

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：84409
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2012～2014
課題番号：24590459
研究課題名(和文)ミトコンドリアDループDNA/RNAの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of mitochondria D-loop DNA/RNA

研究代表者

富田 裕彦 (Tomita, Yasuhiko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：60263266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞のミトコンドリア遺伝子発現パターンが血清添付培養と無血清培養とで異なるのではないかとの仮説のもとに検討を行った。In situ hybridizationやPCR法を用いて検討した結果、明らかな違いを見出せなかった。転移と密接に関与するValosin containing protein (VCP)と結合するubiquitin like 4A (UBL4A)が細胞増殖の重要なシグナルであるSTAT3シグナルに対し核内で抑制的に働くことを見出した。膵癌発生母地として膵臓の線維化、炎症細胞浸潤があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the distribution pattern of mitochondrial DNA and RNA in cultured cells, in situ hybridization and polymerase chain reaction was performed. However no distinct observation was obtained. Ubiquitin like 4A (UBL4A) is a cofactor of valosin containing protein (VCP), which is associated with cancer metastasis. Inhibitory effect of UBL4A in STAT signaling was found. Chronic inflammation with steatosis of the pancreas appears to be an important predisposing factor for pancreatic cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：ミトコンドリア VCP UBL4A 発癌

1. 研究開始当初の背景

研究者らは、Valosin-containing protein (VCP) mRNA 発現の抗アポトーシス性に関与すること、転移と密接な関係があること、VCP 発現が、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、食道癌、甲状腺癌、口腔癌、膵内分泌腫瘍において転移、予後と関連した独立する予後因子であることを報告した。さらに、VCP 転写調節機構についての検討を行い、Pre B cell leukemia transcription factor 1 (PBX1) が VCP 転写因子であることを示した。PBX1 は、PBX/TALE (three amino acid loop extension) 群 [PBX1-4, Meis homeobox (Meis) 1-3, pbx/knotted 1 homeobox (Prep) 1, 2] に属する転写因子で、胎児発生、細胞分化に関与する重要な因子である HOX 群タンパク質と結合することにより、その活性化に関与していることが知られている。

膵臓癌細胞株 Panc1 に対し PBX/TALE 群転写因子に対する small interfering RNA (siRNA) をトランスフェクションした後、mRNA マイクロアレイによる解析を行った。その結果、Meis1 siRNA による Meis1 発現低下によりミトコンドリア遺伝子の発現が低下したが、PBX1, PBX2, Prep1 に対する siRNA では低下しなかった。

研究者らは以上のミトコンドリア遺伝子発現パターンの検討過程で、ミトコンドリア DNA/RNA 合成に関与するとされる D-loop について検討を行い、D-loop 領域に存在する短鎖 DNA (7SDNA) とその相補的な RNA (いわゆる R-loop) に着目した。

2. 研究の目的

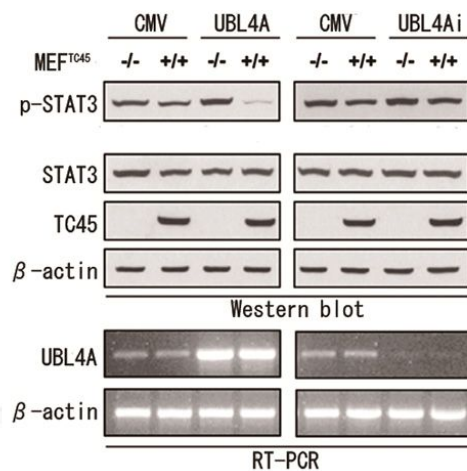
7SDNA と R-loop に着目し、それらの発現と細胞周期との関連を明らかにすることを目的とした。具体的には細胞周期をそろえたうえで、In situ hybridization、PCR 法にて検討を行い、7SDNA と R-loop の局在を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) 7SDNA ならびに R-loop の細胞内分布の検討

いくつかの種由来の培養細胞を用いて、7SDNA ならびに R-loop の細胞内分布、特に核内移行の有無について検討する。核内移行に関連する要素(血清、糖、dNTP、酸素濃度等)についても検討する。

(2) 7SDNA、R-loop の生物学的意義の検討



標識 7SDNA、R-loop を合成し細胞に導入する。その細胞内分布を観察するとともに、細胞の変化 (RNA、タンパク質発現プロファイル) を検討する。

4. 研究成果

(1) 7SDNA ならびに R-loop の細胞内分布

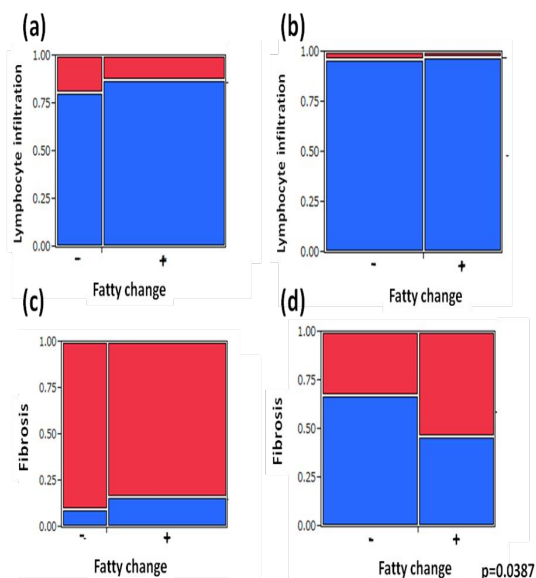
7SDNA ならびに R-loop の細胞内分布について詳細な検討を行った。当初は PCR 法でも 7SDNA ならびに R-loop を核内分画に認めしたが、これらは、核膜に付着するミトコンドリア由来の DNA であることが確認された。

(2) VCP の co-factor である UBL4A の検討

VCP の co-factor である ubiquitin like 4A (UBL4A) の検討を行い、UBL4A が核内で Signal Transducer and Activator of Transcription 3

(STAT3)の脱リン酸化に働き、細胞増殖に対し抑制的に働くことを明らかにした(図1)。
 図1 UBL4AはSTAT3のリン酸化を抑制する

メラノーマ細胞株に UBL4A を導入すると肺転移率は減少し、UBL4A 発現を抑制すると肺



転移率は増加した(図2)。

図2 . UBL4A は転移抑制に働く

(3) 膵癌発生母地の検討

膵癌の発生母地となる膵組織の検討を行うために、膵癌手術症例の非癌部と非膵癌解剖症例膵臓を検討した。膵癌症例においては、有意に線維化、脂肪変性、炎症細胞浸潤の割合が高かった(図3)。

図3 . 膵癌では線維化と炎症細胞浸潤の比率が高い

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

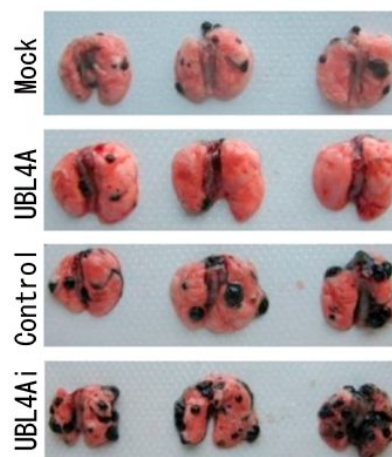
Kawada N, Uehara H, Hosoki T, Takami M, Shiroeda H, Arisawa T, Tomita Y. Usefulness of dual phase 18F-FDG-PET/CT for diagnosing small

pancreatic tumors. *Pancreas* 査読有、44: 655-659, 2015. doi: 10.1097/MPA.0000000000000313

Kawada N, Uehara H, Hosoki T, Takami M, Shiroeda H, Arisawa T, Tomita Y. Predictors of malignancy in branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *JOP* 査読有、15: 459-464, 2014. doi: 10.6092/1590-8577/2805.

Tomita Y, Azuma K, Nonaka Y, Kamada Y, Tomoeda M, Kishida M, Tanemura M, Miyoshi E. Pancreatic Steatosis and Fibrosis as Predisposing Factors of Cancer Development. *Pancreas* 査読有、43: 1032-1041, 2014. doi: 10.1097/MPA.0000000000000159.

Kawada N, Tanaka S, Uehara H, Katayama K, Hosoki T, Takami M, Tomita Y. Alteration of strain ratio evaluated by transabdominal ultrasound elastography may predict the efficacy of preoperative chemoradiation performed for pancreatic ductal carcinoma: preliminary results. *Hepatogastroenterol.* 査読有、61:



480-483, 2014.

Wang Y, Ning H, Ren F, Zhang Y, Rong Y, Wang Y, Su F, Cai C, Jin Z, Li Z, Gong X, Zhai Y, Wang D, Jia B, Qiu Y, Tomita Y, Sung JJ, Yu J, Irwin DM, Yang X, Fu X, Chin YE, Chang Z. GdX/UBL4A Specifically Stabilizes the TC45/STAT3 Association and Promotes Dephosphorylation of STAT3 to Repress Tumorigenesis. *Mol. Cell* 査読有、53: 752-765, 2014. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.020.

Geng Y, Ju Y, Ren F, Qiu Y, Tomita Y, Tomoeda M, Kishida M, Wang Y, Jin L, Su F, Wei C, Jia B, Li Y, Chang Z. Insulin Receptor Substrate 1/2 (IRS1/2) Regulates Wnt/ -catenin Signaling through Blocking Autophagic Degradation of Dishevelled2. *J Biol. Chem.* 査読有、289: 11230-11241, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.544999.

Kano Y, Ishii H, Konno M, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa S, Hamabe A, Ogawa H, Takahashi H, Ohta K, Hasegawa S, Tanaka K, Fukusumi T, Otsuka M, Kawamoto K, Haraguchi N, Fujimoto R, Isobe M, Tomita Y, Matsuura N, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Cells of origin of squamous epithelium, dysplasia and cancer in the head and neck region after bone marrow transplantation. *Int J Oncol.* 査読有、44: 443-450, 2014. doi: 10.3892/ijo.2013.2206

Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K, Nagata S,

Morishige K, Lengyel E, Kurachi H, Kimura T. miR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin $\alpha 5$ Expression. *Am J Pathol.* 査読有、182: 1876-1889, 2013. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.039.

Tomoeda M, Yuki M, Kubo C, Yoshizawa H, Kitamura M, Nagata S, Nishizawa Y, Tomita Y. Role of antioxidant vitamins administration on the oxidative stress. *Cent Europ J Med.* 査読有、8: 509-516, 2013.

Nakazato Y, Maeshima AM, Ishikawa Y, Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, Tomita Y, Minami Y, Asamura H, Tachibana K, Goya T, Noguchi M. Interobserver agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 査読有、8: 736-743, 2013. doi: 10.1097/JTO.0b013e318288dbd8

〔学会発表〕(計3件)

竹中 明美, 富田 裕彦, 中山 富男 WHO 分類と組織像・細胞像 呼吸器新 WHO 分類と細胞像 腺癌の分類を中心に第 55 回日本臨床細胞学会春季大会 2014

西村 早菜子, 竹中 明美, 中山 富雄, 龍 あゆみ, 太田 沙世子, 長田 盛典, 富田 裕彦 ALK 陽性肺癌の細胞所見第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会 2013

竹中 明美, 富田 裕彦 脾腫瘍の画像と組織像・細胞像 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 裕彦 (TOMITA YASUHIKO)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪

府立成人病センター（研究所） 病理・
細胞診断科・主任部長
研究者番号：60263266

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし