

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15618

研究課題名(和文) RNA結合蛋白のアイソフォームに内在する食道癌促進分子スイッチの分子機序の解明

研究課題名(英文) Characterization of the esophageal carcinogenesis-promoting molecular switch existing inside the isoform of RNA-binding protein

研究代表者

井本 逸勢 (IMOTO, Issei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：30258610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合蛋白であるTIA1の食道扁平上皮癌促進作用は、セリン・スレオニンに富んだ天然変性領域を持つアイソフォームTIA1a特異的であった。TIA1a特異的領域周囲の候補リン酸化部位に変異を導入するとTIA1aの細胞内局在と細胞増殖が変化し、この領域を含むペプチドはTIA1aの細胞質局在を阻害した。CHK1がキナーゼ候補と考えられた。一方、細胞質でTIA1aと結合するmRNA候補の3'UTR上で、TIA1aが他のRNA結合蛋白と結合して共同または拮抗的に働くと考えられた。以上から、天然変性領域のリン酸化修飾が分子スイッチとなってTIA1aが細胞質に移行し、癌化促進作用を持つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：TIA1a is the isoform of TIA1, one of the RNA-binding protein (RBP), having a serine/threonine-rich intrinsically disordered region (IDR) and promoting esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Through changing amino acid of candidate phosphorylation sites around the TIA1a specific region within IDR, subcellular localization of TIA1a and cell growth were altered in ESCC cells. Blocking synthetic peptides inhibited TIA1a cytoplasmic localization. CHK1 was identified as candidate kinase contributing to TIA1a cytoplasmic localization. In addition, TIA1a bound 3'UTR of candidate TIA1a-binding mRNAs in the cytoplasm with other RBPs and regulated mRNA/protein levels of those targets jointly or competitively. These results demonstrated that the phosphorylation of specific sites within IDR may work as a molecular switch to promote cytoplasmic localization of TIA1a and accelerate its cancer-promoting function through binding and regulating target molecules in the cytoplasm of ESCC cells.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：RNA結合蛋白 TIA1 アイソフォーム 天然変性領域 蛋白リン酸化 癌促進作用 細胞内局在 分子スイッチ 分

1. 研究開始当初の背景

RNA 結合蛋白 (RBP) は、パートナー分子 (mRNA/miRNA/蛋白) と RiboCluster と呼ばれる集合体を形成し、標的 RNA のスプライシング、細胞内挙動、安定性、翻訳などを制御して生理的な mRNA の品質管理と転写後制御ネットワークの中心的役割 (ハブ) を担うと共に、様々な疾患の病態に関与する。424 種 (分類法によっては 1500 種) あるヒト RBP の多くは様々な癌で発現異常を示し、標的調節モジュール内の癌関連遺伝子群の発現異常を介して病態形成に関わるとされる。癌化パスウェイのハブの制御は、一度に多くの癌関連遺伝子に影響を及ぼし得ることから、ドライバー変異の蓄積により治療抵抗性などの悪性形質を獲得して進化していく癌に対抗するためには、RBP は格好の分子標的と言える。しかし、癌での個々の RBP の機能異常の分子機序は多くが不明である。

われわれは、RBP のひとつである TIA1 が、食道扁平上皮癌 (ESCC) の進行に伴い蛋白の発現量や細胞内局在に変化を生じ癌促進的に働くことを見出した。TIA1 には exon 5 でコードされる 11 アミノ酸を含む TIA1a とこれを欠く TIA1b の 2 種類のアイソフォームがある。この短い断片は、機能ドメイン間にあるヒンジ領域と呼ばれる機能不明の領域中に存在するが、ESCC で見られた癌特異的な細胞質局在と細胞増殖促進作用は、TIA1a にのみ認められた。ヒンジ領域は、セリン・スレオニン (Ser/Thr) に富み、「天然変性領域 (intrinsically disordered region、IDR)」と呼ばれる不安定構造を形成すると予測され、ESCC において TIA1a はヒンジ領域を含む IDR の修飾による構造変化がスイッチとなって局在が変化し、癌特異的な集合体を形成することで機能モジュール内の癌関連分子群の転写後調節を起し癌化を促進すると仮説を立てるにいたった。

