

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06538

研究課題名(和文) 飢餓状態でのhnRNP A1消失とそれに続くncRNA遊離による癌細胞形質の変動

研究課題名(英文) Alteration of cancer cell traits by hnRNP A1 loss and subsequent ncRNA release during starvation.

研究代表者

高橋 徹行 (Takahashi, Tetsuyuki)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：00403692

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)：本研究により、以下3点の成果が得られた。

1：飢餓状態によるhnRNP A1タンパクレベル低下にはmiR-4745-5p、miR-6798-5pを介する翻訳抑制が関与していた。2：新規hnRNP A1結合性mRNAのCCND1 mRNAは飢餓状態時に安定性が低下し、このmRNA不安定化はhnRNP A1タンパク内のRRM1ドメインにより規定されていた。3：抗hnRNP A1抗体によるPAR-CLIP法により得た免疫沈降物からRNAを単離し、miRNA、lncRNA、circRNA特異的マイクロアレイに供した所、それぞれ17種、8種、18種のhnRNP A1結合性ncRNA候補が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の進展によりhnRNP A1を介した固形がん悪性化機構の一端が明らかになり、更に飢餓状態でhnRNP A1との結合が解離されるncRNAを同定する事につながる。このノンコーディングRNAの機能を検証する事で、新規機能性ncRNAの同定やこれらを標的にした新しいがん治療分子標的や診断・予後マーカー等を提示できる展望が開ける。この点は本邦の核酸医薬開発領域の更なる発展に貢献しうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The study achieved the following three results.

1. The starvation-induced hnRNP A1 protein loss was due to the miR-4745-5p and miR-6798-5p-mediated translational repression. 2. CCND1 mRNA, a novel hnRNP A1-binding mRNA, was destabilized by starvation, and this destabilization was defined by the RRM1 domain within the hnRNP A1 protein. 3. Using PAR-CLIP with anti-hnRNP A1 antibody, hnRNP A1-bound RNA were subjected to miRNA, lncRNA, and circRNA-specific microarray. 17 miRNA, 8 lncRNA, and 18 circRNA were identified as candidates of hnRNP A1-binding ncRNA.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：hnRNP A1 栄養飢餓状態 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

固形がんの特徴の一つに、深部では血管形成が質的、量的に不十分なために酸素および栄養成分が枯渇し、多くの部分が細胞死を起こす点がある。しかし、固形がん深部では、この状況化にもかかわらずなお一定数のがん細胞が生存し、これらが転移能や薬剤抵抗性の獲得など所謂悪性化を起こすと考えられている。この点より、これまで低酸素状態下のがん細胞で進行する細胞内イベントの解析が広く行われ、その結果 HIF-1 等の低酸素応答因子の同定とそれらに対する阻害物質の臨床開発にまで至った。一方、栄養成分枯渇による癌細胞形質変化については、Warburg 効果に代表される細胞内代謝変動による生存能上昇などが示され、この点に着目した分子標的治療も提唱されているが、その規模は決して大きくはない。以上の背景から、申請者は栄養成分枯渇による細胞内イベント解析を実施し、固形がん由来のがん細胞株を栄養飢餓状態(血清およびグルコース枯渇条件)下で培養すると、RNA 安定化、スプライシング、翻訳調節などに関与する hnRNP A1 タンパクが mRNA レベル低下を経ずにほぼ完全に消失し、この消失は一部オートファジー経路による分解が関与する点を見出した。更に数種類の hnRNP A1 結合性 mRNA を cDNA クローニングにより同定した。

