

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659362

研究課題名(和文)RNA結合活性を有する癌遺伝子とmiRNAの相互作用による肝細胞癌発生機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of hepatic carcinogenesis by interrelationship between RNA-binding oncogene and miRNAs

研究代表者

東辻 宏明(Higashitsuji, Hiroaki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60281094

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):RNA結合蛋白、spliceosomeの一因子CIRPに結合するHepG2 transcriptome中のmRNAsを同定するために、crosslinking and immunoprecipitation(CLIP)を使った。DNA damage後、BRCA1の相同組み換えによるDNA修復に關与する遺伝子のmRNAsにCIRPは結合した。核内のBRCA1-CIRP複合体はmRNAsのprocessingとsplicingを効果的に行ない、mature transcriptsの発現を亢進して、DNA damage抵抗性を發揮する。

研究成果の概要(英文):CIRP is one of RNA binding proteins, and induced by stress responses, which include moderate cold stress, ultraviolet, and hypoxia. CIRP functions as oncogene, because CIRP induces mouse primary cell immortalization and transformation. To identify CIRP protein-bound mRNA transcripts in whole transcriptome of human hepatoblastoma cell line HepG2, we apply crosslinking and immunoprecipitation(CLIP). CIRP binds mRNA transcripts of Mre11, Rad50, Rad52, NBS, and ATM, that are involved in DNA repair by BRCA1-associated homologous recombination after DNA damage. However, CIRP does not complex with transcripts of Ku80, XRCC4-like, and DNA-PK, that are involved in DNA repair by non-homologous end joining (NHEJ). Spliceosome contains CIRP. CIRP binds phospho-BRCA1 in the nucleus. phospho-BRCA1-CIRP complex undergoes efficient mRNA processing and splicing, and enhances expression of mature transcripts, facilitating resistance against DNA damage.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：RNA結合蛋白 肝癌 mRNA processing mRNA splicing CLIP spliceosome BRCA1 homologous recombination

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1)タンパク質をコードしない RNA(ncRNA)は進化上高度に保存され生物の複雑さを生み出す非常に重要な基盤である。~ 20塩基長の miRNA は mRNA の 3'-非翻訳領域と相互作用して発現を抑制し、タンパク質をコードする遺伝子の約 50%をターゲットとする。全体的な miRNA の downregulation は癌の特徴であり、また、特異的な腫瘍の型によってはある miRNA が特異的に異常制御される。(Reuven-Agami,Nat-Rev-Cancer,2011)

2)RNA 代謝のもうひとつの重要な player は RNA 結合タンパク(RBP)である。RBP は miRNA の機能を決定する因子である。miRNA の生合成、局在、分解、活性を調節する。RBP の発現や活性の異常制御は癌で見られる。いくつかの生理的条件下や外的刺激下において特異的な miRNA と RBP との相互作用が見られる。この調節機構は miRNA と RBP が共通のターゲット RNA に結合するという活性に依存しており、空間的、時間的にコントロールされている。癌の発生や進展に miRNA-RBP-interplay が関与していると考えられる。(Mircea Ivan,Frontiers-in-Mol-Neurosci,2011)

3)Moderate-cold-shock や UV、hypoxia で発現が誘導される RBP、CIRP と RBM3 はマウスの primary cell の不死化と transformation を誘導し癌遺伝子として機能する。ヒト癌で CIRP と RBM3 は発現が亢進する。CIRP、RBM3 は N 端の RNA-binding-domain(RMM-motif)と C 端の glycine-rich-domain(RGG-motif)の 2 つの domain よりなる。(ME-LLeonart,Biochim-Biophys-Acta,2011)

よって以下の着想をえた。

CIRP と RBM3 の RNA 結合部位の塩基配列を網羅的に Hepatoma-cell-line(HepG2)の transcriptome の中から探索する。ヒト miRNA の data base と上記の塩基配列を比較して、CIRP、RBM3 が結合する 3'-非翻訳領域の近傍にある miRNA を選択する。その中から CIRPsiRNA、RBM3siRNA で CIRP、RBM3 をノックダウンした場合とそうでない場合の small RNA の転写レベルを next generation paired-end mRNA sequencing でモニターし、miRNA の転写発現レベルが変化しているものをシーケンスデータより推測する。この結果より miRNA-RBP-interplay による RNA 発現の調節機構と肝細胞癌化の関係を調べる。