2. 研究の目的

ESCC の病態形成過程において、TIA1a のアイソフォーム特異的な癌促進作用の鍵となるヒンジ領域を含む IDR が受ける分子修飾とその修飾因子、その結果起こる TIA1a の細胞内局在変化の機序、細胞質内で集合体を作るパートナー分子群とその調節標的 mRNA・機能モジュール群、さらに各機能モジュールと表現型との関連を調べることで、癌化パスウェイでの TIA1a に内在する分子スイッチの分子機構の全容を解明することを目的とする。さらに、解明された機序の各レベルでの機能障害による ESCC 細胞や非癌細胞への影響を比較検討することで、TIA1a に内在する分子スイッチ制御に着目した新規 ESCC 治療法の開発に繋げる。

3. 研究の方法

(1)TIA1a アイソフォームの分子スイッチ機構の解明: TIA1 のヒンジ領域の有無により

ESCC で細胞内局在が変化する機序を解明し、これを標的とする治療法を検討する。

ヒンジ領域周囲の Ser/Thr のリン酸化による立体構造変化が調節複合体により認識され局在の調節を受ける機序の存在が予測される (図 1)。細胞分画毎のウエスタンと細胞染色やタイムラプス観察で細胞株の内因性および強制発現 TIA1a の局在を見る系を用い、キナーゼ阻害剤及び siRNA パネルでのスクリーニングと各 Ser/Thr のリン酸化・非リン酸化状態を模倣する組換え蛋白発現から、キナーゼ同定と修飾点確認を行う。

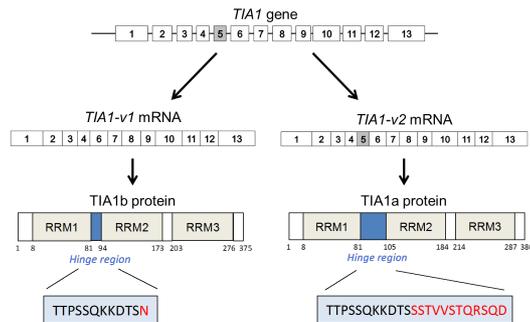


図1 TIAのアイソフォームの構造

ヒンジ領域配列を含む合成ペプチドによる細胞内局在に働く相互作用因子のブロックや RiboCluster での相互作用部位を標的にしたペプチドでの集合体形成のブロックの作用を検討する。

(2)TIA1a の細胞質での癌促進性転写後調節作用の分子機序解明: TIA1a の標的 mRNA 群で構成される機能モジュール群、集合体内のパートナー分子、および相互作用分子とその部位の同定により TIA1a の癌促進作用の分子機構を解明し、その治療法を検討する。

TIA1 または TIA1a での RNA 結合蛋白免疫沈降 (RIP) -seq アッセイで TIA1a が結合する標的 mRNA や相互作用 miRNA を同定する。CLIP (crosslinking immunoprecipitation) や PAR ((Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced)-CLIP) などのクロスリンクを併用する方法を用いることで標的 mRNA を網羅的に同定し、パスウェイ解析により標的遺伝子群で構成機能モジュール群を決定する。

TIA1 は、mRNA の 3' UTR 内の A、U に富む ARE 配列を認識モチーフとすることが知られているが、申請者らは予備検討でこの配列が無い 3' UTR 以外の領域にも TIA1 が結合することを見出している。このため、in vitro 結合アッセイで、各標的の部分 RNA 断片への TIA1a の結合の有無を見ると共に、クロスリンク後 RNaseT で処理して蛋白との結合により消化されない部分を単離し次世代シーケンサーで配列を決定して、新規 TIA1 認識モチーフを同定する。

4. 研究成果

(1)TIA1a アイソフォームの分子スイッチ機構の解明

細胞質への局在の増加を伴う TIA1 蛋白発現量の増加は、ESCC 以外に子宮頸癌でも確認された。

強制発現させた TIA1a のリン酸化の程度を、未処理、Doxorubicin 処理、Arsenite 処理の各群で、細胞質分画と核分画にわけた Phos-tag SDS-PAGE で検討すると、いずれの群でも細胞質でよりリン酸化が進んでいた。TIA1a 特異的な IDR を形成する 11 アミノ酸を含むヒンジ領域周囲で、リン酸化の部位を複数の予測プログラムを用いて解析すると、4 部位が候補となった。4 部位の Ser/Thr を全て Aspartic acid (D) に変えたリン酸化型変異体ではより細胞質への局在が認められ、細胞増殖促進作用も野生型 (WT) と差がなかった。一方、4 部位の Ser/Thr を全て Alanine (A) に変えた非リン酸化型変異体ではより細胞質への局在が抑制され、細胞増殖作用は WT と比べても抑制されていた (図 2)。このこと

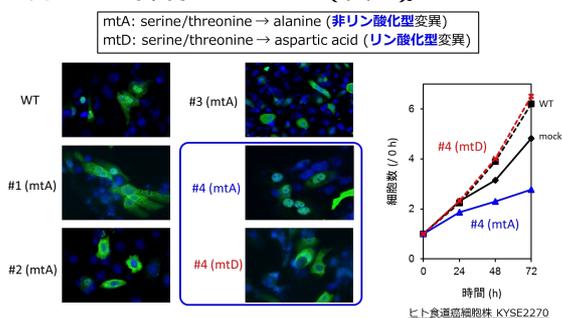


図2 変異型TIA1aの細胞内局在と細胞増殖に及ぼす影響

から、4 つのうちいくつかの部位のリン酸化状態が、細胞内局在と細胞増殖促進作用に関与していると考えられた。

また、キナーゼ阻害剤や siRNA でのノックダウン (KD) により、TIA1a の細胞質内局在を抑制するリン酸化酵素候補を探索した結果、CHK1 をノックダウンした時のみ TIA1a は細胞質から核に移行し、阻害剤でも同様の所見が認められたことから CHK1 が局在調節に関わる可能性が高いと考えられた。

ヒンジ領域配列を含む合成ペプチドによる細胞内局在に働く相互作用因子のブロックにより局在の一時的な変化が観察された (図 3)。同じペプチド処理により、細胞増殖への影響は確認されなかったが、これは効果時間が短かったためと考えられ、さらにペプチドの配列や構造の修飾が必要と考えられた。

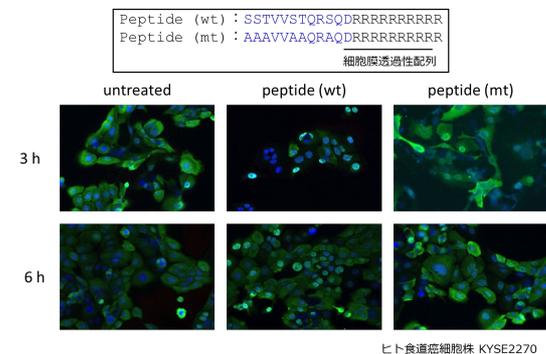


図3 ヒンジ領域を標的にした低分子ペプチドの効果

(2) TIA1a の細胞質での癌促進性転写後調節作用の分子機序解明

RIP-seq アッセイで TIA1a が結合する複数の標的 mRNA または相互作用 miRNA 候補を同定できた。さらに、候補 mRNA に関して、TIA1 の強制発現細胞株あるいは KD 処理による発現量の変化を確認することにより、調節標的を絞り込んだ (投稿準備中)。CLIP や PAR-CLIP を用いてもバックグラウンドの低下は得られなかった。

一方、相互作用蛋白は、通常の免疫沈降では TIA1a 特異的な候補が得られなかったが、Halo タグ付加組み換え蛋白を用いて特異性を高めた結果、複数の RBP が候補として得られた。これらの結合は RNaseT1 処理を行うことで解離したことから、TIA1a と他の RBP は RNA を介しての間接的相互作用による複合体形成を行うことが示唆された。しかし、これら RBP と TIA1a の共局在や、これら RBP の癌部での発現と病態との関係は明らかでなかった。相互作用 RBP の中の 1 つの HuR は、TIA1a と共通の mRNA (CCNA2, SKP2, CDK6, 等) と結合することが確認された。

得られた候補標的 mRNA の 5' UTR、Open reading frame (ORF)、3' UTR の各領域全体ならびに分割した RNA を in vitro で合成し、in vitro pull-down アッセイで結合部位を決定した。共同あるいは拮抗的に働きる HuR を含む複数の RBP の TIA1a 近傍への結合が確認できるとともに、結合領域の予測プログラムでも重複した配列が同定された。

一方、HuR と TIA1 の一方または両方を KD すると、CCNA2, SKP2, CDK6, 等の mRNA ならびに蛋白レベルでの発現量の増加あるいは減少するが確認され、TIA1 と HuR が相補的あるいは排他的にこれらの分子の活性を調節していることが確認され、クロストークによる調節機構の破綻が癌の進展に関連することが示唆された。

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)

[雑誌論文](計 20 件)

Tokaji N, Ito H, Kohmoto T, Naruto T, Takahashi R, Goji A, Mori M, Toda Y, Saito M, Tange S, Masuda K, Kagami S, Imoto I. A rare male patient with classic Rett syndrome caused by MeCP2_e1 mutation. Am J Med Genet A. 2018;176(3):699-702. 査読有, doi: 10.1002/ajmg.a.38595.

Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, Masuda K, Susumu N, Tsuda H, Aoki D. Prevalence of pathogenic germline variants detected by multigene sequencing in unselected Japanese patients with ovarian cancer.

- Oncotarget. 2017;8:112258-112267. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.22733. Fujita Y, Masuda K, Hamada J, Shoda K, Naruto T, Hamada S, Miyakami Y, Kohmoto T, Watanabe M, Takahashi R, Tange S, Saito M, Kudo Y, Fujiwara H, Ichikawa D, Tangoku A, Otsuji E, Imoto I. KH-type splicing regulatory protein is involved in esophageal squamous cell carcinoma progression. *Oncotarget*. 2017;8:101130-101145. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.20926.
- Kajiura K, Takizawa H, Morimoto Y, Masuda K, Tsuboi M, Kishibuchi R, Wusiman N, Sawada T, Kawakita N, Toba H, Yoshida M, Kawakami Y, Naruto T, Imoto I, Tangoku A, Kondo K. Frequent silencing of RASSF1A by DNA methylation in thymic neuroendocrine tumours. *Lung Cancer*. 2017;111:116-123. 査読有, doi: 10.1016/j.lungcan.2017.05.019.
- Okamoto N, Kohmoto T, Naruto T, Masuda K, Komori T, Imoto I. Novel CLCN7 compound heterozygous mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Genome Var*. 2017;4:17036. 査読有, doi: 10.1038/hgv.2017.36.
- Okada A, Kohmoto T, Naruto T, Yokota I, Kotani M, Shimada A, Miyamoto Y, Takahashi R, Goji A, Masuda K, Kagami S, Imoto I. The first Japanese patient with mandibular hypoplasia, deafness, progeroid features and lipodystrophy (MDPL) diagnosed via POLD1 mutation detection. *Hum Genome Var*. 2017;4:17031. 査読有, doi:10.1038/hgv/2017.37.
- Kohmoto T, Masuda K, Naruto T, Tange S, Shoda K, Hamada J, Saito M, Ichikawa D, Tajima A, Otsuji E, Imoto I. Construction of a combinatorial pipeline using two somatic variant calling methods for whole exome sequence data of gastric cancer. *J Med Invest*. 2017;64(3,4):223-240. 査読有, doi: 10.2152/jmi.64.233.
- Kohmoto T, Okamoto N, Naruto T, Murata C, Ouchi Y, Fujita N, Inagaki H, Satomura S, Okamoto N, Saito M, Masuda K, Kurahashi H, Imoto I. A case with concurrent duplication, triplication, and uniparental isodisomy at 1q42.12-qter supporting microhomology-mediated break-induced replication model for replicative rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2017;10:15. 査読有, doi: 10.1186/s13039-017-0316-6.
- Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, Masuda K, Hiramoto H, Hamada J, Arita T, Konishi H, Kosuga T, Komatsu S, Shinozaki A, Okamoto K, Imoto I, Otsuji E. Clinical utility of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in patients with gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8(17):28796-28804. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.15675.
- Kohmoto T, Naruto T, Watanabe M, Fujita Y, Ujiro S, Okamoto N, Horikawa H, Masuda K, Imoto I. A 590 kb deletion caused by non-allelic homologous recombination between two LINE-1 elements in a patient with mesomelia-synostosis syndrome. *Am J Med Genet A*. 2017;173(4):1082-1086. 査読有, doi: 10.1002/ajmg.a.38122.
- Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, Masuda K, Hiramoto H, Hamada J, Arita T, Konishi H, Komatsu S, Shinozaki A, Kakiyama N, Okamoto K, Taniguchi H, Imoto I, Otsuji E. Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2017;20:126-135. 査読有, doi: 10.1007/s10120-016-0599-z.
- Kajiura K, Masuda K, Naruto T, Kohmoto T, Watanabe M, Tsuboi M, Takizawa H, Kondo K, Tangoku A, Imoto I. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor TRIM58 by promoter methylation in early-stage lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(2):2890-2905. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.13761.
- Okamoto N, Watanabe M, Naruto T, Matsuda K, Kohmoto T, Saito M, Masuda K, Imoto I. Genome-first approach diagnosed Cabezas syndrome via novel CUL4B mutation detection. *Hum Genome Var*. 2017;4:16045. 査読有, doi: 10.1038/hgv.2016.45.
- Mitsui S, Yasue A, Masuda K, Naruto T, Minegishi Y, Oyadomari S, Noji S, Imoto I, Tanaka E. Novel human mutation and CRISPR/Cas genome-edited mice reveal importance of C-terminal domain of MSX1 in tooth and palate development. *Sci Rep*. 2016;6:38398. 査読有, doi: 10.1038/srep38398.25.
- Watanabe M, Nakagawa R, Kohmoto T, Naruto T, Suga K, Goji A, Horikawa H, Masuda K, Kagami S, Imoto I. Exome-first approach identified a novel gloss deletion associated with Lowe syndrome. *Hum Genome Var*. 2016;3:16037 査読有, doi: 10.1038/hgv.2016.37.
- Watanabe M, Nakagawa R, Naruto T, Kohmoto T, Suga K, Goji A, Kagami S, Masuda K, Imoto I. A novel missense mutation of COL5A2 in a patient with

Ehlers-Danlos syndrome. Hum Genome Var. 2016;3:16030. 査読有, doi: 10.1038/hgv.2016.3035.
Watanabe M, Hayabuchi Y, Ono A, Naruto T, Horikawa H, Kohmoto T, Masuda K, Nakagawa R, Hiromichi Ito H, Kagami S, Imoto I. Detection of 1p36 deletion by clinical exome-first diagnostic approach. Hum Genome Var. 2016;3:16006. 査読有, doi: 10.1038/hgv.2016.6.
Hamada J, Shoda K, Masuda K, Fujita Y, Naruto T, Kohmoto T, Miyakami Y, Watanabe M, Kudo Y, Fujiwara H, Ichikawa D, Otsuji E, Imoto I. Tumor-promoting function and prognostic significance of the RNA-binding protein T-cell intracellular antigen-1 in esophageal squamous cell carcinoma. Oncotarget. 2016;7:17111-17128. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.7937.
Kohmoto T, Shono M, Naruto T, Watanabe M, Suga K, Nakagawa R, Kagami S, Masuda K, Imoto I. A novel frameshift mutation of CHD7 in a Japanese patient with CHARGE syndrome. Hum Genome Var. 2016;3:16004. 査読有, doi: 10.1038/hgv.2016.4.
Kohmoto T, Tsuji A, Morita K, Naruto T, Masuda K, Kashimada K, Enomoto K, Morio T, Harada H, Imoto I. A novel COL11A1 missense mutation in siblings with non-ocular Stickler syndrome. Hum Genome Var. 2016;3:16003. 査読有, doi: 10.1038/hgv.2016.3.

[学会発表](計15件)

井本逸勢, 成人領域のゲノム医療の社会実装が小児遺伝に与える影響と課題ーがんゲノム医療を中心にー、第40回日本小児遺伝学会学術集会、2018/01/12、慶應大学三田キャンパス北館(東京都港区)
井本逸勢, がんの Precision Medicine とがんゲノム医療、第15回日本乳癌学会近畿地方会、2017/12/16、メルパルク京都(京都府京都市)
井本逸勢, 藤田悠司、河本知大、丹下正一郎、増田清土、RNA結合蛋白質 MRF1 による癌関連 miRNA 発現異常を介した癌促進機構、2017/9/29、第76回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Tange S, Masuda K, Kohmoto T, Tajima A, Imoto I. Identification of CPIG7.2 as a candidate for triple-negative breast cancer-associated gene through pan-cancer analysis、第76回日本癌学会学術総会、2017/9/28、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Kohmoto T, Masuda K, Shoda K, Tange S, Imoto I. Identification of novel tumor-promoting gene, OEGC1, as a

putative prognosticator for gastric cancer、2017/9/28、第76回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Masuda K, Hamada J, Fujita Y, Shoda K, Kohmoto T, Tange S, Imoto I. Functional modification of TIA1 could be a potential therapeutic target for esophageal squamous cell carcinoma、第76回日本癌学会学術総会、2017/9/28、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
井本逸勢、がん・遺伝疾患の臨床ゲノム解析の現場、NGS 現場の会第五回研究会、2017/5/23、仙台国際センター展示棟(宮城県仙台市)
Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami T, Susumu N, Tsuda H, Aoki D. The contribution of deleterious germ-line mutations of susceptibility. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017、2017/4/4、Washington DC (USA)
Kohmoto T, Kajiura K, Naruto T, Masuda K, Kondo K, Tangoku A, Imoto I. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor TSLAC1 by promoter methylation in early stage lung adenocarcinoma、The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics、2016/10/21、Vancouver (Canada)
Imoto I, Naruto T, Kohmoto T, Watanabe M, Ujiro S, Masuda K. Long interspersed nuclear element-1 (LINE1)-mediated 8q13 microdeletion detected in a Japanese case with mesomelia-synostoses syndrome、The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics、2016/10/20、Vancouver (Canada)
井本逸勢、がん体細胞変異検出の特性からみた検査の考え方、第23回日本遺伝子診療学会大会、2016/10/8、イイノホール&カンファレンスセンター(東京都千代田区)
成戸卓也、梶浦耕一郎、増田清土、近藤和也、丹黒章、井本逸勢、肺腺癌の早期からDNAメチル化により高頻度に発現抑制を受ける新規癌抑制遺伝子候補 TSLAC1 の同定、第75回日本癌学会学術総会、2016/10/8、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
増田清土、濱田隼一、庄田勝俊、藤田悠司、井本逸勢、RNA結合蛋白質 TIA1 による食道癌進展機構の解明、第75回日本癌学会学術総会、2016/10/7、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
藤田悠司、増田清土、井本逸勢、新規 RNA結合蛋白質 MRF1 は癌関連 microRNA 発現以上を誘導し食道癌の進展を促進する、第75回日本癌学会学術総会、2016/10/7、パ

シフィコ横浜（神奈川県横浜市）
庄田勝俊、市川大輔、藤田悠司、増田清土、
濱田隼一、有田智洋、小西博貴、小松周平、
塩崎敦、岡本和真、井本逸勢、大辻英吾、
EBV 関連胃癌患者における遊離 DNA の有用
性の検討、第 75 回日本癌学会学術総会、
2016/10/7、パシフィコ横浜（神奈川県横
浜市）

〔その他〕
ホームページ

徳島大学医学部人類遺伝学分野
<http://jiniden.ait231.tokushima-u.ac.jp/web/>
徳島大学医学部人類遺伝学分野
<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/jinruiiden/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井本 逸勢 (IMOTO, Issei)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：30258610

(2) 連携研究者

増田 清士 (MASUDA, Kiyoshi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：00457318

大辻 英吾 (OTSUJI, Eigo)
京都府立医科大学・医学（系）研究科・教授
研究者番号：20244600

丹黒 章 (TANGOKU, Akira)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：10197593