

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650639

研究課題名(和文) バイオインフォマティクスに立脚したテロメア非コードRNAの機能解析

研究課題名(英文) Bioinformatics-based functional analysis of telomeric non-coding RNA

研究代表者

清宮 啓之 (Seimiya, Hiroyuki)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、遺伝情報を安定に保つテロメアと呼ばれる染色体末端が、TERRAと呼ばれるRNAに転写されることが報告された。このRNAの存在意義はまだよく分かっていないため、本研究ではがん細胞におけるTERRAの働きについて調べた。その結果、TERRAの発現量が多いがん細胞ほど、チロシンリン酸化と呼ばれる増殖信号を調節する蛋白質Xの発現が減少していることがわかった。がん細胞のテロメアを伸ばすとTERRAの発現が上昇し、分化形質が現れた。これらのことから、TERRAはテロメアの構造変化に反応して発現量を増減させ、がんの悪性度を調節する可能性が示唆された。この知見をがんの診断や治療に応用できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Telomeres are specialized structures that stabilize the genome at the ends of linear chromosomes. Recently, it has been reported that telomeric DNAs are transcribed to non-coding RNAs called TERRA. Since the precise importance of TERRA remains unknown, here we investigated the function of TERRA especially in human cancer cells. As the results, we found that cancer cells with more TERRA expression decrease the expression of protein X, which regulates the growth signal elicited by tyrosine phosphorylation. Telomere elongation enhanced TERRA expression and induced differentiation of cancer cells. These results suggest that TERRA regulates its expression upon the change in telomeric structure and modulates the cancer malignancy. These observations may be utilized for cancer diagnosis and therapeutics.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：テロメア 非コードRNA がん バイオインフォマティクス 分化

1. 研究開始当初の背景

直鎖 DNA の末端複製問題 (end replication problem) によるテロメアの短縮は、細胞老化や細胞死を誘導することによって発がんを抑制する。ほとんどのがん細胞はテロメラーゼを活性化してテロメアを再生するため、無限の分裂能を示す。我々はこれまでに種々のテロメラーゼ阻害剤を開発し、これらが実際のがん細胞のテロメアを枯渇させ、その無限増殖を阻止することを実証してきた。一方、興味深いことに、がん細胞はテロメラーゼ活性が陽性であるにもかかわらず、周辺組織の正常細胞と比較してより短いテロメアを維持していることが多い。しかし、その意義は不明である。

テロメアは、shelterin と呼ばれる蛋白質複合体など、様々な因子により制御されている。我々はヒトがん細胞パネル JFCR-39 を用い、テロメア関連因子の発現やテロメア長などを包括的に定量した Telomere Fingerprint Database を構築した。これにより、テロメアの様態にはがん細胞ごとに個性があることが判明した。近年は、shelterin 構成因子の一つである TRF1 をはじめ、テロメア制御因子の新しい機能の報告も相次いでいる。すなわち、テロメアを構成する個々のパーツは、細胞内の非テロメア因子と相互作用し、多様な生理機能を発揮していることが明らかになりつつある。ひいては、これらの機能的多様性のがんに個性を付与している可能性も考えられる。

テロメア DNA は高度に保存されており、脊椎動物の場合、TTAGGG の繰り返しである。この反復配列は蛋白質遺伝子をコードせず、末端複製問題でゲノム情報が損失するのを防ぐ緩衝領域としても重要である。したがって、テロメアは転写的にはサイレントであると考えられてきた。ところが近年、テロメアは非コード RNA [TERRA (telomeric repeat-containing RNA)/TelRNA] として転写されることが欧州で報告され、通説が覆された。TERRA の発現はテロメアの長さと同様に関連するともいわれているが、その意義は詳しく分かっていない。

2. 研究の目的

ヒトがん細胞パネル 39 株のテロメア関連および生物学的因子の定量値 (fingerprint) データベース、ならびに人工的にテロメアを伸長させたがん細胞株を起点として、TERRA の機能解明を目指す。具体的な達成目標は以下の 2 点である。(1) TERRA の発現様態と関連する細胞内因子を同定し、双方の機能的因果関係を明らかにする。(2) テロメアの伸長により TERRA の発現を人為的に修飾したときのがん細胞の形質変化とその分子機序を明らかにする。

本研究で得られる成果は、がんの診断のみならず、核酸医薬によるがん治療にも応用可能と期待される。

3. 研究の方法

(1) TERRA fingerprint の描出および関連バイオパラメータの探索：ヒトがん細胞パネル 39 系より RNA を抽出し、ノザンプロット法で TERRA の発現を検出した。TERRA の長さは不均一であるため、シグナル強度と平均 RNA 長の 2 点で定量数値化を実施し、それぞれについて fingerprint を描出した。これとテロメア関連因子の fingerprint を比較し、TERRA の発現と有意な相関を示すバイオパラメータをリストアップした。当センター分子薬理部の協力により、テロメア関連因子以外の遺伝子・蛋白質発現の Fingerprint Database についても相関解析を実施した。これらにより、TERRA と細胞内イベントの機能リンケージを予測した。

(2) テロメア伸長に伴う TERRA の発現変化とこれに伴うがん細胞の形質変化の解析：我々は、テロメラーゼ触媒サブユニット hTERT、テロメア伸長促進因子タンキラーゼ 1、あるいはテロメア伸長抑制因子 TRF1 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現によってがん細胞のテロメアを人為的に伸長させると、共通して様々な遺伝子群の発現が変化することを見出している。このときの TERRA の発現変化をノザンプロット法で調べた。また、この細胞の表現型変化を培養細胞レベルおよび in vivo ゼノグラフトのレベルで調べた。特に、in vivo でどのような包括的遺伝子発現変化が生じるか、GeneChip マイクロアレイを用いて検討した。変動遺伝子群のオントロジー解析から形質変化を予測し、検証実験を実施した。

4. 研究成果

(1) TERRA および細胞内因子 X の発現量の相関：ヒトがん細胞パネル JFCR-39 より RNA を抽出し、ノザンプロット法で TERRA を検出した。TERRA の長さは不均一であったため、シグナル強度と平均 RNA 長の 2 点で定量数値化を実施し、それぞれについて fingerprint を描出した (図 1)。これらをもとに、TERRA の発現様態と関連する細胞内因子を BIO-COMPARE アルゴリズムにて探索したところ、相関係数 (r 値) が 0.5 以上のものとして、チロシンリン酸化シグナルに

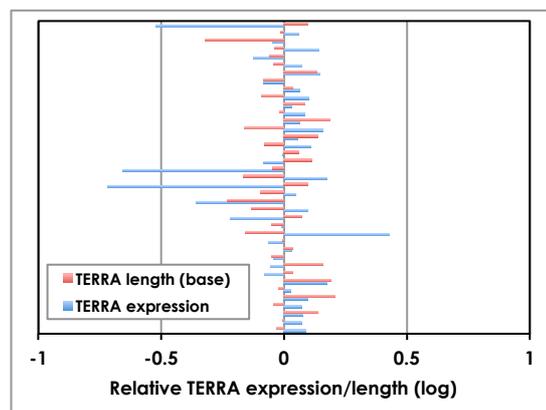


図 1. ヒトがん細胞パネル JFCR-39 の TERRA fingerprints

関わる細胞内因子 X が同定された。TERRA と同シグナル伝達に何らかの機能的因果関係が存在する可能性が示唆されたが、当初の計画で想定した X 阻害剤が存在しなかったため、X 遺伝子をノックダウンしたときの TERRA 発現変化など、機能的検証については今後の課題となった。

(2) テロメアの伸長による TERRA 発現とがん細胞の形質変化：我々は上述の通り、テロメラーゼ触媒サブユニット hTERT、テロメア伸長促進因子タンキラーゼ 1、あるいはテロメア伸長抑制因子 TRF1 のドミナントネガティブ変異体の過剰発現によってがん細胞のテロメアを人為的に伸長させた際、共通して様々な遺伝子群の発現が変化することを見出している。このことは、テロメアの構造が他の染色体領域における RNA 転写に何らかの特異的な影響を与えていることを示唆する。そこで今回、JFCR-39 の中でも特に短いテロメアを保持している前立腺がん PC-3 細胞に着目し、loxP 配列で挟まれた hTERT 遺伝子の過剰発現により、テロメア伸長株を樹立した。テロメア伸長後に Cre recombinase 遺伝子を発現するアデノウイルスを感染させ、hTERT 過剰発現の影響を除去した。これらのテロメア伸長細胞では、TERRA 様 RNA の発現が亢進していることが明らかとなった。

上述のテロメア伸長/TERRA 発現細胞株の表現型を詳細に解析したところ、in vitro の培養下では顕著な挙動変化は検出されなかったが、ヌードマウスへの皮下移植で形成される腫瘍組織を観察したところ、テロメア伸長株すなわち TERRA 発現細胞株（以下、単にテロメア伸長株と呼ぶ）では、特徴的な腺管様構造（図 2）が形成されるなど、高分化型の所見が認められた。親株細胞由来の腫瘍では、STAT1・ISG15・OAS3 など、がん発現の高い生体防御系遺伝子群の発現が上昇していた。一方、テロメア伸長細胞由来の腫瘍ではそのような応答が顕著に減弱していることが明らかとなった。

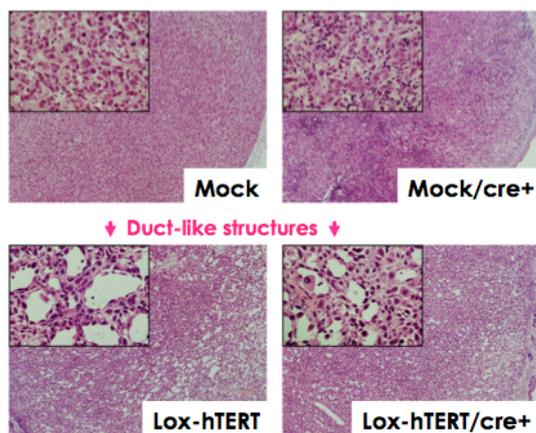


図 2. テロメア伸長による前立腺がん細胞の腺管形成

これらの結果は、テロメアの構造変化とともに誘導された TERRA が、ゲノムワイドな

染色体領域の転写に特異的影響を与え、ひいてはがん細胞の悪性形質をも制御する可能性を示唆している。以上の成果はがんの診断のみならず、TERRA 核酸医薬によるがん治療に応用できるかもしれない。

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 12 件）

- ① Ohishi, T., Muramatsu, Y., Yoshida, H., Seimiya, H. TRF1 ensures the centromeric function of Aurora-B and proper chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, in press. 査読有, DOI: 10.1128/MCB.00161-14
- ② Hirashima, K., Migita, T., Sato, S., Muramatsu, Y., Ishikawa, Y., Seimiya, H. Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo. *Mol Cell Biol*, 33:2988-2995, (2013), 査読有, DOI: 10.1128/MCB.00136-13
- ③ Iida, K., Majima, S., Nakamura, T., Seimiya, H., Nagasawa, K. Evaluation of the interaction between long telomeric DNA and macrocyclic hexaoxazole (60TD) dimer of a G-quadruplex ligand. *Molecules*, 18:4328-4341, (2013), 査読有, DOI: 10.3390/molecules18044328
- ④ Iida, K., Tsubouchi, G., Nakamura, T., Majima, S., Seimiya, H., Nagasawa, K. Interaction of long telomeric DNAs with macrocyclic hexaoxazole as a G-quadruplex ligand. *Med Chem Commun*, 4:260-264, (2013), 査読有, DOI: 10.1039/C2MD20234D
- ⑤ Ushijima M., Mashima, T., Tomida, A., Dan, S., Saito, S., Furuno, A., Tsukahara, S., Seimiya, H., Yamori, T., Matsuura, M. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Sci*, 104: 360-368, (2013), 査読有, DOI: 10.1111/cas.12071
- ⑥ Nakamura T., Iida, K., Tera, M., Shin-ya, K., Seimiya, H., Nagasawa, K. A caged ligand for a telomeric G-quadruplex. *Chembiochem*, 13: 774-777, (2012), 査読有, DOI: 10.1002/cbic.201200013
- ⑦ Miyazaki T., Pan, Y., Joshi, K., Purohit, D., Hu, B., Demir, H., Mazumder, S., Okabe, S., Yamori, T., Viapiano, M., Shin-ya, K., Seimiya, H., Nakano, I. Telomestatin impairs glioma stem cell survival and growth

through the disruption of telomeric G-quadruplex and inhibition of the proto-oncogene, c-Myb. *Clin Cancer Res*, 18: 1268-1280, (2012), 査読有, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1795

