

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390209

研究課題名（和文） レチノイン酸応答性の新規機能性 RNA の同定による肝細胞癌の診療への応用

研究課題名（英文） Identification of retinoic acid-responsive genes

研究代表者 汐田 剛史（SHIOTA GOSHI）

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70263457

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌でレチノイン酸（RA）シグナルが肝発癌を抑制するため、RAシグナル応答性遺伝子を抽出した。*in silico*解析によってRA応答配列を持つ201個のrnaClusterを得た。クロマチン免疫沈降法及び定量的RT-PCRによって27個のTRRAがRA応答性であることを見出した。またTRRAの中には、過去の文献で腫瘍形成、発癌、癌細胞の増殖との関連が報告されている遺伝子も含まれていた。

研究成果の概要（英文）：It is important to clarify the mechanisms by which retinoid signaling prevents the hepatocarcinogenesis in detail. In the present study, genome-wide analysis of the downstream genes controlled by RA signaling was done by means of *in silico* and *in vitro* screenings. First, the *in silico* approach was used to pick up rnaClusters with RA responsive element (RARE) in their upstream regions, providing 201 rnaClusters (hereafter referred to as Target RNA of Retinoic Acid, TRRA). One hundred eleven of those TRRAs were known as Refseq Genes while the others were unknown rnaClusters. Next, we screened 201 TRRAs with chromatin immunoprecipitation and quantitative RT-PCR. As a result, it was suggested that the expression of 27 TRRAs was regulated through ATRA-dependent recruitment of retinoic acid receptors to their RAREs. These twenty-seven TRRAs identified in this study may be useful targets of liver cancer treatment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：レチノイン酸、応答遺伝子、インシリコ解析、肝細胞癌診療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 世界における肝細胞癌(HCC)発症数及び死亡者数は、上位を占める。日本においてもHCCは増加傾向にあり、平成20年度にお

るわが国の年間死亡数は約3万5千人と、肺、胃に続いて癌死の第3位を占めている。現在一般的に行われているHCC治療は、外科的切除、肝動脈塞栓療法、エタノール注入療法、

ラジオ波焼灼療法、マイクロ波凝固療法などであるが、その治療成績は決して満足できるものとは言い難いのが現状である。さらにHCCは肝硬変を母地として発生し、その再発率は非常に高く、治療後2年以内に約50%の患者が再発を来すという報告もある。このため、より高い治療効果によってHCC死亡数の減少および予後の改善をもたらす、新規肝癌治療の研究開発が必要不可欠である。

(2) レチノイドは、レチノイン酸 (RA) とその誘導体の総称である。生体内で生理活性を持つ RA として、*all-trans*-RA (ATRA) や *9-cis*-RA などが知られており、リガンド誘導性転写因子である核内受容体を介して機能することが明らかにされている。この RA の受容体には、レチノイン酸受容体 (RAR) およびレチノイド X 受容体 (RXR) の2種類が存在し、さらにそれぞれ3つのアイソタイプがあることが知られている。RA 存在下においてこれらの受容体は、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する RA 応答配列 (RARE) に結合することで、様々な遺伝子発現を調節している。以前、アルブミンエンハンサー/プロモーター制御下に RAR-E 遺伝子を発現する RAR-E トランスジェニックマウス (RAR-E Tg) を作製し、肝臓における RA の機能解析を行った。その結果、肝臓特異的 RA シグナルの抑制により、脂肪沈着、鉄過剰沈着、酸化ストレスの亢進を介して、高頻度に HCC を発症した。また、非環式レチノイドが HCC の再発を有意に低下させることが報告されている。これら結果は、RA シグナルが HCC に対して抑制的に作用していることを強く示唆するものである。

## 2. 研究の目的

(1) RA シグナルがどのようなメカニズムで HCC に対して抑制的に作用しているのか、分子レベルでの解明には未だ至っていない。そこで本研究では、RA シグナルの作用を解明するため、non-coding RNA も含めた RA 応答性遺伝子について網羅的に解析することが重要であると考えた。現在このような網羅的遺伝子発現解析を行うためのツールとして cDNA マイクロアレイがあり、実際にこの解析手法を用いていくつかの RA 応答性遺伝子が同定されてきた。しかし、同定遺伝子は、既知の遺伝子のみであり、未知の新規遺伝子をゲノムワイドに探索するには不向きである。そこで本研究では、既知・未知を問わず、肝臓における全 RA 標的遺伝子を網羅的に解明することが重要である。

