. Satellite RNA Increases DNA Damage and Accelerates Tumor Formation in Mouse Models of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Res*. 2018 May 10. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0139.

Sekiba K, Otsuka M, Ohno M, **Kishikawa T**, Yamagami M, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels. *Oncotarget*. 2018 Apr 20;9(30):20953-20964. doi: 10.18632/oncotarget.25104.

Yamagami M, Otsuka M, **Kishikawa T**, Sekiba K, Seimiya T, Tanaka E, Suzuki T, Ishibashi R, Ohno M, Koike K. ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells. *NPJ Aging Mech Dis*. 2018 Nov 15;4:11. doi: 10.1038/s41514-018-0030-6

Takata A, Otsuka M, **Kishikawa T**, Yamagami M, Ishibashi R, Sekiba K, Suzuki T, Ohno M, Yamashita Y, Abe T, Masuzaki R, Ikenoue T, Koike K. RASAL1 is a potent regulator of hepatic stellate cell activity and liver fibrosis. *Oncotarget*. 2017 May 4;8(39):64840-64852. doi: 10.18632/oncotarget.17609.

[学会発表](計 3 件)

膵発癌過程における反復配列 RNA 異常発現の生物学的意義の検討 **岸川 孝弘** 大塚 基之 大野 元子 山上 まり 石橋 嶺 関場 一磨 鈴木 辰典 小池 和彦 2017 年 10 月 12 日 第 25 回 日本消化器関連学会週間 JDDW 2017 (福岡)

膵がんの早期発見を可能にする血清中の反復配列 RNA の高感度検出法の開発 **岸川 孝弘** 大塚基之 吉川剛史 大野元子 山上まり 石橋嶺 関場一磨 鈴木辰典 小池和彦 2017 年 4 月 14 日 第 54 回 日本臨床分子医学会学術集会(東京) ポスター:

High sensitive detecting procedure of circulating repetitive RNA as a novel early marker of pancreatic cancer **Takahiro Kishikawa**, Motoyuki Otsuka, Takeshi Yoshikawa, Motoko Ohno, Mari Yamagami, Rei Ishibashi, Kazuma Sekiba, Tatsunori Suzuki, and Kazuhiko Koike AACR annual meeting 2017 (Washington DC) April 2nd Poster session CL10.03 Early detection

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

該当ありません