### 2. 研究の目的

1)癌遺伝子である RBP、CIRP と RBM3 が RNA 結合能を發揮して miRNA-RBP-interplay を介して肝細胞の癌化を誘導していることを明らかにする。2)非常に多くの CIRP、RBM3 結合部位が 3'-非翻訳領域、5'-非翻訳領域、CDS、intron に見られることが予想される。そのうちのごく一部が miRNA-RBP-interplay での RNA-regulation に関与していることを明らかにする。非常に特殊な条件でのみ、ある遺伝子は miRNA による調節をうけているということを明らかにする。

3)RBP の機能はほとんどわかっていない。RBP と miRNA との相互作用を transcriptome-wide で網羅的に探索することは RBP が miRNA の processing などに関与していることを明らかにでき、さらに、細胞癌化への関与も解析できる。

4)特異的 miRNA のターゲットの可能性のある遺伝子のうち、一部が miRNA での調節をうけている。

5)miRNA 量は不変なのに、特殊な状態ではある遺伝子の発現は miRNA に排他的に調節されていることがある。

6)RBPs の結合部位を癌細胞の transcriptome から comprehensive に同定する場合、以前は RIP-chip(RBP-immunoprecipitation-and-microarray-analysis)を用いた実験が多かったが、本実験には PAR-CLIP という方法を用いた。RIP-chip は indirect な結合や溶解条件によって artifactual な結合がみられたりして false-positive な結果が多かった。これに対して、photoactivatable-ribonucleoside-enhanced-crosslinking-and-immunoprecipitation(PAR-CLIP) は photoactivable-nucleoside を RNA に低レベルの UV を短時間浴びせることで取り込ませ有効な crosslinking が得られる。また crosslinked-nucleoside が結合部位のシーケンスの signature になるので結合部位のシーケンスが nucleotide-resolution で決定可能である。癌細胞の transcriptome 中に網羅的に 10,000 以上は detect される RBPs 結合部位であるのでできる限り false-positive が少ないほうがよいので、本研究では PAR-CLIP を用いることとした。

7)癌における miRNA-biogenesis、localization と RBPs との関係はいままでもいろいろと研究されている。癌における miRNA の global-downregulation は miRNA の biogenesis に関与している RBPs が copy-number の異常や mutation で量が少なくなるといことが起きる。癌において特異的な miRNAs が downregulate されるのも、いくつかの RBPs が原因である。本研究では miRNAs の生合成、局在、分解と RBPs との関係から細胞癌化を見るのではなく miRNA-RBP-interplay in 3'-UTR で miRNA と RBPs がコリネーションを組んで遺伝子の発現を調節することにより細胞癌化を制御しているという仕組みを明らかにすることをめざしている。

8)RBPs はヒトゲノム上に数百種類は存在すると考えられている。しかし RBPs の機能はほとんどわかっていないのが現状である。また RBPs の本来の働きである RNA-binding-capacity についても RBPs がどういう RNAs の配列に結合するかがほとんどわかっていない。PAR-CLIP 法をもちいることでひとつずつではあるが RBPs の結合配列が明らかになる。ひとつの RBP が非常に多くの RNA に結合するということが明らかになる。多くの種類の RNA に結合する、さらにひとつの同じ RNA でも多くの場所に結合する、ということが明らかになる。

9)ひとつの miRNA の近傍にも多数の RBP 結合部位が存在する。miRNA の発現量はももとの遺伝子の発現量に相関している。すなわち、ubiquitous に発現している housekeeping 遺伝子の introns に存在する miRNA-seeds はやはり ubiquitous に発現していることになる。ある定常状態にある細胞ではある miRNA の量はいつも abundant である可能性はあることになる。この細胞がな

んらかのストレスをうけた場合 ( stress-response、hypoxia、oncogenic-signaling、apoptosis、proliferation、cell-cycle-control ) miRNA の量は変化しないので、そこにストレスで誘導された RBPs が miRNA-seeds に近い場所に結合して miRNA の結合を追い出したり、あるいは translation-repression や mRNA-degradation に向かわないようにする機序が働くと考えられる。

10)miRNA の配列はある遺伝子の 3'-UTR に非常に特異的であるのに、その miRNA の量がある程度あってもその遺伝子の translation-repression や mRNA-degradation が抑制されているようなことがある。これも、プラスの因子として、RBPs というタンパク質が細胞内で作られるか、局在を細胞質に移し、miRNA 結合部位の近くに結合したら、その抑制が解けるということがありうる。

このように 2 重に miRNA の機能が調節されているということはこの RNA による遺伝子発現の制御が fine-tune されているということである。4)CIRP や RBM3 に HuR のような mRNA-stabilization 活性があるかどうかと同じ実験に RNA-sequencing や pulsed-SILAC-proteomics を組み合わせて解析することができる。さらに、mRNA のシクエンスデータより alternative-exon-inclusion を算定すると、mRNA-processing への関与もわかる。

### 3 . 研究の方法

(1)RNA-binding-protein(RBP) 、 CIRP と RBM3 の transcriptome 内での RNA 結合部位の同定。( 担当 : 東辻 ) CIRP、RBM3 とともに肝癌細胞株、および、ヒト肝癌組織において mRNA レベル、protein-level の両方で発現が亢進していることを RT-PCR 定量、ウエスタンブロットにて確認した。HepG2 を 4SU が 6SG でラベルする。UV で crosslink して NP-40 で細胞溶解液を得る。proteinG-magnetic-beads にカップリングした抗 CIRP 抗体、あるいは抗 RBM3 抗体で immunoprecipitate を行う。beads を CIP 処理し、RI でラベルする。crosslink された RNA-protein-complex を NuPAGE gel で分画にわけ、15-20kDa の CIRP や RBM3 に相当するバンドを切り出す。RNA を電気泳動的に elute し、さらに proteinaseK 処理、phenol-chloroform 処理をする。Small-RNA のプロトコールにのっとり small-RNA-sequencing を行う。おのおのの抗体に対して 3 回の実験を行い、CIRP あるいは RBM3 の結合部位を computer 解析した。それぞれの実験で得られた RBP 結合部位のデータは RefSeq-annotation によって 5'-UTR、CDS、3'-UTR、introns に clusters を形成している。

(2)3'-UTR は遺伝子発現の posttranscriptional-regulation

のハブの役目を負っていると考えられるので、HEH293 の Argonaute タンパクの PAR-CLIP の data と 3'-UTR 付近の CIRP、RBM3 結合部位を computer で比較した。( 担当 : 東辻 ) Ago タンパクは主に 3'-UTR の境界線付近に結合することが知られている。CIRP や RBM3 の 3'-UTR への結合は全体的に uniformly かもしれない、あるいは stop-codon から polyadenylation-signal にかけて傾斜があるかもしれない。Ago タンパクの結合部位と共通かもしれないし、全く Ago タンパクの結合部位を避けて結合しているかもしれない。

(3)3'-UTR での CIRP や RBM3 の anchor 部位の近くにある保存された miRNA-target-sites(miRNA-seeds) を PicTar あるいは TargetScanS によって、予測した。( 担当 : 東辻 ) このコンピューター解析により miRNA-seeds と直接 overlap する CIRP や RBM3 の anchor 部位がいくつか同定される。その数はかなりの数におよぶ可能性はある。miRNA-seeds は CIRP や RBM3 の anchor 部位と overlap している可能性もあるし、あるいは、miRNA-seeds の近傍に位置している可能性もある。後者の例として、HuR-binding-sites である AU-rich-sequence-context は miRNA-seeds からやはり 20-nt ほど離れていると報告されている。

(4)CIRP や RBM3 の結合の preference を調べるために、41-nt の中央付近の 7-nt の出現頻度を PAR-CLIP 法で解析した。この結果は in-vitro-protein-binding-microarray-assay で解析された in-vitro-CIRP-binding-sites、in-vitro-RBM3-binding-motifs と一致するかどうかを検討した。( 担当 : 東辻 )(Nikolaus Rajewsky,et al.,Mol Cell.,2011)

(5)RNA の secondary-structure は RBPs の結合の特異性に相関している。CIRP や RBM3 の 3'-UTR 付近の結合配列が hairpin-loop を形成するかどうかを computer で fold させて、Base-pairing-probabilities を平均化して、CIRP や RBM3 の anchor 部位の近傍の pairing-probabilities が大きいのか、小さいのかを計算する。Hairpin-loop が形成されるかどうかも予測する。( 担当 : 東辻 ) (Jack D.Keene,et al.,Mol Cell.,2011)

(5)CIRP や RBM3 が HuR と同じように mRNA-stabilization-effect を 3'-UTR の ARE-sequence に結合するような機序を介していくつかの mRNA を安

定化しているかどうかを解析する。(担当:東辻)HepG2においてCIRPあるいはRBM3のRNA-interferenceを用いてCIRPやRBM3のノックダウンを行う。Small-RNA-next-generation-paired-end-mRNA-sequencingを行い、遺伝子転写のレベルのモニターを施行する。Sequencing-dataから転写発現レベルの推測を行う。さらに、NanoString-nCounter-AssayによってmRNAの発現レベルを解析する。HuRと同様のmRNA-stability能をCIRPやRBM3が持っているならばPAR-CLIPのターゲットはnontargetsに比べてよりdestabilizedしていることになる。最も多い結合部位をもつターゲットはより大きくdownregulateされていることになる。

(6)CIRPやRBM3のタンパク合成に対する影響を調べる。(担当:東辻) pulsedSILAC(pSILAC)-proteomics-measurementsという方法で測定する。pSILACでは24時間の間に新たに合成されたタンパク質はstable-isotopeでラベルされたアミノ酸を取り込む。Medium-heavy-labelしたCIRP-knockdownあるいはRBM3-knockdownとheavy-labelしたなにもしていない状態との間のmass-shiftを測定することで何千というタンパク質の量を比較することが可能になる。このうちのいくつか1000種類ぐらいのタンパク質の合成量がCIRP-knockdownやRBM3-knockdownの時にmRNA-stabilizationと同じ傾向にあるのかどうかを調べる。Intoronic-targetsのタンパク合成はmRNAレベルのreductionより顕著かどうかも判定する。

(7)CIRPやRBM3は3'-UTRだけではなくintronsにも好んで結合している可能性がある。我々の得たmRNA-sequencing-dataをCIRPやRBM3に依存したalternative-splicingをもつ遺伝子についてスクリーニングする。(担当:東辻) CIRP-knockdownやRBM3-knockdownによるalternative-exon-inclusionの変化を計算して、flanking-premRNAやexon自身から1-kb以内にあるCIRPやRBM3の結合部位に関連したいくつかのreducedあるいはincreased-exonsを同定する。このなかでPCR-assayで十分なalternative-splicingを示す遺伝子が存在する。このなかで代表的なCIRPあるいはRBM3依存性のalternative-splicingを示す遺伝子について具体的にPCRを用いて定量化する。

(8)RBPs、CIRPやRBM3がそのmiRNA-processingに  
関与しているmiRNAを同定する。(担当:東辻)

HepG2でmock-transfectedとCIRP-knockdownあるいはRBM3-knockdownされたもののそれぞれのsmall-RNA-sequencingを行う。knockdownで最も強く変動するmiRNAを選択する。その変化がknockdownの程度に比例して変動していることを確認する。その同定されたmiRNAがどういう遺伝子のintronに存在するかをmiRNA-data-baseで調べる。CIRP-knockdownやRBM3-knockdownに逆相関する形でmiRNAがinductionを受けている。

(9)miRNA-CIRP-interplayあるいはmiRNA-RBM3-interplayによって影響を受けるmiRNAをPAR-CLIPのシーケンスデータとmiRNA-seedsのシーケンスデータを比較することで見つけ出す。(担当:東辻) HepG2で上記のmiRNAをsiRNA-oligosでknockdownした場合、HepG2のphenotypeがどのように変わるか。1)細胞増殖アッセイ、2)ソフトアガーアッセイ(コロニーフォーメーションアッセイ、コロニーフォーカスアッセイ) 3)アポトーシスアッセイ、4)マイグレーションアッセイ、5)インベジションアッセイ。

(10)RBP s が knockdown した場合、HepG2 の phenotype はどのように変化するか。(担当:東辻)1)細胞増殖アッセイ、2)ソフトアガーアッセイ(コロニーフォーメーションアッセイ、コロニーフォーカスアッセイ) 3)アポトーシスアッセイ、4)マイグレーションアッセイ、5)インベジションアッセイ。

#### 4. 研究成果

(1)CIRPは種々のヒト肝癌細胞株およびヒト肝癌サンプルでmRNAレベル、あるいは蛋白レベルで過剰発現している。

(2)CIRPはspliceosomeの構成因子のひとつである。

(3)PAR-CLIP法を用いて、ヒト肝癌細胞株であるHepG2 transcriptome中でCIRP蛋白と結合するtranscriptsを同定した。

(4)DNA damage responseにおいて、homologous recombination(HR)を介して、BRCA1蛋白と一緒にDNA repairを行なうタンパクであるMre11、NBS、ATM、Rad50、Rad52のmRNA transcriptsがCIRP proteinと結合することがわかった。

(5)DNA damage responseにおいて、non-homologous end joining(NHEJ)を介して、DNA repairを行なうタンパク群、DNA-PK、XRCC4-like、Ku80のmRNA transcriptsはCIRP proteinとは結合しなかった。

(6)32 という Mild cold stress において、CIRP は RNA レベルで発現が亢進する。ヒト肝癌細胞株 HepG2 は

37 に比べて、32 のほうが DNA damaging agents(cisplatin, etoposide, mitomycinC, adriamycin)付加後の clonogenic cell survival assay において、生細胞の割合が多い。

(7)CIRP を過剰発現したヒト肝癌細胞クローンのほうが DNA damage 後の clonogenic cell survival assay において、抵抗性が亢進している。

(8)CIRP shRNA を発現させ、CIRP 発現を抑制したヒト肝癌細胞株クローンは DNA damage に対する感受性が亢進している。

(9)上記の細胞クローンに CIRP shRNA-resistant cDNA を発現させると、DNA damage に対する感受性が低下する。

(10)32 において、CIRP タンパクは phospho-BRCA1(Ser1524)と細胞核内で複合体を形成する。

(11)上記の共局在は DNA damage response で見られる BRCA1 focus formation や Rad50 focus formation とは共局在していない。それ以外の核内の部位に共局在している。

(12)(4)で同定された mRNA transcripts の mRNA processing と splicing は 32 や CIRP 過剰発現時においては、効果的に施行され、mature transcripts が発現亢進し、タンパクレベルでもその発現は増加する。

## 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 6 件)

1. Stress response protein Cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer.

Sakurai T, Kashida H, Watanabe T, Hagiwara S, Mizushima T, Iijima H, Nishida N, Higashitsuji H, Fujita J, Kudo M. Cancer Res. 2014 Sep 3. 2014. 査読：有。

2. Hypothermia protects against fulminant hepatitis in mice by reducing reactive oxygen species production.

Sakurai T, Kudo M, Watanabe T, Itoh K, Higashitsuji H, Arizumi T, Inoue T, Hagiwara S, Ueshima K, Nishida N, Fukumoto M, Fujita J. Dig Dis. 2013;31(5-6):440-6. 査読：有。

3. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1.

Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mar 1;432(1):22-7. 査読：有。

4. Identification of a novel enhancer that binds Sp1 and contributes to induction of cold-inducible RNA-binding protein (cirp) expression in mammalian cells.

Sumitomo Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Fujita T, Sakurai T, Candeias MM, Itoh K, Chiba T, Fujita J. BMC Biotechnol. 2012 Oct 10;12:72. 査読：有。

5. Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice.

Masuda T, Itoh K, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nakazawa N, Sakurai T, Liu Y, Tokuchi H, Fujita T, Zhao Y, Nishiyama H, Tanaka T, Fukumoto M, Ikawa M, Okabe M, Fujita J. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 3;109(27):10885-90. 査読：有。

6. Adriamycin enhances proteasome-mediated generation of the proapoptotic processed form of MAGE-A4 in hepatoma cells.

Sakurai T, Kudo M, Itoh K, Ryu U, Higashitsuji H, Fujita J. Oncology. 2011;81 Suppl 1:30-5. 査読：有。

### [学会発表](計 5 件)

(1) 東辻宏明、東辻久子、がん抑制遺伝子 BRCA1 の不活性型代謝系酵素による核内での機能調節、日本肝臓学会、2012年6月7日～6月8日、金沢市。

(2) 東辻宏明、東辻久子、Protooncogene CIRP that is induced by moderate cold temperature(32 degrees centigrade) enhances cell mobility of cancer cells, 日本癌学会、2012年9月20日～9月22日、札幌市。

(3) 藤田潤、東辻宏明、東辻久子、哺乳類低温ショックたんぱく質 Cirp は皮膚創傷治癒を促進する、第8回臨床ストレス応答学会、2013年11月15日～11月16日、松本市。

(4) 東辻宏明、東辻久子、藤田潤、Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma. 第21回 JDDW2013, 2013年10月9日～10月12日、東京都品川区。

(5) 東辻宏明、東辻久子、哺乳類低温ショックたんぱく質 Cirp は BRCA1 による相同組み換えによる DNA 修復を促進する、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日～7月18日、郡山市立文化センター。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

東辻宏明( 京都大学、医学研究科 )

助教

研究者番号: 60281094

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: