

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590403

研究課題名 (和文) 癌のテロメアパラドクス解明に向けた hnRNP A2/B1 蛋白の比較解析

研究課題名 (英文) Comparative analysis of hnRNP A2/B1 isoform proteins to clarify the telomeric paradox in cancer cells

研究代表者

菅間 博 (KAMMA HIROSHI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：10195191

研究成果の概要：

癌のテロメアパラドクスの解明に向けて、hnRNP A2、B1、B0 蛋白の比較解析を行った。B1 蛋白は A2 蛋白に比べ、癌細胞で発現が亢進するが、癌細胞の中でも特に、テロメラーゼによらないテロメア伸長 (ALT) を示す癌細胞でより高い事を示した。B1 と B0 蛋白は、より特異的に一本鎖テロメア DNA と結合することを示した。各蛋白間の差は、そのアミノ酸構造とユビキチン化による蛋白代謝の差によって生じる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験医学

キーワード：癌、テロメア、hnRNP A2/B1、核酸、病理学、生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞が細胞老化を回避し無限に増殖するには、細胞分裂毎に短縮するテロメアを伸長するテロメラーゼをもつことが必須と考えられる。しかし、臨床例では癌の約 15%はテロメラーゼ活性が低い、ないし陰性で、テロメラーゼのみで癌細胞のテロメア長は説明できない。また、テロメラーゼによらないテロメア伸長 (Alternative lengthening of telomeres: ALT) 機構も知られている。癌細胞はテロメラーゼ陽性

であってもテロメアは短く、生理的にテロメラーゼ活性をもつ生殖細胞とは異なる (癌のテロメアパラドクス)。

heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (以下 hnRNP) A2 蛋白と hnRNP B1 蛋白は、転写後の pre-mRNA に結合する核内蛋白で、両者は同一遺伝子に由来するスプライシング・アイソフォームである。これまで我々は、hnRNP A2 および B1 蛋白に特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し、hnRNP B1 蛋白が hnRNP A2 蛋

白より腫瘍特異的に発現亢進することを明らかにしてきた。さらに、生殖細胞に特異的なスプライシング・アイソフォーム、hnRNP B0 蛋白をクローニングし、hnRNP B0 蛋白と B1 蛋白が hnRNP A2 蛋白より強く一本鎖テロメア DNA に結合し、テロメア DNA 保護とテロメア伸長反応の促進に関わることを明らかにしてきた。以上から hnRNP A2、B1、B0 各蛋白のテロメア調節機構との関わりを比較解析することにより、癌のテロメアパドックスを解明する手がかりが得られるのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

hnRNP A2、B1、B0 蛋白の比較解析を行うことにより、癌のテロメア調節機構と生殖細胞の生理的テロメア調節機構の違い(癌のテロメアパドックス)を明らかにする。具体的には、(1) hnRNP A2 蛋白より hnRNP B1 蛋白が腫瘍に、また hnRNP B0 蛋白が精巣に特異的に発現されるメカニズム、(2) hnRNP A2、B1、B0 蛋白とテロメア DNA との相互作用の違い、(3) hnRNP A2、B1、B0 蛋白の ALT 機構によるテロメア伸長への関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) hnRNP A2、B1、B0 蛋白発現の細胞特異性(腫瘍・生殖細胞特異性)の解析

①hnRNP B0 蛋白特異的に反応するモノクローナル抗体(抗 B0 抗体)作成を試みた。  
②抗 A2 および抗 B1 モノクローナル抗体と、上記①の抗 B0 抗体を用いて、各蛋白発現の細胞特異性(腫瘍・生殖細胞特異性)を免疫組織化学ならびにウエスタン・ブロッティングにより比較解析した。

(2) 腫瘍細胞における一本鎖テロメア DNA と相互作用する蛋白の比較解析

①テロメラーゼを有する HeLa 細胞と 293 細胞の核内蛋白を抽出し、アイソトープラベルしたテロメア配列オリゴ DNA を用いて、2 次元電気泳動 South-Western ブロッティングにて解析した。  
②テロメラーゼによらないテロメア伸長(ALT)を示すモデル細胞として、副腎癌由来の細胞株である H295R 細胞を用い、その核内蛋白を抽出し同様に解析した。

(3) hnRNP A2、B1、B0 蛋白の生化学的特性的比較解析

①各蛋白の半減期(代謝)を、S35 で蛋白ラベルした培養癌細胞から抗 A2 および抗 B1 モノクローナル抗体を用いて免疫沈降し、比較解析した。

②各蛋白の翻訳後修飾の差異を同調培養した癌細胞検体から、同様に免疫沈降後、2 次元電気泳動、抗リン酸化アミノ酸抗体、抗ユビキチン抗体を用いて比較解析した。

(4) hnRNP A2、B1、B0 蛋白とテロメア DNA との相互作用の比較解析

①各蛋白の cDNA を Pet-11 発現ベクターを用いて大腸菌に導入し、組換え蛋白を合成、精製した。  
②各組換え蛋白と一本鎖テロメア DNA との相互作用をゲルシフト(gel-retardation)にて比較解析した。

## 4. 研究成果

(1) hnRNP A2、B1、B0 蛋白発現の細胞特異性(腫瘍・生殖細胞特異性)の解析

①図1に示す如く、B0 蛋白で欠失する Exon9 の前後にまたがるペプチド(B0 特異的ペプチド)を合成し、これを用いてマウスを免疫し、抗ペプチド・モノクローナル抗体の作成を3度試みた。しかし、マウス血清中に hnRNP B0 蛋白に対する抗体価は上昇せず、抗 B0 モノクローナル抗体は得られなかった。

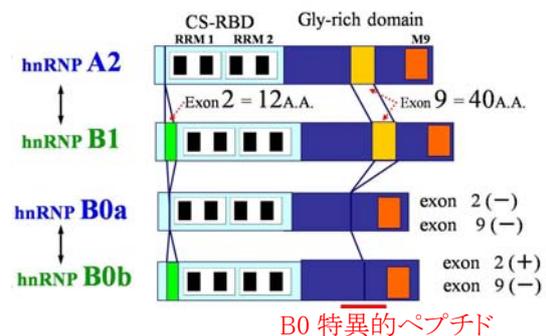


図1 hnRNP A2、B1、B0 蛋白の構造と B0 (B0a、B0b) 特異的なペプチド設計

②種々の腫瘍組織で hnRNP B1 蛋白が hnRNP A2 蛋白より発現亢進することを再検証した。さらに、同一細胞起源の良性、悪性腫瘍での発現の差を明らかにするために、大腸の Cancer in adenoma を用いた検討を行った。図2に示すように、hnRNP B1 蛋白の発現は癌で腺腫に比べより著明に亢進し、免疫染色上は、癌と腺腫の境界が明瞭であった。このことはウエスタン・ブロットによる定量的な解析においても確認された。hnRNP B1 蛋白の発現を病理組織標本における良悪性の判定にも有用と考えられる。精巣における B0 蛋白発現は抗 B0 抗体が得られなかった為、解析できなかった。また、以前の結果と同様に hnRNP B1 蛋白が精母細胞の減数分裂の過程で豊富に発現され、hnRNP A2 蛋白よりダイナミックに変

化することがしめされた。

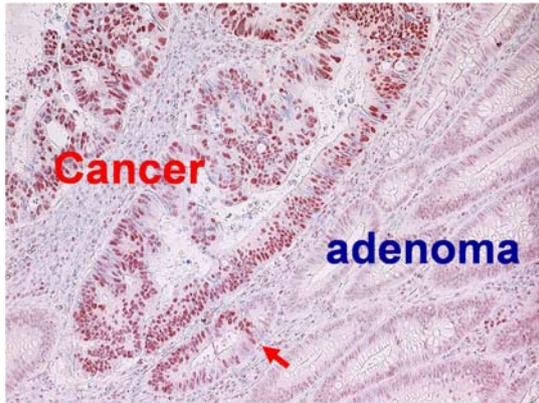


図1大腸の Cancer in adenoma における hnRNP B1 蛋白の発現(抗 B1 抗体を用いた免疫染色。矢印は癌と腺腫の境界部)

### (2) 腫瘍細胞における一本鎖テロメア DNA と相互作用する蛋白の比較解析

テロメラーゼを有する HeLa 細胞と 293 細胞では、一本鎖テロメア DNA と結合する主要な核内蛋白は hnRNPA2 であった(図 3)。一方、ALT を行う H295R 細胞では、hnRNP B1 蛋白の発現が豊富で、一本鎖テロメア DNA と優位に結合することが明らかになった。また、検出された hnRNPA2 および B1 蛋白には、等電点が酸性で、分子量のやや大きな位置に数個スポットが飛び石状にみられた。hnRNP A2 および B1 蛋白が何らかの修飾を受け、等電と分子量が変位したと考えられる。

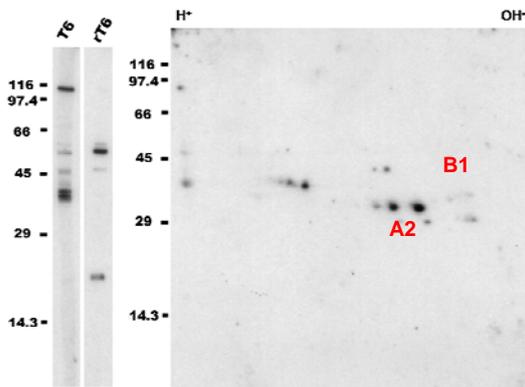


図3一本鎖テロメア DNA と結合する HeLa 細胞の核内蛋白の一次元ならびに二次元 South-Western ブロッキング (T6: (TTAGGG)<sub>6</sub>, rT6: (CCCTAA)<sub>6</sub>)

### (3) hnRNP A2/B1 各蛋白分子の生化学的特性の比較解析

①hnRNPA2/B1 蛋白は hnRNPA2 蛋白に比べ、蛋白の半減期が短く、細胞周期に同調して分解される機序があることが、HeLa 細胞を用いた

検討より明らかになった。

②二次元電気泳動により検出される hnRNPA2 および B1 蛋白の変位スポットは、主にユビキチン化によって生じる可能性が高いこと、それは両蛋白間で差があることが明らかになった。ユビキチン化は、hnRNP B1 蛋白に特異的な N 末端の 12 アミノ酸中の 3 個のリジン残基に関連していると考えられる。

### (4) hnRNP A2、B1、B0 蛋白とテロメア DNA との相互作用の比較解析

組換え hnRNP A2、B1、B0 (B0a, B0b) 蛋白を作成し、一本鎖テロメア DNA との相互作用を検討した。一本鎖テロメア DNA は 4 種の蛋白とも相互作用し、ゲル中の泳動がシフト(遅延)し、さらに特異抗体(抗 A2 抗体=4G8、抗 B1 抗体=2B2)を作用させることにより、スーパーシフトした(図 4)。その作用は hnRNP A2、B0a 蛋白より hnRNP B1、B0b 蛋白の方が強く、B1 蛋白特異的な N 末端の 12 アミノ酸(エキソン2)が、一本鎖テロメア DNA と特異的に結合することが示唆された。また、一本鎖テロメア DNA との相互作用には、2 量体形成が必要であり、興味深いことに 4 種の蛋白(hnRNP A2、B1、B0a、B0b)の組合せパターンにより相互作用に違いが生じる可能性が示唆された(データ未提示)。

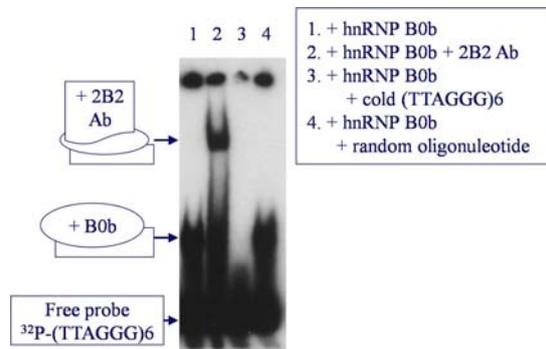


図4一本鎖テロメア DNA <sup>32</sup>P-(TTAGGG)<sub>6</sub> と組換え hnRNP B0b 蛋白との相互作用 (gel-retardation 解析)

\*癌細胞で発現亢進する hnRNP B1 蛋白と、生殖細胞に特異的に発現される B0 蛋白の比較により、癌細胞と生殖細胞のテロメア維持機構の違いを明らかにすることが当初の主眼であった。しかし、抗 B0 蛋白に対するモノクローナル抗体が得られなかったため、計画を一部変更して研究を行った。

今回の成果が、将来の癌のテロメア調節機構に着目した新たな抗癌治療法の開発に役立つことを期待したい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

- ① Hirano K, Shishido-Hara Y, Kitazawa A, Kojima K, Sumiishi A, Umino M, Kikuchi F, Sakamoto A, Fujioka Y, Kamma H : Expression of stem cell factor (SCF), a KIT ligand, in gastrointestinal stromal tumors (GIST): A potential marker for tumor proliferation. *Pathol Res Pract.* 204: 799-807, 2008. 査読有り
- ② Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, Yano Y, Shishido-Hara Y, Fujioka Y & Kamma H: Decreased expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in poorly-differentiated carcinoma of the thyroid. *Oncol Rep.* 19: 1405-1411, 2008. 査読有り
- ③ Matsumoto M, Sakamoto A, Fujiwara M, Yano Y, Shishido-Hara Y, Fujioka Y, Kamma H: Cyclic AMP-mediated growth suppression and MAPK phosphorylation in thyroid papillary carcinoma cells. *Molr Med Rep.* 1: 245-249, 2008. 査読有り
- ④ 菅間博 甲状腺低分化癌の組織所見のコンセンサス 病理と臨床 26(2): 629-636, 2008. 査読無し
- ⑤ 菅間博: 甲状腺低分化癌の組織所見のコンセンサス. 病理と臨床 26(2): 629-636, 2008. 査読有り
- ⑥ 菅間博, 中山英里, 宍戸-原由紀子: 癌前駆病変としての乳管内増殖性病変- WHO 分類の立場からの解説-. 診断病理25: 57-63, 2008. 査読有り
- ⑦ Yano Y, Kamma H, Matsumoto H, Fujiwara M, Bando H, Hara H, Yashiro T, Ueno E, Ito K, Uchida K. Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylcyclase activator. *Oncol Rep.* 18(2): 441-445, 2007. 査読有り
- ⑧ Uemaetomari I, Tabuchi K, Tobita T, Tsuji S, Wada T, Kamma H, Hara A. The importance of postoperative radiotherapy against polymorphous low-grade adenocarcinoma of the parotid gland: case report and review of the literature. *Tohoku J Exp Med.* 211(3): 297-302, 2007. 査読有り
- ⑨ Sundararajan S, Tohno E, Kamma H, Ueno E, Minami M. Role of ultrasonography and MRI in the detection of wide intraductal component of invasive breast cancer - a prospective study. *Clin Radiol.* 62(3): 252-61, 2007. 査読有り
- ⑩ 菅間博 寺戸 雄一 藤原 正親 WHO乳癌

組織分類とわが国の乳癌取扱い規約分類の相違点 臨床検査: 51(1) 23-29, 2007. 査読有り

- ⑪ 小柏 靖直, 甲能 直幸, 菅間 博 舌根部神経鞘腫例 耳鼻咽喉科臨床: 100(2), 84-85. 2007. 査読有り

[学会発表](計 3 件)

- ① 菅間博, 牛尾浩樹, 田中秀行, 深澤政勝, 松本裕文, 坂本穆彦「過形成濾胞を包含する甲状腺髄様癌の一例 - 混合性髄様・濾胞細胞癌“Hostage”仮説について-」第40回日本甲状腺外科学会、東京、2007年10月18-19日
- ② 菅間博, 藤原正親, 原由紀子, 坂本 穆彦, 木村伯子「腎盂癌に合併した微小パラガングリオーマの一例」第11回日本内分泌病理学会、札幌、2007年10月19日-20日
- ③ 菅間 博, 水谷 奈津子(杏林大学・医学部・病理): スライドセミナー Case 5(乳腺) 第47回日本臨床細胞学会秋季大会. 東京 2008年11月15日

[図書](計 2 件)

- ① 菅間博 医学大辞典 代2版(伊藤・井村・高久 編)・(分担)「病理、細胞診」事項のアップデート他. 医学書院、東京・2008.
- ② ルービン カラー病理学Q&A 第21章 内分泌系、第22章 糖尿病、第23章 アミロイドーシス 坂本穆彦 監訳 丸善, 東京, 289-313, 2007.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅間 博 (KAMMA HIROSHI)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10195191

### (2) 研究分担者(2007年)

藤原 正親 (FUJIWARA MASACHIKA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 20407026

### (3) 連携研究者(2008年)

藤原 正親 (FUJIWARA MASACHIKA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 20407026