(2) これらの点を解消するため、転写開始点より上流 5 kbp 以内にコンセンサス RARE を持つ rnaCluster を、全ヒトゲノム塩基配列から *in silico* 解析によって選出した。rnaCluster とは、GenBank の spliced EST や

mRNA からアノテートされた転写領域であり、coding 遺伝子だけでなく non-coding RNA も網羅していると考えられるため、この解析によってマイクロアレイ法では困難な未知遺伝子についても、探索することが可能であると考えた。RA は RA 受容体とヘテロダイマーを形成し、転写因子として数十のいでのんしの転写調節をおこなっている。RA の作用は RA 応答遺伝子の作用に他ならず、RA 応答遺伝子を明らかにすれば、より直接的な RA の肝細胞癌の抑制効果が期待でき、肝細胞癌の診断にも応用可能である。それらについての詳細な機能解析を行うことで、HCC に対する新規治療法やバイオマーカーの開発につながると考え、本研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) RA 応答配列を上流にもつ転写領域の選出

まず、*in silico* 解析により RA 応答配列をもつ転写領域を選出した。各 rnaCluster の染色体上の位置情報とヒトゲノム塩基配列を使って、rnaCluster 配列ファイルを作成した (rnaClusterSeq)。さらに、各 rnaCluster の最上流 (5' 末端塩基) から 5 kbp 上流までの塩基配列を切り出し、rnaCluster 上流 5 kbp 配列ファイルを作成した (upstream5KSeq)。今回コンセンサス RARE として、2つのハーフサイト (5'-RGKTC A-3' (R=A/G, K=G/T)) が、任意の5塩基のスペーサー配列によってタンデムに連結した DR5 を適用し、rnaCluster 上流 5 kbp 以内にこの DR5 が存在するかどうか、検索を行った。rnaCluster の上流 5 kbp 以内に DR5 をもつ転写領域を Target RNA of Retinoic Acid (TRRA) とした。また、UCSC の Genome browser を使用し、各 TRRA に対応する遺伝子を確認した。

(2) クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

$10^6$  個の細胞を 10-cm dish に播き、一晚培養後、1% FBS DMEM に培地交換した。その 24 時間後に、5  $\mu$ M ATRA または DMSO を添加した 1%FBS DMEM で処理した。また、1枚余分に播いておき、セルカウントを行った。270  $\mu$ L 37% formaldehyde を加え、37°C で 10 分間置き、固定した。以降は氷上で実験を行った。冷 PBS (-) 5 mL で 2 回洗い、1 mL の冷 PBS (-) (PIC 含) でスクレイプし回収した。遠心 (700 $\times$ g, 4°C, 3 分) し、上清を除去した。 $10^6$  cells/500  $\mu$ L SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.1)、PIC) に再懸濁させ、10 分間氷上に置いた。Bioruptor (コスモバイオ) を使い、30 秒 (250W) のソニケーションを 10 回かけた。遠心 (13 krpm, 4°C, 10 分) し、上清を回収した。低吸着チューブ (BioScience) を使用し、100  $\mu$ L の上清に、900  $\mu$ L の dilution

buffer (0.01% SDS、1.1% Triton X-100、1.2 mM EDTA、16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1)、167 mM NaCl、PIC) を加え、anti-RAR 抗体 (sc-551、sc-552、sc-773) (Santa cruz) をそれぞれ 0.667  $\mu\text{g}$  ずつ、25  $\mu\text{L}$  Magnetic beads (Activemotif) を加えて、4°C で一晚、rotation させた。また、input として、10  $\mu\text{L}$  回収して、-30°C で保存した。

次に、下記の Buffer を加え、それぞれ 50 回の転倒を繰り返して洗浄を行った。1400  $\mu\text{L}$  Low Salt Immune Complex Wash Buffer で 2 回、1400  $\mu\text{L}$  High Salt Immune Complex Wash Buffer で 2 回、1400  $\mu\text{L}$  LiCl Immune Complex Wash Buffer で 2 回、1400  $\mu\text{L}$  TE Buffer で 2 回の洗浄を行った。以降、室温で実験を行った。125  $\mu\text{L}$  Elution Buffer を加え、15 分間、rotation させ、上清を回収した。これをさらにもう一回行った。ここで、保存しておいた Input を取り出し、240  $\mu\text{L}$  Elution Buffer を加え、以降は ChIP したサンプルと同様の操作を行った。5 M NaCl 10  $\mu\text{L}$  加えて、65°C で一晚インキュベートし、脱固定した。

0.5  $\mu\text{L}$  Protease K (20 mg/ml) (NACALAI TESQUE)、5  $\mu\text{L}$  0.5 M EDTA (pH8.0)、10  $\mu\text{L}$  1 M Tris-HCl (pH6.8) を加え、45°C で 1 時間 インキュベートした。270  $\mu\text{L}$  Phenol/Chloroform を加え、vortex し、遠心 (15 krpm、5 分間) した。上清を回収し、270  $\mu\text{L}$  100% isopropanol (NACALAI TESQUE)、13.5  $\mu\text{L}$  4 M NaCl、1  $\mu\text{L}$  グリコーゲン (20 mg/ml) (Roche Diagnostics) を加え、遠心 (15 krpm、4°C、15 分間) した。70% ethanol でリンスし、風乾させ、50  $\mu\text{L}$  超純水に溶解させ、real-time PCR により解析した (ChIP-PCR)。5  $\mu\text{L}$  DNA、0.5  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  primer (F)、0.5  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  primer (R)、0.8  $\mu\text{L}$  25 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics)、2.7  $\mu\text{L}$  超純水、0.5  $\mu\text{L}$  1a+1b をキャピラリー (Roche Diagnostics) に入れ、LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) を用いて、まず 95°C で 10 分間、続いて至適温度で 5 秒間 (アニーリング)、72°C で 10 秒間 (伸長)、72°C で 0 秒 (蛍光の測定)、95°C で 10 秒間 (熱変性) の繰り返しを 55 回行わせた。LightCycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics) で解析し、Input の値で補正した。また、TRRA のスクリーニングにおいては、さらに陰性対照の値で補正した。陰性対照プライマーとして CYP26A1\_DR5\_ds4kbp を適用し、relative occupancy [=input (目的領域) /%input (CYP26A1\_DR5\_ds4kbp)] を求め、relative occupancy が 1.5 倍以上の TRRA を次の 3 次スクリーニングで検討することとした。

(3) ATRA 処理によって発現変化

ATRA 処理によって発現変化は RT-PCR により行った。まず、ATRA 処理時間を決定するために、ATRA 存在下における CYP26A1 発現の時間変動について RT-PCR により検討を行った。Huh7、HepG2 においては、1 時間の ATRA 処理により有意な発現上昇が認められ、さらに 24 時間後まで上昇し続けた。一方、MCF-7 においても 1 時間で有意な発現上昇が認められたが、6 時間処理でピークに達し、24 時間後まで比較的高い発現レベルが維持された。以上より、ATRA 処理後 6 時間における TRRA 発現量を RT-PCR により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) *In silico* 解析によるレチノイン酸応答配列を上流にもつ転写領域の選出 (1 次スクリーニング)

新規 RA 標的遺伝子を同定するために、一般的に RA 標的遺伝子がある上流に RARE を持つことに注目して *in silico* 解析を行った。方法と材料に示したように探索を行った結果、RARE を上流 5 kbp 以内に持つ TRRA は、全部で 201 個であった。さらに UCSC の Genome browser を使用してどのような遺伝子に対応しているか確認した結果、RefSeq Genes に該当した TRRA は 111 個であった。一方、残りの 90 個については、Genome browser 上に RefSeq Genes としてアノテーションされてはいなかった。しかしながら、本来 rnaCluster は spliced EST と mRNA から決定された転写領域であることから、未知の遺伝子が存在している可能性が示唆された。