しかし、これらの知見を得る過程で新たに解明すべき点も出てきた。具体的には、(A) コード配列(cds)のみを挿入した hnRNP A1 発現ベクター由来のタンパクは飢餓状態下でも全く消失しなかった事から、hnRNP A1 mRNA 5' 非翻訳領域(UTR)または 3' UTR を介した何らかの機構が飢餓状態下での hnRNP A1 消失に関与している点、(B) オートファジー経路による hnRNP A1 分解は部分的なものであった為、飢餓状態下での完全な消失を説明できる別の消失機構が存在している点、(C)現時点で同定に至った新規 hnRNP A1 結合性 RNA は mRNA のみの為、何らかの手段で新規 hnRNP A1 結合性ノンコーディング RNA を新たに同定していく必要がある点、等である。これら課題の解明は、飢餓状態での hnRNP A1 消失機構の明確な理解と、飢餓状態が促すがん細胞の悪性形質獲得に寄与する責任分子を見出す為に不可欠と考えられた。

2. 研究の目的

がん細胞が栄養飢餓状態で hnRNP A1 消失を実行する分子機構と、そのがん細胞悪性化機構へ及ぼす作用を解明し、もって新しい分子標的を提示するのが本研究の目的である。本研究計画では、上に記した栄養飢餓状態での hnRNP A1 消失機構について翻訳調節に焦点を当てた解析と、これに伴う hnRNP A1 結合性 mRNA の動態と細胞増殖に与える影響の解析を行い、その機構及び責任分子ががん細胞増殖に及ぼす影響を精査する。更に miRNA、lncRNA、circRNA 等のノンコーディング RNA (ncRNA)からも hnRNP A1 と結合するものを同定し機能解析する。これらの検討を通して「栄養飢餓状態で hnRNP A1 との結合から解放され遊離する」RNA 群からがん細胞の悪性化を調節する ncRNA を見出し、がん分子標的治療や診断・予後マーカーへの応用等における有用性を明らかにしていく。

3. 研究の方法

hnRNP A1 消失における翻訳調節に焦点を当て、miRNA による翻訳抑制に着目した解析を実施した。方法として、boxB 融合 hnRNP A1 mRNA 3' UTR 発現ベクターと N-HaloTag 融合タンパク発現ベクターを HeLa 細胞に導入後、通常及び飢餓状態下培養を施した後得た溶解物を HaloTag 特異的結合ビーズでプルダウンし、沈降物より得られる miRNA を解析した(図1)。同定済みの新規 hnRNP A1 結合性 mRNA のうち cyclin D1 をコードする CCND1 mRNA に着目して、飢餓状態時の動態と細胞増殖に与える影響を解析した。抗 hnRNP A1 抗体を用いた免疫沈降による沈降物から抽出した RNA を用いて miRNA、lncRNA、circRNA 特異的マイクロアレイを実施し、hnRNP A1 結合性ノンコーディング RNA 候補の同定・機能解析を試みた。

4. 研究成果

図1の方法により、飢餓状態下で hnRNP A1 mRNA 3'UTR との結合性が変動する miRNA の同定を miRNA マイクロアレイにより試みたところ、652 種の miRNA がヒットした。Cut off 値を 2 倍および 0.5 倍に設定して 83 種の miRNA を選抜後、データベース検索により各シード配列と結合しうる塩基配列が hnRNP A1 mRNA 3' UTR 内に存在する miRNA を抽出したところ、17 種の miRNA が候補となった。この 17 種の miRNA について、hnRNP A1 mRNA 3' UTR に対する結合予測位置を

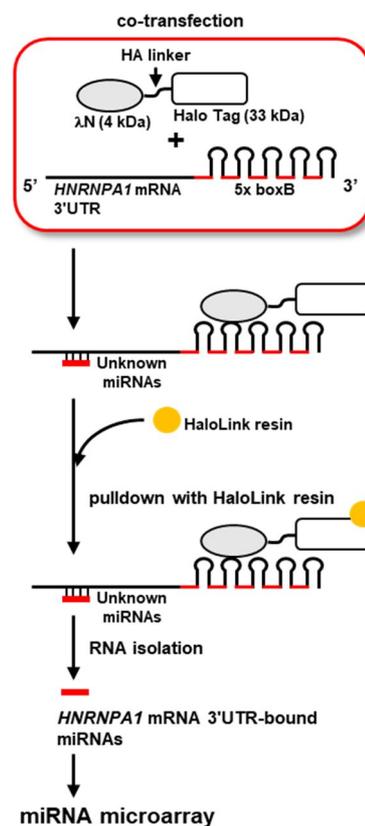


図1 hnRNP A1を標的とする miRNAの同定スキーム

調べたところ、飢餓状態で結合が低下する miRNA は均等に分布していたのに対し、結合が上昇する miRNA は 80% が約 400 bp の範囲に集中していた。そこで、この領域を欠失させた hnRNP A1 mRNA 3' UTR をルシフェラーゼ遺伝子下流に組み込んだレポーターベクターを作製し、レポーター活性を測定したところ、有意なレポーター活性の上昇が認められた。この約 400 bp の範囲に結合する 8 種の miRNA について、qPCR と immunoblotting による発現解析を実施した。qPCR 解析では、4 種の miRNA (miR-4734、miR-4745-5p、miR-6126、miR-6798-5p) でこれまでの結果と矛盾することなく低栄養状態による結合量上昇が認められた。更に、miR-4745-5p、miR-6798-5p の過剰発現は hnRNP A1 タンパクレベルの減少を引き起こしたが、mRNA レベルへの影響は見られなかった(図 2)。これより、飢餓状態による hnRNP A1 タンパクレベル低下には miR-4745-5p、miR-6798-5p を介する翻訳抑制が関与する事が明らかになった。

