

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2016

課題番号：24790325

研究課題名(和文) RUNX 遺伝子の後転写制御は神経芽腫の増殖・分化を決定するか？

研究課題名(英文) Post-transcriptional regulation of RUNX1/RUNX3 is critical for neuroblastoma cell growth or differentiation.

研究代表者

井上 健一 (INOUE, Ken-ichi)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90587974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RUNX1およびRUNX3は神経発生を司る転写因子であり、小児がんである神経芽腫への関与が疑われる。神経芽腫細胞株ではRUNX1/3のタンパク量は厳密に調節されており、量的攪乱は細胞死を引き起こす。本研究では、RUNX1/3のmRNA非翻訳領域(3' UTR)にタンパク翻訳阻害作用があること、がん遺伝子N-Mycにより転写誘導されるmicroRNAがRUNX1/3の3' UTR配列に結合することを発見した。該当するmicroRNAの結合配列に変異を導入すると、3' UTRのタンパク合成抑制機能が解除された。N-Mycは、microRNAを介してRUNX転写因子の量的調節を行う可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：The transcription factors RUNX1 and RUNX3 play pivotal roles in lineage commitment of dorsal root ganglion neurons. In neuroblastoma cell lines, protein levels of RUNX1/RUNX3 are maintained within a narrow range. The perturbation of the protein amount of RUNX1/RUNX3 results in cell death, suggesting the roles of RUNX proteins as tumor suppressors. In this study, we found that the 3' UTR (untranslated region) of both RUNX1/RUNX3 mRNA inhibited the protein translation. Several microRNAs, that are the transcription targets of N-Myc, were enriched in 3'UTR purification by the Streptavidin binding RNA aptamer. Mutagenesis reporter assay indicates that the miR18 or miR19 binding to 3' UTR contributes to translational inhibition of RUNX1 or RUNX3, respectively. N-Myc is one of most frequently amplified oncogenes in neuroblastoma and the data suggest that N-Myc could overcome tumor suppressor functions of RUNX1/RUNX3 through post-transcriptional regulation with microRNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：microRNA neuroblastoma RUNX1 RUNX3 N-Myc

1. 研究開始当初の背景

RUNX 転写因子(RUNX1/RUNX3)は神経芽腫細胞株でタンパク量が一定に保たれている。実験的にタンパク量を増加させると、細胞はアポトーシスを誘導するかニューロンに分化する。逆に RUNX の機能阻害を行っても細胞は増殖を維持することができない(Inoue and Ito, Gene, Vol.487, p151-155, 2011)。

RUNX は末梢ニューロンのマスター転写因子であるため(Inoue et al., Nat. Neurosci., Vol.5, p946-954, 2002)、腫瘍化の段階でタンパク量が厳密に調節されている可能性がある。

2. 研究の目的

RUNX 遺伝子が、後転写レベルでタンパク量を制御される可能性を調べた。とりわけ、mRNA の 3'UTR(非翻訳領域)に microRNA が結合して、タンパク翻訳活性を阻害する可能性に注目した。独自の生化学手法を用いて、結合 microRNA を同定することを試みた。

3. 研究の方法

- ・ウェスタンブロットティングによるタンパク量定量
- ・ヒト RUNX1/3 の 3'UTR 配列クローニング
- ・3'UTR 配列がタンパク翻訳活性を阻害する度合いを定量する、レポーターアッセイ
- ・3'UTR をストレプトアビジン結合 RNA アプタマーと融合し、結合 microRNA を生化学的に単離
- ・結合 microRNA をインフォマティクスで予測
- ・単離した microRNA を定量 RT-PCR で検出
- ・同定した microRNA がタンパク翻訳活性の阻害に及ぼす影響を、レポーター変異導入アッセイで検証

4. 研究成果

- ・RUNX1/3 のタンパク量は、プロテオソーム阻害薬の添加で変化しない。

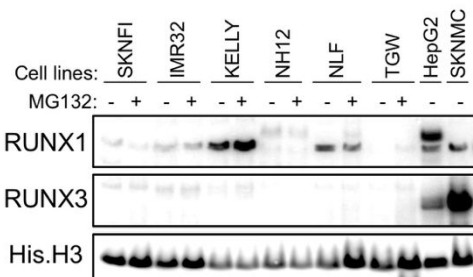
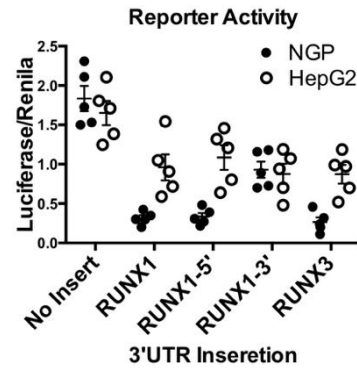


図1 プロテオソーム阻害薬 MG132 は、RUNX1/3 のタンパク合成に影響しない。

RUNX 遺伝子がタンパク分解レベルで制御される可能性を排除するため、神経芽腫細胞株をプロテオソーム阻害薬 MG132 で処理した。使用した 12 種類の神経芽腫細胞株全てで、MG132 添加によるタンパク量の変化は確認されなかった(図1)。



- ・RUNX1/3 の 3'UTR は、タンパク翻訳抑制活性を有する。

図2 RUNX1-3'UTR および RUNX3-3'UTR は、レポーター遺伝子のタンパク翻訳活性を阻害する。

RUNX1 および RUNX3 の 3'UTR をクローニングし、レポーター遺伝子に融合するプラスミドを作成した。3'UTR 配列に microRNA が結合するとき、レポーター遺伝子のタンパク翻訳活性が阻害されるため、microRNA センサーとして機能する。RUNX1-3'UTR と RUNX3-3'UTR はともに、神経芽腫細胞株 NGP でレポーター活性の阻害作用を示した(図2)。RUNX1-3'UTR は 4kbp に渡るため、前半領域(RUNX1-5')と後半領域(RUNX3-3')に分離してアッセイを行ったところ、阻害作用は RUNX1-5'に存在することが分かった(図2)。比較対象の HepG2(肝がん細胞株)でも若干の阻害効果はあったが、NGP ほど劇的ではなく、RUNX1-5'の特異的な阻害効果も見られなかった(図2)。データは、RUNX1-3'UTR の前半領域および RUNX3-3'UTR に microRNA が結合し、タンパク翻訳活性を阻害する可能性を示唆する。

- ・ストレプトアビジン結合 RNA アプタマーを用いた、microRNA の生化学的単離

ストレプトアビジン結合 RNA アプタマー配列に、レポーター抑制活性の見られた RUNX1-3'UTR (5'領域 2kbp) あるいは RUNX3-3'UTR(2.5kbp)を融合した発現プラスミドを作成した。このプラスミドを神経芽腫細胞株 NGP に強制発現し、アプタマーに融合した 3'UTR の RNA 配列をストレプトアビジン磁性ビーズで単離した。当初は、3'UTR と結合した microRNA をプライマーとし、逆転写反応を利用してクローニングする計画であったが、感度と特異性の問題で機能しないことが判明した。そこで、インフォマティクスで予想される microRNA の結合を、定量 RT-PCR で確認するアプローチに変更した。

・N-Myc 転写標的 microRNA が、RUNX1 および RUNX3 の 3'UTR に結合する。

	RUNX1UTR	RUNX3UTR
miR17	結合	結合
miR18a	結合	
miR19a		結合
miR20a	結合	結合
miR130a		結合

表 1 RUNX1 および RUNX3 の 3'UTR に結合する microRNA のリスト

インフォマティクス解析により、RUNX1 および RUNX3 遺伝子とともに、がん遺伝子 N-Myc に転写誘導される microRNA と結合することが示唆された。そこでアプタマーで単離した microRNA を配列ごとに定量したところ、表 1 に示される microRNA がそれぞれ、RUNX1 と RUNX3 の 3'UTR プルダウンで濃縮されている(結合する)ことが明らかとなった(表 1)。

・3'UTR 配列の特定箇所の変異は、タンパク翻訳抑制効果を解除する。

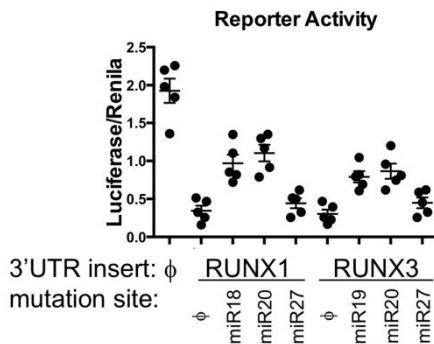


図 3 候補 microRNA 結合配列に変異を組み込むと、レポーター活性の阻害作用が解除される。

同定した microRNA の推定結合配列に変異を導入したレポータープラスミドを作成し、上記と同じアッセイを行った。RNA アプタマーで抽出された microRNA の結合配列に変異を導入すると (RUNX1:miR18, miR20, RUNX3:miR19, miR20)、タンパク翻訳活性の阻害が有意に解除された。対照的に、他の予測配列の変異(miR27)では、阻害作用の解除は観察されなかった。

・考察

本研究は当初、インフォマティクスの予測バイアスなしで 3'UTR に結合する microRNA を生化学的に単離・クローニングする計画だった。しかしながらストレプトアビジン結合アプタマーは単離効率が不十分で、バイアスなしのクローニングは実現困難であることが判明した。

神経芽腫において、MYCN 遺伝子増幅は染色体 1p36 欠損と並んで最も頻りに観察される遺伝子異常であり、予後不良を規定する。RUNX3 遺伝子は 1p36 に位置する腫瘍抑制因子の候補であり、RUNX3 が N-Myc と同時に存在するとき、N-Myc のタンパク分解を促

進することで細胞分裂を抑制する (Yu et al., *Oncogene*, Vol.33, p2601-2609, 2014)。つまり N-Myc と RUNX3 は神経芽腫の増殖をそれぞれ正と負に制御することで、患者予後を左右すると考えられている。本研究の結果は、N-Myc が microRNA を介して RUNX3 を負に制御することで、腫瘍抑制機能を克服することを示唆している。

変異導入レポーターアッセイは、結合を確認した microRNA が実際にタンパク翻訳活性の阻害に貢献することを示唆したが、これだけでは証明として十分ではない。今後の予定として、個別の microRNA の阻害実験によって RUNX1/RUNX3 タンパク量の増加、結果として細胞死や分化が誘導されることを確認する。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 9 件: 全て査読有)

Kaga K, **Inoue K(Corresponding Author, Thesis Supervisor)**, Kaga M, Ichikawa T, Yamanishi T. Expression profile of urothelial transcription factors in bladder biopsies with interstitial cystitis. *Int J Urology*. 2017 In press.

Tanaka G, **Inoue K(Equal Contribution, Thesis Supervisor)**, Shimizu T, Akimoto K, Kubota K. Dual pharmacological inhibition of glutathione and thioredoxin systems synergizes to kill colorectal carcinoma stem cells. *Cancer Med*. 2016.

[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.844/fullSep:5\(9\):2544-2557](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.844/fullSep:5(9):2544-2557).

Tago K, **Inoue K(Equal Contribution, Thesis Supervisor)**, Ouchi M, Miura Y, Kubota K. Receptor for advanced glycation endproducts signaling cascades are activated in pancreatic fibroblasts, but not in the INS1E insulinoma cell line: Are mesenchymal cells major players in chronic inflammation? *Islets*. 2016 Sep 2;8(5):135-144.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19382014.2016.1212146>

Shimizu T, **Inoue K(Equal Contribution)**, Hachiya H, Shibuya N, Aoki T, Kubota K. Accumulation of phosphorylated p62 is associated with NF-E2-related factor 2 activation in hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2016 Aug;23(8):467-471.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhbp.364/abstract;jsessionid=C9D03F5AE7EC48799F8FAE68042DF1CE.f03t03>

Kishimoto S, **Inoue K**, Nakamura S, Hattori H, Ishihara M, Sakuma M, Toyoda S, Iwaguro H, Taguchi I, Inoue T, Yoshida K. Low-molecular weight heparin protamine complex augmented the potential of adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia. *Atherosclerosis*. 2016 Jun;249:132-139.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915016301344>

Shibuya N, **Inoue K (Equal Contribution, Thesis Supervisor)**, Tanaka G, Akimoto K, Kubota K. Augmented pentose phosphate pathway plays critical roles in colorectal carcinomas. *Oncology*. 2015;88(5):309-319. <http://www.karger.com/Article/Abstract/369905>

Inoue K, Nomura H, Sohma R, Akimoto K, Kobayashi N, Kamai T, Yamanishi T, Tabuchi I, Asato H, Inoue T, Mitsumori T, Iwaguro H, Yoshida KI. Feasibility of Exploiting Celution System in Autologous Cell Therapy in Dokkyo Medical University Hospital: Safety and Reproducibility. *Dokkyo J Medical Sciences*. 2014 Mar;41(1):7-12.

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009783341>

Shimizu T, **Inoue K (Equal Contribution, Thesis Supervisor)**, Hachiya H, Shibuya N, Shimoda M, Kubota K. Frequent alteration of the protein synthesis of enzymes for glucose metabolism in hepatocellular carcinomas. *J Gastroenterol*. 2014 Sep;49(9):1324-1332.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00535-013-0895-x>

Hachiya H, Miura Y, **Inoue K**, Park KH, Takeuchi M, Kubota K. Advanced glycation end products impair glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014 Feb;21(2):134-141.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jhbp.12/abstract;jsessionid=233804348D231E6978C5A6AF279E033A.f01t01>

〔学会発表〕(計5件)

第81回日本循環器学会学術集会 ポスター発表「Synergistic cooperation of heterogeneous stromal cells for wound healing.」2017.3.17 金沢市教育プラザ此花体育館 石川県金沢市

第16回日本再生医療学会総会 ポスター発表「膀胱移行上皮マスター転写因子のスクリーニング」2017.3.9 仙台国際センター 宮城県仙台市

第15回日本再生医療学会総会 ポスター発表「尿道括約筋断裂による腹圧性尿失禁ラットモデルを用いた脂肪由来間質細胞の移植効果の検討」2016.3/19 大阪国際会議場 大阪府大阪市

第43回獨協医学会 ポスター一般演題最優秀賞「Low-molecular weight heparin protamine complex augmented the potential of adipose-derived stromal cells to ameliorate limb ischemia.」2015.12.5 獨協医科大学関湊記念ホール 栃木県下都賀郡壬生町

第14回日本再生医療学会総会 ポスター発表「脂肪由来間質細胞の創傷治療プライミング」2015.3.19 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

〔著書〕(計1件：査読有)

Shibuya N, **Inoue K**, Kubota K. Metabolic Shunt Pathways, Carcinoma, and mTOR. *Molecules to Medicine with mTOR*. Chapter26: Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027332000220>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上健一(INOUE, Ken-ichi)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90587974