

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590752
 研究課題名(和文) ダブル・マイクロアレイによる肝癌発生・進展に関わる新規遺伝子の網羅的探索
 研究課題名(英文) Molecular Screening by Microarray analysis for Hepatocarcinogenesis.

研究代表者
 中馬 誠 (CHUMA MAKOTO)
 北海道大学・北海道大学病院・助教
 研究者番号：30360910

研究成果の概要(和文)：癌組織においては RBM5 の発現量が低下していることが明らかとなった。RBM5 は p53 の mRNA に結合して、p53 の転写活性を制御していた。その結果、p53 の標的遺伝子の mRNA およびタンパクの発現量を調節し、癌細胞増殖に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of the RBM5 mRNA is decreased in cancer tissues. Overexpression of RBM5 enhanced p53-mediated inhibition of cancer cell growth and colony formation. RBM5 affected p53 transcriptional activity and levels of mRNA and protein for endogenous p53 target genes. RBM5 influenced protein, but not mRNA, levels of endogenous p53 suggesting that RBM5 contributes to p53 activity through post-transcriptional mechanisms. Our results show that RBM5 contributes to p53 transcriptional activity, and that growth suppression and apoptosis mediated by RBM5 are linked to activity of the tumor suppressor protein p53.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：肝臓病学

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：癌進展、RNA 結合タンパク、RBM5

1. 研究開始当初の背景

生体において、炎症が発癌を誘導するという現象が最も明確になっている臓器の1つが肝臓である。肝癌発生の分子機序には不明な点も多いが、B型およびC型肝炎ウイルス(HBV および HCV)による慢性炎症が誘導する多くの増殖と変異に関わる遺伝子異常が段階的に集積して、最終的に肝細

胞癌が発症すると考えられる。このことは慢性肝炎、肝硬変という過程を経て、高分化型肝癌が発生し、次第に中分化型、低分化型肝癌へと組織学的に進展していく多段階発癌過程をとることに合致している。

正常肝細胞より異形細胞が発生し、その後早期癌、進行癌へと進展していく分子機構を解明するには、既に報告のあるような

遺伝子の cDNA レベルの検討のみならず、今後はそれを制御するような non-coding RNA の癌化に伴う異常の検討も必要と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、慢性肝炎、肝硬変、肝癌患者の結節性病変に対し狙撃生検を施行し、その生検試料を用いて microRNA および mRNA を採取した後、アレイ検索を行い、発癌・進展の各段階における microRNA の発現プロファイルの比較検討を行う。その解析結果に基づき、癌化に伴い発現量の著しく変化している microRNA を選択し、in vitro、in vivo の機能解析により細胞の癌化との関与を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

エコー下狙撃針生検による凍結肝生検標本より total RNA を抽出し、microRNA、cDNA アレイによる発現プロファイルの解析を行う。これらのデータマイニングによる発現比較解析を行い、発癌早期に関与する分子、さらに癌の進展に関与する microRNA および mRNA のスクリーニングを行う。

スクリーニングされた候補の中から有意なものを選択し、癌細胞を用いて機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) microRNA および mRNA の変化

肝組織の total RNA による microRNA アレイとその後のデータマイニングからは、慢性肝炎、肝硬変、肝癌と進展していく過程で、統計的に有意な変化を示す microRNA を見出すことはできなかった。しかし、cDNA アレイとそのデータマイニングからは、背

景肝に比べて、癌組織において RNA 結合タンパクの一つである RBM5 の発現量が低下していることが示唆された。

(2) RBM5 の機能解析

RBM5 の癌細胞における機能解析を行うため、最初にヒト RBM5 の全長 cDNA を調整し、各種発現ベクターを作成した。次に癌細胞に発現し、癌細胞に与える影響を検討した。

① RBM5 の細胞増殖抑制効果

RBM5 を RBM5 の発現ベクターにより癌細胞に強制発現すると、細胞の増殖は抑制され、コロニー形成能も低下した(図1、2)。さらに、この増殖抑制効果は、癌抑制遺伝子の p53 と相加効果を示した。