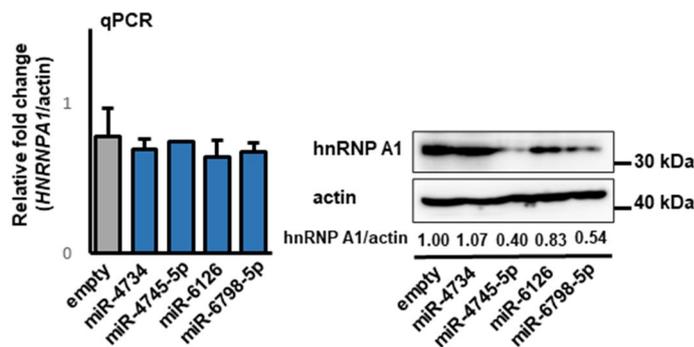


図2 miR-4745-5pとmiE-6798-5pはhnRNP A1を標的とする miRNAである

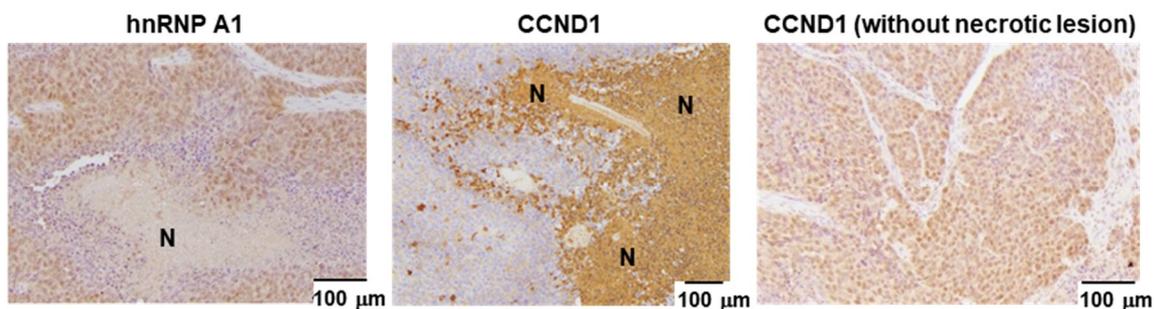


図3 腫瘍壊死部近傍ではhnRNP A1およびCCND1の発現が消失する

新規 hnRNP A1 結合性 mRNA の内、飢餓状態時に著しい mRNA レベル現象が見られた CCND1 mRNA について詳細な解析を実施した。まず mRNA 安定性 について検討したところ、CCND1 mRNA は飢餓状態時に著明に安定性が低下し、この安定性低下は hnRNP A1 発現ベクター導入によって回復したため、飢餓状態による hnRNP A1 タンパク消失を介する mRNA 不安定化が CCND1 mRNA で起きている事が示唆された。また、ヌードマウス皮下に HeLa 細胞を移植して得た腫瘍片より組織切片を作成し、hnRNP A1 および CCND1 の免疫染色を実施したところ、腫瘍組織内の壊死部近傍(飢餓状態と類似条件下の部位)においてのみ両分子の発現が明らかに低下していた(図 3)。欠失変異体を用いた解析により、飢餓状態による hnRNP A1 タンパク消失を介した CCND1 mRNA 不安定化は hnRNP A1 タンパク内の RRM1 ドメインにより規定される事が明らかになった。この結果を裏付けるように、RRM1 ドメイン 欠失変異体を安定発現させた HeLa 細胞(HeLa-deltaRRM1) をヌードマウス皮下に移植しても、全く腫瘍形成が認められなかった。また、in vitro による検討において、HeLa-deltaRRM1 は著明な増殖速度低下とオートファジー亢進をもたらし、これは CCND1 発現のレスキューによって回復した。

HeLa 細胞の細胞溶解物を用い、抗 hnRNP A1 抗体による PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation)法により得た免疫沈降物から RNA を単離し、miRNA マイクロアレイ、lncRNA マイクロアレイおよび circRNA マイクロアレイに供した。その結果、17 種の miRNA、8 種の lncRNA、18 種の circRNA が hnRNP A1 結合性ノンコーディング RNA の候補として同定された。更に miRNA については 5 種が、lncRNA については 1 種が同一サンプルを用いた qPCR によるバリデーションを通過した。今後、circRNA についても同様のバリデーションを実施し、通過した候補ノンコーディング RNA についての機能解析を過剰発現系、ノックダウンまたは競合的拮抗をするオリゴヌクレオチドを駆使して進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tetsuyuki Takahashi, Hirona Ichikawa, Yukiko Okayama, Manami Seki, Takao Hijikata	4. 巻 8
2. 論文標題 SV40 miR-S1 and Cellular miR-1266 Sequester Each Other from Their Targets, Enhancing Telomerase Activity and Viral Replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 57-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ncrna8040057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuyuki Takahashi, Yuri Ando, Hirona Ichikawa, Koichi Tsuneyama, Takao Hijikata	4. 巻 290
2. 論文標題 Serum/glucose starvation strikingly reduce heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein and its target, cyclin D1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4126-4144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋徹行、船村麻衣、若井駿、市川裕菜、土方貴雄
2. 発表標題 miR-4745-5pとmiR-6798-5pはhnRNP A1 mRNAを標的とする「飢餓特異的」miRNAである
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市川裕菜、石原大武、高橋徹行、土方貴雄
2. 発表標題 同種ウイルス粒子を用いたポリオーマウイルス関連疾患の新規治療戦略
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 湯浅勝敏、増淵愛美、新谷美穂、猪俣由以、庄司沙夜子、木田ほのか、岡田知、市川裕菜、高橋徹行、三原潔、土方貴雄
2. 発表標題 STAT1遺伝子のIFN依存性ポジティブ・フィードバック制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋徹行、若井駿、船村麻衣、市川裕菜、土方貴雄
2. 発表標題 飢餓誘導性hnRNP A1タンパク消失機構に関与するmiRNAの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂口陽花、市川裕菜、高橋徹行、土方貴雄
2. 発表標題 ポリオーマウイルスのsmall t抗原によるIL-17F発現誘導機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川裕菜、関愛美、高橋徹行、土方貴雄
2. 発表標題 同種ウイルス粒子を用いたポリオーマウイルス関連疾患の新規治療戦略の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤悠莉、高橋徹行、市川裕菜、土方貴雄
2. 発表標題 飢餓状態下で起こるhnRNP A1タンパク消失に連動するCCND1レベルの低下
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関