(2) ChIP 法による TRRA の 2 次スクリーニング

*In silico* 解析により得られた TRRA の RARE に、RAR が ATRA 依存的に結合するか調べるため、ChIP-PCR により 2 次スクリーニングを行った。まず、スクリーニングにおける ATRA 処理時間を決定するために、代表的なレチノイド標的遺伝子である RAR $\cdot$  と CYP26A1 の ChIP-PCR の時間変動を調べた。このとき PCR のプライマーとして、RARE (DR5) を含む領域を増幅するプライマーに加え、それぞれの DR5 より 4 kbp 下流の領域を増幅するプライマーを使用し、それらを陰性対照とした。その結果、ATRA 処理を 3 時間行ったサンプルは、全ての細胞株において、陰性対照に対して CYP26A1\_DR5 の値が有意に上昇したため、2 次スクリーニングの ATRA 処理時間を 3 時間とした。一方、RAR $\cdot$ \_DR5 に関しては、ATRA 処理を行った MCF-7 においては差がなかった。これは、MCF-7 において RAR $\cdot$  がほとんど発現していないことと一致していた。次に、TRRA の ChIP-PCR を行った。初期検討と同様、陰性対照プライマーとして CYP26A1\_DR5\_ds4kbp を適用し、relative

occupancy [=input (目的の領域) /%input (CYP26A1\_DR5\_ds4kbp)] を求め、relative occupancy が 1.5 倍以上の TRRA を次の 3 次スクリーニングで検討することとした。1.5 倍以上を陽性としたのは、TRRA の中に RA 応答遺伝子であることが報告されている遺伝子が含まれており、この TRRA の relative occupancy が約 1.5 倍であったからである。また、目的の DR5 周辺の塩基配列に関して、ゲノム上で重複している領域が存在するため、特異的な ChIP-PCR が行えなかった TRRA についても 3 次スクリーニングで検討することとした。結果として、201 個の TRRA のうち 126 個を次の 3 次スクリーニングで検討した。

### (3) RT-PCR による TRRA の 3 次スクリーニング

ChIP-PCR の 2 次スクリーニングによって絞り込まれた TRRA が、ATRA 処理によって発現変化を示すか調べるために、RT-PCR を行った。まず、ATRA 処理時間を決定するために、ATRA 存在下における CYP26A1 発現の時間変動について RT-PCR により検討を行った。Huh7、HepG2 においては、1 時間の ATRA 処理により有意な発現上昇が認められ、さらに 24 時間後まで上昇し続けた。一方、MCF-7 においても 1 時間で有意な発現上昇が認められたが、6 時間処理でピークに達し、24 時間後まで比較的高い発現レベルが維持された。次にこの初期検討の結果に従って、ATRA 処理後 6 時間における TRRA 発現量を RT-PCR により解析した。その結果、少なくとも一つの細胞株で ATRA 処理による発現変化を示した TRRA は、27 個であった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

1. 上田知沙、明地雄司、土谷博之、汐田剛史、レチノイン酸応答性遺伝子の同定による肝癌知慮 y 標的の探索、日本レチノイド研究会第 21 回学術集会、平成 22 年 11 月 13～14 日、大阪、大阪医科大学
2. Shiota G, Systematic identification of novel cancer targets mediating anticancerous effects of retinoic acids, Yonsei-Tottori Joint Symposium on the future of Medicine, 2010, October 18, 韓国、延世大学高原州医科大学
3. 上田知沙、明地雄司、土谷博之、汐田剛史、レチノイン酸標的遺伝子の探索による肝癌治療標的の同定、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 10 月 13 日～

14 日、大阪、大阪国際会議場

4. 上田知沙、明地雄司、土谷博之、星川淑子、汐田剛史、レチノイン酸受容体応答性遺伝子の探索、第 17 回肝細胞研究会、平成 22 年 6 月 18 日～19 日、秋田市、秋田アトリオン
  5. 明地雄司、上田知沙、土谷博之、汐田剛史、レチノイド標的遺伝子の同定による肝癌の新規治療法開発、第 46 回日本肝臓学会、平成 22 年 5 月 27 日～28 日、山形市、ホテルメトロポリタン山形
- [図書] (計 0 件)  
[産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)

名称：レチノイン酸受容体リガンドの抗腫瘍作用、発癌抑制を含めた種々の作用を決定する遺伝子の同定

発明者：汐田剛史、明地雄司、上田知沙、土谷博之

権利者：汐田剛史、明地雄司、上田知沙、土谷博之

種類：特願

番号：2010-093226

出願年月日：2010年4月14日

国内外の別：国内

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 汐田 剛史 (SHIOTA GOSHI)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70263457

(2) 研究分担者 栗政明弘 (KURIMASA AKIHIRO)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80343276

(3) 研究分担者 星川淑 (HOSHIKAWA YOSHIKO)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10181489