⑧ Deardorff M. A., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., Itoh, T., Minamino, M., Saitoh, K., Komata, M., Katou, Y., Clark, D., Cole, K. E., De Baere, E., Decroos, C., Di Donato, N., Ernst, S., Francey, L. J., Gyftodimou, Y., Hirashima, K., Hullings, M., Ishikawa, Y., Jaulin, C., Kaur, M., Kiyono, T., Lombardi, P. M., Magnaghi-Jaulin, L., Mortier, G. R., Nozaki, N., Petersen, M. B., Seimiya, H., Siu, V. M., Suzuki, Y., Takagaki, K., Wilde, J. J., Willems, P. J., Prigent, C., Gillessen-Kaesbach, G., Christianson, D. W., Kaiser, F. J., Jackson, L. G., Hirota, T., Krantz, I. D., Shirahige, K. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*, 489: 313-317, (2012), 査読有, DOI: 10.1038/nature11316

〔学会発表〕 (計 38 件)

- ① 平島匡太郎、清宮啓之、テロメア配列はヒトがん細胞の遺伝子発現を制御する、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸)、2013 年 12 月 3 日
- ② Seimiya H. Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo, The 3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting (Toulouse, France), 2013 年 11 月 20 日、招待講演
- ③ 清宮啓之、抗がん剤探索アプローチの変遷と最近の話題、第 72 回日本癌学会学術総会モーニングレクチャー (横浜)、2013 年 10 月 5 日、招待講演
- ④ Seimiya, H., Ohishi, T., Muramatsu, Y. TRF1 ensures proper chromosome segregation in mitosis. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Telomeres & Telomerase (Cold Spring Harbor, NY, USA), 2013 年 5 月 2 日
- ⑤ Seimiya, H. TRF1 regulates the microtubule-kinetochore attachment and contributes to proper chromosome segregation. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling (東京), 2013 年 2 月 1-2 日
- ⑥ 平島匡太郎、右田敏郎、佐藤重男、石川雄一、清宮啓之、テロメア長が腫瘍内遺伝子発現に及ぼす影響、第 35 回日本分

子生物学会年会 (福岡)、2012 年 12 月 11-14 日

- ⑦ Seimiya, H., Ohishi, T., Muramatsu Y. TRF1 regulates the microtubule-kinetochore attachment and contributes to proper chromosome segregation. EMBO Conference on Telomeres and the DNA Damage Response (L'Isle sur la Sorgue, France), 2012 年 10 月 2-6 日
- ⑧ 清宮啓之、がん研究基礎セミナー「新薬の原石をもとめて ~抗がん剤・化合物スクリーニング~」平成 24 年度がん若手研究者ワークショップ (蓼科)、2012 年 9 月 5-8 日、招待講演
- ⑨ Seimiya, H. Regulation of chromosome segregation by a telomeric protein. The 11th Korea-Japan-Germany Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (Gyeongju, Korea), 2012 年 7 月 5-7 日、招待講演

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 清宮啓之、ノーベル賞をもたらしたテロメア研究と癌の診断・治療応用への期待、*Surgery Frontier* 20: 37-43 (2013), メディカルレビュー社
- ② 清宮啓之、癌細胞の不死化と難治性、臨牀と研究 90, p.20-26 (2013), 大道学館出版部
- ③ 清宮啓之、テロメアの維持と細胞の分裂寿命、「がん増殖と悪性化の分子機構」、編者: 宮澤 恵二・伊東 進、化学同人、p.56-67 (2012), ISBN:9784759815030

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA, Hiroyuki)
 がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長
 研究者番号: 50280623