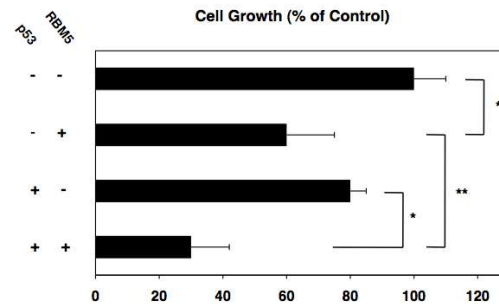


図1: RBM5が細胞増殖能に与える影響

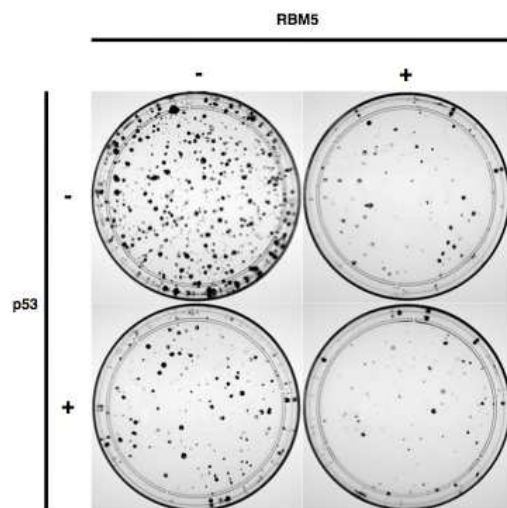
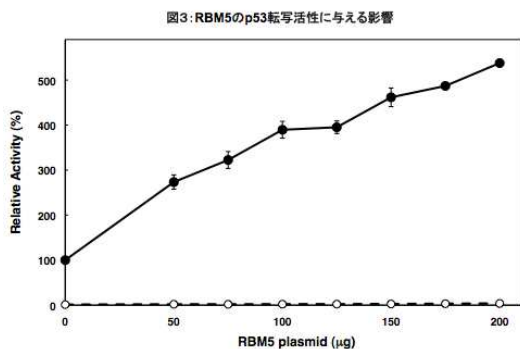


図2: RBM5がコロニー形成能に与える影響

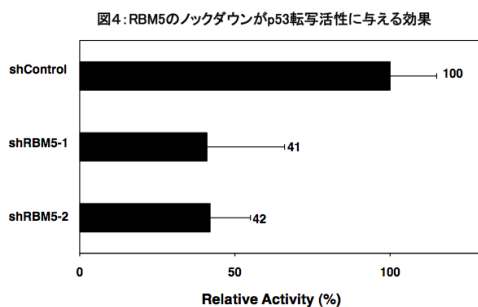
② RBM5 が p53 の転写活性に与える効果

RBM5 の p53 の転写活性に与える影響をレポーター遺伝子アッセイにて検討したところ、

RBM5 の発現ベクターの量依存性に、p53 の転写活性を増加させた (図 3)。



次に、癌細胞内の RBM5 mRNA をノックダウンさせるために、RBM5 の shRNA 発現ベクターをトランスフェクションさせた。RBM5 の 2 種の shRNA ベクターはいずれも、p53 の転写活性を低下させた (図 4)。

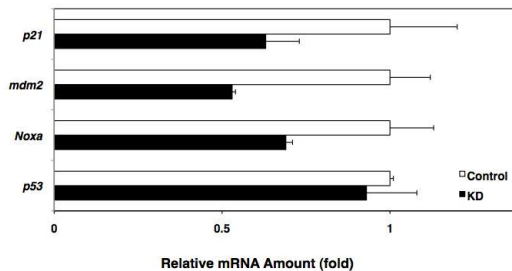


③ RBM5 が p53 の標的遺伝子の発現に与える効果

RBM5 mRNA のノックダウンが p53 の標的遺伝子の mRNA の発現量に与える影響を検討した。RBM5 の shRNA ベクターを癌細胞にトランスフェクトし、p21、mdm2、Noxa の mRNA 量を Real Time PCR 法により定量したところ、これらの p53 標的遺伝子の mRNA 発現量は低下した。一方、p53 の mRNA 量そのものには影響を与えなかった (図 5)。

次に RBM5 mRNA のノックダウンが p53 の標的遺伝子のタンパク発現量に与える影響を検討した。p21 および mdm2 のタンパク発現量をウェスタンブロット法により検討したと

図5: RBM5のノックダウンがp53標的遺伝子mRNAに与える効果



ころ、これらの p53 標的遺伝子のタンパク発現量が低下した。また同様に、p53 のタンパク量も低下していた (図 6)。

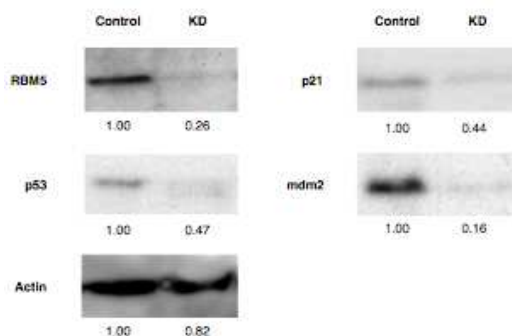


図6: RBM5のノックダウンがp53標的遺伝子の蛋白量に与える効果

④ RBM5 と p53 mRNA の結合の検討

上記のように RBM5 は、p53 の mRNA の発現量には影響を与えなかったが、タンパク量の発現は減少させた。そこで、RBM5 による p53 の転写後調節の可能性を検討した。

RBM5 の抗体により共沈してくる mRNA を RT-PCR により検討した。図 7 のように、p53 の mRNA を結合することが報告されている HuR と同様に、RBM5 は p53 mRNA に結合していることが示された。

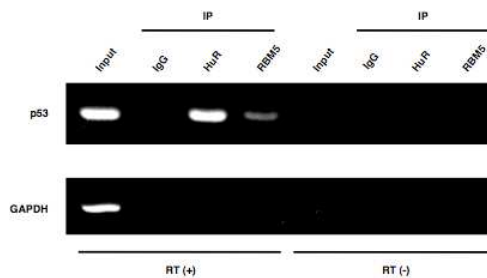


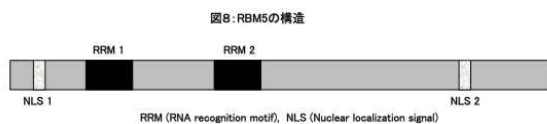
図7: RBM5のp53mRNAとの結合能の検討

(3) 考察

RBM5は815個のアミノ酸より構成される分子量約115kDaの核内蛋白質であり、各々2個のRNA結合モチーフと核局在シグナルが存在する(図8)。RBM5の遺伝子座は3p21.3領域にあり、肺癌、頭頸部癌、腎癌においてはLOHの好発部位として知られており、複数の癌抑制遺伝子の存在が示唆されている。

RBM5が細胞増殖抑制、アポトーシスに関与し、癌抑制遺伝子として機能する可能性が報告されているが、その分子生物学的機序は十分に解明されていない。

本研究により、RBM5はp53のmRNAに結合して、何らかの転写後調節により、p53の転写活性を制御している可能性が示唆された。



(4) 今後の展開

肝組織のtotal RNAによるmicroRNAアレイとその後のデータマイニングからは、肝癌発生に関与するmicroRNAを見出すことはできなかった。しかし、これは検討したサンプル数が少なかったことが、統計学的に有意差を示せなかった可能性がある。そこで、今後はさらにサンプル数を増やして検討する必要があると考えられた。

cDNAアレイとそのデータマイニングからは、癌組織においてはRBM5の発現量が低下していることが明らかとなった。さらに、RBM5がp53の転写活性調節因子の一つであることが示唆された。今後はRBM5がどのような転写後調節により、p53の発現量、転写活性を調節しているのか、その分子機序を解明していきたい。

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3件)

① Kobayashi T, Ishida J, Musashi M, Ota S, Yoshida T, Shimizu Y, Chuma M, Kawakami H, Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Kobayashi M, Itoh H, Edamatsu H, Sutherland LC, Brachmann RK. p53 transactivation is involved in the anti-proliferative activity of the putative tumor suppressor RBM5. *Int J Cancer*. 査読有, 2011 128(2):304-318.

② Chuma M, Hige S, Kamiyama T, Meguro T, Nagasaka A, Nakanishi K, Yamamoto Y, Nakanishi M, Kohara T, Shio T, Yamamoto K, Horimoto H, Kobayashi T, Yokoo H, Matsushita M, Todo S, Asaka M. The influence of hepatitis B DNA level and antiviral therapy on recurrence after initial curative treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 査読有, 2009;44(9):991-999.

③ Chuma M, Hige S, Nakanishi M, Ogawa K, Natsuzaka M, Yamamoto Y, Asaka M. 8-OHdG is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 査読有, 2008 23(9):1431-1436.

[学会発表] (計2件)

① Chuma M. The Influence of Hepatitis B DNA Level and Antiviral Therapy on Recurrence After Initial Curative Treatment in Patients With Hepatocellular Carcinoma. 第19回 アジア太平洋肝臓学会, 2009.2.15, 香港

② Chuma M. 8-OHdG is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma

in patients with chronic hepatitis C virus
infection. 第 43 回 欧州肝臓学会,
2008. 4. 25, ミラノ

6. 研究組織

(1)研究代表者

中馬 誠 (CHUMA MAKOTO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：30360910

(2)研究分担者

小林 隆彦 (KOBAYASHI TAKAHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・
客員研究員
研究者番号：80333607