

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860233

研究課題名(和文) ヒト悪性腫瘍を対象としたリボソーム遺伝子変異解析

研究課題名(英文) Ribosomal RNA gene mutation in Human Malignancies

研究代表者

大橋 瑠子(OHASHI, Riuko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20447600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はヒト悪性腫瘍におけるリボソーム遺伝子変異の有無を調べ、その臨床病理学的意義や発癌への関与を検討することである。当院呼吸器外科で切除され遺伝子解析のインフォームドコンセントを得た肺癌手術症例40例を解析対象とし、PCRダイレクトシーケンス法で遺伝子配列解析を行った。その結果、40症例中2例(5%)でリボソーム遺伝子の転写開始点近傍領域に新規の遺伝子変異が検出された。現在、症例数を増やして解析を継続中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified new somatic mutations in proximity to ribosomal RNA gene transcription start site in two cases (5%) of 40 lung cancer patients by PCR-direct sequence method. To determine the relationship between clinicopathological significance and ribosomal RNA gene mutation, sequence analysis of more patients are ongoing.

研究分野：人体病理学

キーワード：リボソーム遺伝子 LXR 肺癌 遺伝子変異 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

(1) リボソームはあらゆる原核生物と真核生物の細胞内に存在する細胞内小器官であり、mRNA の遺伝情報を読み取りタンパク質合成の場として機能する。リボソームはリボソーム RNA と数多くのリボソームタンパク質との複合体である。リボソーム生成の増加は細胞の増殖と密接に関連しており、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化がリボソーム生成に影響するとの報告が相次いでおり発癌への関与が推測されている。最近の次世代シーケンサーなどの大量ゲノムデータ取得技術の発達により、Diamond Blackfan 貧血をはじめとする種々の疾患や癌においてリボソームの構成要素であるリボソームタンパク質の遺伝子変異が次々と同定されつつあり、これらのリボソーム生成に異常を認める疾患群をまとめて「リボソーム病 ribosomopathy」と称する動きもある。しかしながらリボソーム遺伝子そのものの遺伝子配列解析の報告は、検索しうる限り Siao YH ら (PLoS One. 2009 Oct 19;4(10):e7505) によるヒト肺腺癌培養細胞株 7 株の一塩基多型 single nucleotide polymorphism の報告が 1 件あったのみで、実際にヒトで体細胞遺伝子変異を認めた症例の報告はなかった。ことに、日本人におけるリボソーム遺伝子変異の検討はこれまでに全くなかった。

(2) 一方、核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質 LXR (Liver X receptor) は専ら脂質や胆汁酸の代謝への関与が示唆されてきた転写因子であるが、申請者は、LXR が核小体に局在し、LXR がリボソーム生成に重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、リボソーム遺伝子の 18S rRNA, 28S rRNA コード領域内に LXR と結合する DNA 配列を同定した。

2. 研究の目的

リボソーム遺伝子異常が存在しリボソーム生成障害が起これば、様々な形でタンパク質合成障害を来しその結果として細胞の分化異常や分裂異常などが起こりうると思定される。

本研究の目的はヒト悪性腫瘍におけるリボソーム遺伝子変異の有無を調べ、その臨床病理学的意義や発癌への関与を検討することである。特に、LXR の結合領域として同定した 18S rRNA, 28S rRNA をコードする DNA 領域と、リボソーム遺伝子の転写に重要な役割を担っていると推定されているプロモーター領域を含む遺伝子転写開始点前後の近傍領域に着目して解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 新潟大学医歯学総合病院において 2007 年から 2010 年までに外科的切除が行われた原発性肺癌 40 症例を遺伝子解析した。なお、新潟大学医学部遺伝子倫理委員会に研究の

承認を得るとともに、遺伝子検索の本人承諾を得られた症例のみを対象とした。内訳は、平均年齢 65.6 ± 11.5 歳、男：女 = 29：11、喫煙者：非喫煙者 = 27：13、病理組織型の判定は WHO 分類 (2015) に基づいて行い、内訳は腺癌 24 例、扁平上皮癌 6 例、腺扁平上皮癌 1 例、小細胞癌 1 例、神経内分泌大細胞癌 4 例、混合型神経内分泌大細胞癌 1 例、大細胞癌 2 例、多形癌 1 例であった。ホルマリン固定パラフィン切片を用いて、腫瘍細胞が組織の 80% 以上を占める切片を選択またはマニュアルマイクロダイセクション、あるいは AS LMD Laser Capture Microdissection System (Leica, Wetzlar, Germany) を使用し腫瘍細胞を単離した上で DNA 抽出した。DNA 抽出には QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN、ドイツ) を使用した。プロモーター領域を含むリボソーム遺伝子転写開始点前後の近傍領域と、18S・28S リボソームコード領域に特異的なプライマーを設計して PCR を施行し PCR 産物は EXO-SAP-IT (Affymetrix Inc., Santa Clara, Calif., USA) にて精製、Big Dye version 3.1 kit (Applied Biosystems (ABI), Foster City, CA, USA) にて dye-terminator 反応を行い、ABI 3130 Genetic Analyzer を用いて PCR ダイレクトシーケンス法、サンガー法で DNA シークエンスを行った。

また、同様にヒトの各種悪性腫瘍の培養細胞株 24 種についても QIAamp DNA mini kit を用いて DNA 抽出ののちに PCR ダイレクトシーケンス法、サンガー法で DNA シークエンスを行った。

(2) 上記の対象遺伝子領域の解析で遺伝子変異がないことが判明したヒト肝芽腫培養細胞株 HepG2 細胞を用いて、蛍光免疫染色と免疫電顕法により LXR の核小体内の詳細な局在を検討した。蛍光免疫染色の局在マーカーとしては、核小体の外郭を形成する granular component に局在する nucleophosmin、核小体の dense fibrillar component に局在する fibrillarin を用いた。リボソーム RNA 新規転写部位の描出には *in situ* run on transcription assay と呼ばれる手法を用いた。

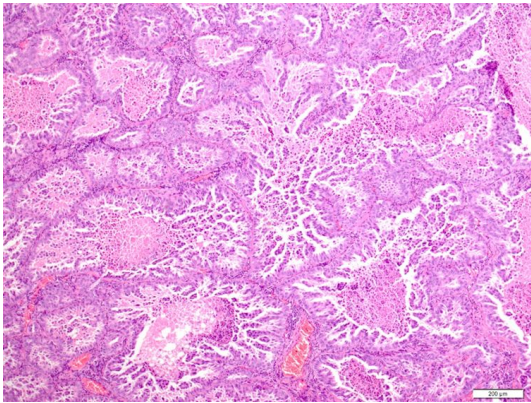
また、LXR を合成リガンドで刺激することによりリボソーム RNA 転写量に変化が起こるか否かについて、リアルタイム RT-PCR 法と RNA 干渉法による LXR のノックダウンを併用して検討した。

4. 研究成果

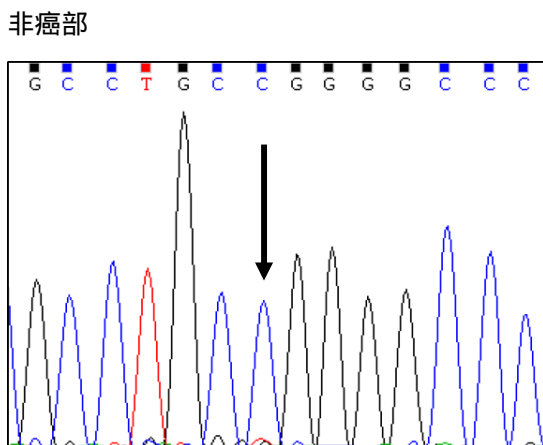
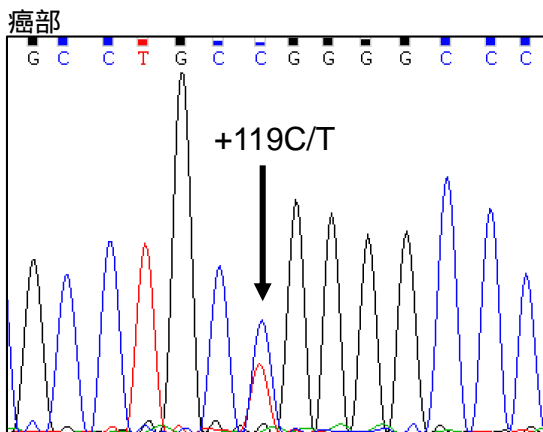
ヒト肺癌 40 症例中 2 例 (5%) で、転写開始点より下流の近傍領域においてこれまで報告のない新規の体細胞遺伝子変異が検出された。解析した腺癌症例は 24 例であるので、腺癌の中では 8.3% (2/24) の頻度であった。実際に新規遺伝子変異が同定された症例の特徴を図 1 に示す。

(図 1) 66 歳女性, 非喫煙者
 組織型 :
 Adenocarcinoma, papillary predominant
 臨床病期 : pT3N2, Stage IIIA

病理組織像 (Hematoxylin-Eosin 染色)



本症例の癌部では、リボソーム遺伝子転写開始点から 119 番目の DNA に C → T の新規の体細胞遺伝子変異を認めた。



リボソーム遺伝子変異を有した 2 症例に共通の特徴は、(1)腺癌であること、(2)乳頭状構造を認めたこと、(3)大型核小体、(4)女性、(5)いずれも非喫煙者であることの 4 点であった。

40 症例中 1 例で、正常・癌部の両方でプロ

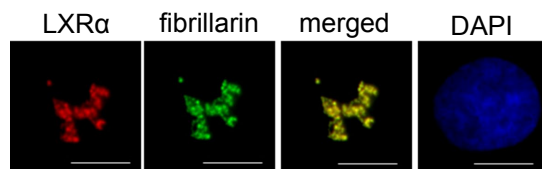
モーター領域に一塩基置換を認めた。組織型は混合型大細胞内分泌細胞癌で、腺癌と大細胞内分泌細胞癌が混合していた。解析症例数がまだ少ないのでこの一塩基置換が肺癌において発癌に意味をなす稀な生殖細胞系列変異なのか遺伝子多型なのかは確定できていない。

今後は症例数を増やして遺伝子変異と臨床病理学的因子との相関関係の有無を検討していく。

ほ乳類では、リボソーム RNA はまずリボソーム前駆体が転写されたあと RNA プロセッシング、すなわち 2 段階の酵素系列による切断とトリミングを受けて成熟し 5.8S・18S・28S リボソーム RNA となる。このプロセッシング段階では、リボソーム RNA 自体が化学反応を触媒するので「リボザイム ribozyme」と呼ばれている。さらに修飾・リボソームタンパク質との複合体形成を経て、核外へ出て「リボソーム」となる。現時点の結果で体細胞変異が見つかったのはプロモーター領域や 18S、28S rRNA コード領域ではなかったが、ノンコード領域であってもリボソーム RNA のプロセッシングに影響する可能性がある。プロセッシングがうまくいかなければ正常なリボソーム合成がなされず、結果として正常なタンパク質合成がなされないと推測される。Siao YH らの過去の報告では、個々の SNPs についての詳細な機能解析はなされていない。技術的に可能であれば、*in vivo* で同定された遺伝子変異の機能的意義について解析を行ってきたい。

(2) HepG2 細胞の蛍光二重免疫染色の結果、LXR は fibrillar in と完全一致し、核小体の dense fibrillar component に局在することが判明した (図 2)。抗 LXR 抗体を用いた免疫電顕法でも、LXR が核小体の dense fibrillar component に局在することを証明した。さらに、全 RNA 転写部位のうちリボソーム RNA だけが転写される領域のみを *in situ* run on transcription assay と *-amanitin* による RNA polymerase II, III の抑制により特異的に描出すると、リボソーム RNA の新規転写部位と LXR とが共局在することが明らかとなった。

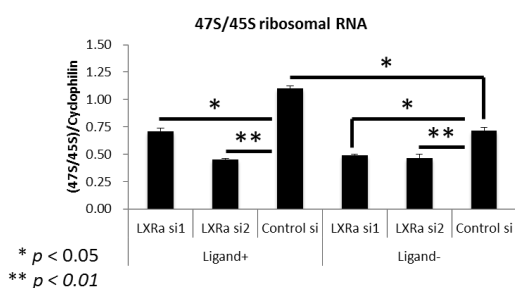
(図 2)



次に LXR に特異的な siRNA 2 種類 (LXR si1, LXR si2) を用いた RNA 干渉により LXR をノックダウンした HepG2 細胞と、コントロールの siRNA (Control si) を導入

した HepG2 細胞に、それぞれ合成リガンド T0901317 を投与して LXR を刺激する実験を行った。リガンド投与群とリガンドの代わりに低濃度 DMSO/PBS のみ投与した群との間でリボソーム RNA の前駆体である 47S/45S リボソーム RNA (47S/45S rRNA) の発現量をリアルタイム RT-PCR 法で比較定量した。Control si 導入 HepG2 細胞では、リガンド投与群において 47S/45S rRNA の有意な転写促進が観察された。しかし LXR を RNA 干渉法でノックダウンするとリガンド投与時の 47S/45S rRNA 量増加が抑制された (図 3)。

(図 3)



以上の結果から、LXR は核小体内で rRNA 転写を促進する機能を有することが示唆された。LXR は RXR とヘテロ 2 量体を形成し、脂質代謝遺伝子の転写調節をしていることが知られているが、今回の研究で施行したクロマチン免疫沈降法の結果からは、LXR は核小体ではホモ 2 量体で作用していると思われ、核内受容体の新たな転写調節様式と考えられる。今後は、ヒトの癌で観察された遺伝子変異を導入した HepG2 変異株と正常株、変異が見つかった培養細胞株を用いて、47S/45S rRNA の転写量や LXR と変異リボソーム遺伝子との結合性などについて比較検討していく。

<引用文献>

Siao YH et al. An Intergenic Non-Coding rRNA Correlated with Expression of the rRNA and Frequency of an rRNA Single Nucleotide Polymorphism in Lung Cancer Cells. 2009, 4(10):e7505

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 1 件)

(1) 大橋 瑠子、LXR の核小体への局在とリボソーム DNA 転写制御、新潟医学会雑誌、2014、128(9):447-461、査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 核内受容体 LXR の核小体への局在と

リボソーム DNA 転写制御
大橋 瑠子、梅津 哉、長谷川 剛、八神 淑英、内藤 眞、近藤 英作
第 104 回 日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大橋 瑠子 (OHASHI, Riuko)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：20447600

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし