

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：13802
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790439
 研究課題名（和文） 高感受性個体に発生した腫瘍内の動く遺伝子の解析
 研究課題名（英文） analysis of transposable genes in the tumors of hypersensitive individuals
 研究代表者
 倉部 誠也 (KURABE NOBUYA)
 浜松医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60466737

研究成果の概要（和文）：

ゲノムの不安定性は重要な癌制御メカニズムのひとつであり、一般的には染色体の分配機構や中心体の制御が関与していることが知られているが、動く遺伝子であるレトロトランスポゾンの影響も重要である事が示唆されている。本研究は従来法よりも短時間にハイスループットで解析が可能な手法を用いて、レトロトランスポゾンである long interspersed element-1 (LINE-1, L1) を解析したが癌特異的な LINE-1 は発見できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Genomic instability is one of the important regulatory mechanisms in the tumor development. The regulations of chromosome segregation and centrosome amplification are known to be involved in the genomic instability. Transposable genes “retrotransposons” are also implicated in it. In this study, although we used the more faster and high throughput technique compared with previous one, we could not find the tumor specific long interspersed element-1 (LINE-1, L1).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ゲノム不安定性、レトロトランスポゾン、LINE-1、インバース PCR、次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

本研究に関する国内・国外の研究動向および位置づけ

ゲノム中を動き回る（トランスポーズ）レトロトランスポゾンである L1 はゲノム不安定性に与える影響が大きく、その挿入は遺伝子破壊、スプライシングの異常、転写伸長の阻

害等を引き起こす（図 1；1）。ゲノム中にトランスポーズ可能な L1 は 80-100 個あり、それぞれ 99% の配列相同性を持つが残りの 1% の

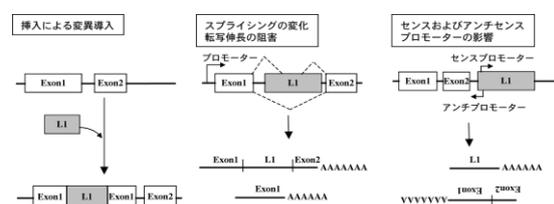


図 1 L1 の挿入による遺伝子発現の影響

違いがその活性に影響していると考えられている。L1は2つのコーディング領域 (ORF1, 2) から翻訳されたタンパク質が自身のmRNAに結合し (ribonucleoprotein, RNP; 図2)、細

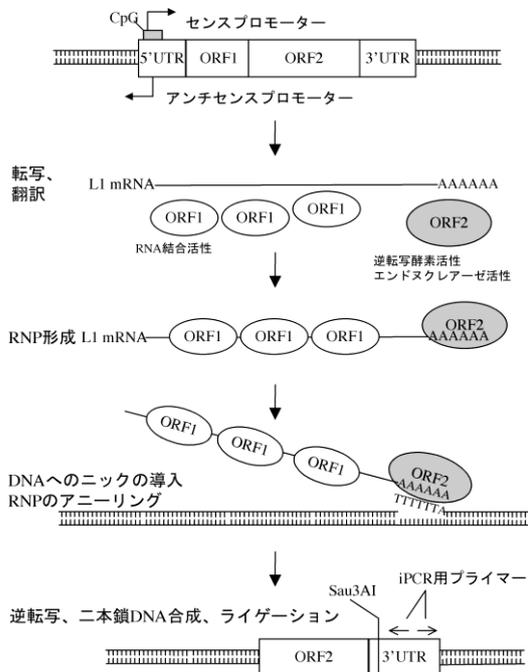


図2 L1のレトロトランスポジション

胞質でcytoplasmic fociと呼ばれる複合体を形成する(2)。その後、L1 RNPはゲノムにニックを入れ逆転写ののちその一部分がゲノムに組み込まれる。通常の状態では5'UTRのCpG領域が高度にメチル化されているためL1 mRNAが転写されることはないが、癌細胞のようなメチル化レベルが低下するような状況では転写が起こる(3)。そのためL1と癌の関係が研究されてきたが、多くの研究はL1のCpG領域のメチル化が癌では低下していることを明らかにしたものであり、L1が癌化の原因たるかを検証する研究はなかった。よって、癌に特異的なL1に着目する研究はL1研究の学問的空白を埋める研究であるといえる。2010年にL1検出法が2つ報告されたが、一つはDNAアレイを、他方は一検体に96穴プレートにして50枚もの

シーケンスを必要とするものであった(4, 5)。いずれもゲノム中のL1の位置を正確に同定できるが、コスト、時間という点において大量の検体の解析には不向きであると思われる。本研究で行うインバースPCR (iPCR)法はこの欠点を克服する方法であり、数百の検体を迅速に解析可能である。申請者の研究室では大量の癌検体を保有するため迅速に癌特異的なL1の検出が可能である。

申請者は培養細胞、タンパク質、遺伝子等を用いた解析を専門とし、これまでに細胞の大きさを制御する因子death effector domain containing DNA binding (DEDD)が糖代謝で重要となるキナーゼ群のリン酸化に与える影響を明らかにしてきた(6, 7)。また、癌マーカーの候補であるSAGA-associated factor29 (SGF29)やfourteen-three-three beta interactant (FBI1)の解析を癌細胞を用いて行い、腫瘍形成能や転移能に対する影響を解析してきた(8, 9)。癌とL1の解析を行うに当たり、癌や遺伝子等を扱ってきたこれまでの申請者の経緯から、本研究を行うことが妥当であると考え、まだ、未開拓な部分がある癌とL1に注目して研究を進める着想に至った。

文献

1. Nat rev genet. Vol 10. 691-703
2. Plos Genet. Vol 16 (10). 1-19
3. Oncogene. Vol 24. 7213-7223
4. Cell. Vol 141. 1171-1182
5. Cell. Vol 141. 1253-1261
6. J Biol Chem. Vol 284(8). 5050-5055
7. BBRC. Vol 39(14). 1708-1713

8. Oncogene. Vol 26. 5626-5634

9. J Biol Chem. Vol 283(27).
18753-18764

2. 研究の目的

ゲノムの不安定性は重要な癌制御メカニズムのひとつであり、一般的には染色体の分配機構や中心体の制御が関与していることが知られているが、動く遺伝子であるレトロトランスポゾンの影響も重要である事が示唆されている。本研究は従来法よりも短時間にハイスループットで解析が可能な手法を用いて、レトロトランスポゾンである L1 と発癌との関わりを解析する。はじめに、癌特異的に存在する L1 を同定し、次に同定した L1 が発癌の原因となるか検証する。

可能な限り多くの検体を用いて癌、転移特異的なL1をiPCRで見つけ、それらが近傍の遺伝子の発現にあたえる変化を解析する事を確実に達成すべき目標とする。iPCRによるL1の同定は予備実験においてデータベース中のL1が見つかっており、方法として確立している。そして、発現が変化した遺伝子が発癌の原因となるか解析することと同定したL1の挿入の原因となったL1遺伝子のレトロトランスポーズ能の評価を努力目標とする。発現変化が認められた遺伝子については過剰発現やsiRNAによるノックダウンでコロニーフォーメーション法や軟寒天培養法などで癌化に及ぼす影響を解析する。また、L1遺伝子については同定、単離後その活性をレトロトランスポジションアッセイで解析し、まだ微細な構造が観察されていないcytoplasmic fociを電子顕微

鏡で観察する。目標を達成するための課題は、i) iPCRによる癌特異的L1の検出、ii) 発現変化がみられた遺伝子が発癌や転移に影響するか検証、iii) L1遺伝子のレトロトランスポーズ活性の解析とcytoplasmic fociの観察である。

L1 の機能解析に対する独創的な切り口として、申請者が着目したのが iPCR 法による検出である。2010年に報告されたDNAアレイや大量のシーケンスによるL1検出法ではコストと時間がかかりL1がレトロトランスポジションしている位置を多検体で比較する事が難しい。iPCR法はそれらの欠点を改善する方法であり、癌および正常部位から抽出したゲノムDNAを制限酵素で切断し、セルフライゲーションさせたのちL1の3'側既知領域に設定したプライマーでPCRを行いL1の外側にある未知配列を同定する。その3'側の未知配列からゲノム中のL1の挿入位置の同定が可能である。iPCRでは高価なアレイや大量のシーケンスの必要がない。申請者の所属する浜松医科大学腫瘍病理学講座の研究グループは、大量のヒト癌検体を所有しており、iPCRを用いて癌特異的なL1のヒトゲノム中での位置を明らかにし、L1の癌への役割の解明を目指す。そのため、新たな癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発見も期待できる。また、本研究は特定の癌の原因を解析する手法を確立するという点でも、科学の発展に貢献できる。また、L1と癌というL1研究分野の学問的空白を埋めることになり、当該分野に大きな貢献をすると考えられる。

3. 研究の方法

iPCR法は適切な制限酵素で切断したゲ

ノム DNA を鋳型とした PCR 法であり、迅速、簡便そして低コストで大量の検体の解析が可能な手法である。この手法により、2010年に報告された DNA アレイや大規模なシーケンスを用いた方法よりも短時間に多くのデータの取得が可能となる。試料としてはヒトの肺癌とそれらの近傍正常組織から抽出したゲノム DNA を使用した。本研究では、はじめに癌特異的な L1 を iPCR 法により同定し、その後 L1 により発現が変化する遺伝子に着目した。最終的に癌と L1 の学問的空白を埋めることを目指した。

平成 23 年度

(1) iPCR法による癌特異的L1の同定

(2) リンカーライゲーション法を用いた癌特異的L1の同定

(1) iPCR法による癌特異的L1の同定

iPCRでL1の挿入位置を同定できるのでこれを利用した。申請者の研究室のヒトゲノムDNA（癌と正常部位）が肺癌でそろっているのでこれらを使用した。具体的には、ゲノムDNAを制限酵素Sau3AIで切断しセルフライゲーション後、L1の3'側に設定したプライマーでPCRを行った(図2右下)。PCR産物を電気泳動し正常と癌部位を比較し、癌特異的なL1を検出した。効率を上げるためゲノムDNAは異なる10サンプルを混合してiPCRを行った。

(2)リンカーライゲーション法を用いた癌特異的 L1 の同定

検体はインバースPCRの時と同様にヒトの肺癌とそれらの近傍正常組織から抽出したゲノムDNAを使用した。ゲノムDNAをMpsIで切断し、そこにリンカーDNAをライゲーションした。その後、DNAを精製し、リンカーDNA特異的プライマーとL1特異的プライマーでPCRを行った。さらに nestedプライマーを使用してのPCRを行った。サンプルはポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

4. 研究成果

インバース PCR 法で L1 の挿入位置を同定できるのでこれを利用した。PCR 産物を電気泳動し正常と癌部位を比較し、癌や特異的な L1 の検出を試みた。癌と正常部のペアを合計 67 ペア解析したが、癌特異的な L1 は発見できなかった。そこで研究が計画通りに進まない場合の解決策として予定していたリンカーDNAをライゲーションする方法を試みた。この方法では同定できる L1 の数が増加し癌特異的な L1 が発見できる可能性があるが、結果的に癌特異的な L1 は発見できなかった。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉部 誠也 (KURABE NOBUYA)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60466737

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし