

令和元年6月24日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00406

研究課題名(和文) IGF2BPsと関連する遺伝子間の相互依存関係を可視化する遺伝子ネットワーク解析

研究課題名(英文) Network analysis of IGF2BP3 and its related molecules

研究代表者

工藤 光洋 (Kudo, Mitsuhiro)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20256978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IGF2BP3は大腸がんで大腸に比べ発現が高いことが報告されており、大腸がんの増殖、転移、浸潤などとの関連が注目されている。大腸がん細胞株をsiRNA処理してIGF2BP3の発現をノックダウン(KD)すると、細胞増殖能が抑制された。さらに、siRNA処置48時間後のタンパク質の発現レベルを質量分析装置で網羅的に解析すると、IGF2BP3のKDにより、アポトーシスの正の制御に関するタンパク質の発現が増加し、逆にmRNAからタンパク質が合成される翻訳の過程に関するタンパク質の発現が低下していた。これらから、IGF2BP3が翻訳やアポトーシスの制御に重要な役割をすることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IGF2BP3はターゲットのmRNAに結合し、そのmRNAの発現を調節して、細胞増殖や細胞遊走、細胞浸潤に影響を与えると考えられる。本研究では、大腸がん細胞において、IGF2BP3をKDすると、細胞増殖が抑制され、アポトーシスを正の制御をするタンパク質の発現が増加し、mRNAからタンパク質が合成される翻訳の過程に関するタンパク質の発現が低下していたことが確認された。これらのことより、IGF2BP3は、アポトーシスや翻訳に関する遺伝子やタンパク質の発現に影響することで、大腸がん細胞で重要な役割を果たしていることが示唆された。IGF2BP3の機能解明は大腸がん研究に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies demonstrated that insulin-like growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) as an mRNA binding protein, was overexpressed in colorectal cancer (CRC) cells and related to the tumor behavior such as cell growth, cell migration, cell invasion, and metastasis. However, the biological role of IGF2BP3 in CRC is still unclear. We focused on the IGF2BP3 related molecules whose expression levels of mRNAs and proteins were altered by knockdown (KD) of IGF2BP3. IGF2BP3 KD by siRNA in CRC cells repressed the cell proliferation of CRC cells. Moreover, our mass spectrometry analysis demonstrated that the expression levels of proteins related to the positive regulation of apoptosis were increased and the translation-related proteins were decreased. These results suggest that IGF2BP3 play an important role in CRC cell behavior through the regulation of apoptosis and translation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：IGF2BP3 IMP3 RNA結合蛋白質 遺伝子ネットワーク プロテオミクス 次世代シーケンス 大腸がん 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、マイクロアレイ解析やプロテオミクス解析を用いた研究が盛んに行われ、これらのデータを利用したパスウェイ解析や遺伝子ネットワーク解析などが行われている。

(2) Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins 3 (IGF2BP3)は mRNA 結合タンパク質の 1 つで、多くの腫瘍での発現が、正常組織・細胞に比べ、高値を示すことが知られている。大腸がんにおいても、IGF2BP3 の高い発現が報告されており、細胞増殖、細胞遊走、浸潤、転移など、大腸がんの細胞動態に関連している可能性が示唆されている。しかし、IGF2BP3 とそのターゲット mRNA (複数の mRNA の報告がある)との結合を介した遺伝子発現変化、タンパク質発現変化、さらに細胞動態への影響について、未だ明らかにはなっていない。本研究では大腸がん細胞での IGF2BP3 が関与する遺伝子ネットワークに注目した。

2. 研究の目的

(1) 大腸がん細胞株に対して IGF2BP3 の siRNA 処置により、IGF2BP3 の発現をノックダウン (KD)し、次世代シーケンス解析 (RNA-seq)にて mRNA の発現変化を解析し、さらに質量分析法にてタンパク質の発現変化を網羅的に解析する。

(2) 解析結果より IGF2BP3-KD により発現変化した遺伝子と相互関係がある遺伝子ネットワークを同定し、遺伝子ネットワーク解析ソフトウェアにて可視化する。

(3) 質量分析法の解析結果より、発現変化の大きかったタンパク質の抽出とそれらのタンパク質が関連するネットワークを同定し、可視化する。

(4) これらの結果から大腸がん細胞において、IGF2BP3 が影響を及ぼす可能性が高い遺伝子やタンパク質の同定に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞株：SW480 と SW620 を用いて IGF2BP3-KD により細胞増殖能、細胞遊走能・浸潤能に対する IGF2BP3 の影響を検討した。

(2) SW480 と SW620 に IGF2BP3 の siRNA 処置 (IGF2bp3si)48 時間後のタンパク質を抽出し、Western blot 法にて IGF2BP3si による IGF2BP3 のタンパク質発現変化を確認した。さらに SW480 では、IGF2BP3s 処置し、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間での total RNA を抽出し、quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)法にて各時間での mRNA 発現変化を解析し siRNA の効果を確認した。

(3) IGF2BP3s 処置した SW480 の 2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後の各種 mRNA の発現変化について RNA-seq 法にて解析した。Control siRNA を処置した細胞から得られた mRNA の発現量をコントロールとして用いた。

(4) SW480 に IGF2BP3 の siRNA を処置後 48 時間後にタンパク質を抽出し、質量分析法にてタンパク質発現の変化を解析した。Control siRNA で処置した細胞のタンパク質発現量をコントロールとして用いた。

(5) IGF2BP3 の siRNA 処置 SW480 での mRNA およびタンパク質の発現量がコントロール (Control siRNA で処置された細胞)より 2 倍以上増加 (up-regulate)または減少 (down-regulate)した遺伝子またはタンパク質を選択し、Metascape (1, 2)にてネットワーク解析を行った。

4. 研究成果

(1) IGF2BP3 の siRNA による処置 (IGF2BP3si)と Control siRNA (Ctrl si)で処置された細胞は、それぞれ、処置後 24, 48, 72, 96 時間での細胞数を MTT assay にて測定した。SW480、SW620 共に IGF2BP3si 処置 72 時間より細胞増殖が抑制された (Fig. 1)。

(2) IGF2BP3 の siRNA 処置 (IGF2BP3si)により 48 時間後の Western blot の結果を示す。SW480、SW620 共に IGF2BP3 のタンパク質発現は減少した (Fig. 2A)。IGF2BP3si 処置した SW480 の mRNA 発現量の変化を示す。IGF2BP3si 処理し 0, 2, 4, 8, 24 時間後に qRT-PCR 法で測定した。IGF2BP3 の mRNA 発現量は時間依存的に減少した (Fig. 2B)。

Fig. 1

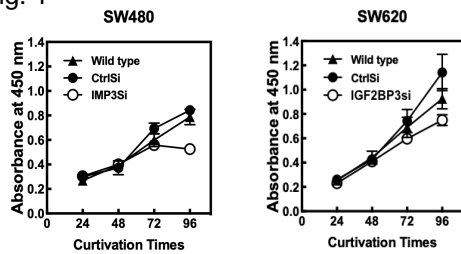
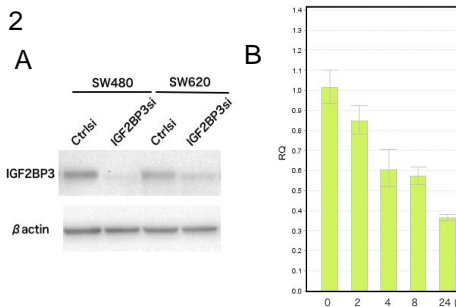


Fig. 2



(3) SW480 を IGF2BP3si 処置し、2 時間、4 時間、8 時間、24 時間後の RNA-seq 解析からの mRNA 発現変化について、各時間において、IGF2BP3si 処置によりコントロール処置 (CtrlSi) に比べて、mRNA 発現量が 2 倍減少した遺伝子群 (down-regulate) と 2 倍増加した遺伝子群 (up-regulate) を選択し、それらの遺伝子を Metascape にて遺伝子ネットワーク解析を行った。ここでは、IGF2BP3si 処置 24 時間後の結果を示す。IGF2BP3-KD 後に 587 遺伝子の mRNA 発現が減少し、499 遺伝子の mRNA 発現が増加した。それらの遺伝子は ontology source (KEGG Pathway, GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways や CORUM の data) に基づいて **pathway and process enrichment analysis** を施行し、Gene ontology (GO) term によってクラス分け (hierarchical clustering) された。down-regulate と up-regulate の群よりそれぞれ統計学的に p 値が上位のものトップ 20 に注目し、ネットワーク解析を行った。

(4) Pathway and process enrichment analysis により ontology term によりクラス分けされた結果をもとに、遺伝子ネットワークが構築された。それぞれの term 間の相互関係を $similarity > 3$ の時 term 間を接続した。ネットワークは Cytoscape を用いて可視化した (それぞれのネットワークの接続ポイントの node は ontology term を示し、それぞれの term を色づけている) (Fig. 3A)。さらに、Fig. 3A に対応して、down-regulate 群 (青) と up-regulate 群 (赤) の遺伝子の割合を示した (Fig. 3B)。node の大きさはヒットした ontology term の総数に対する割合を示している。

Fig. 3A

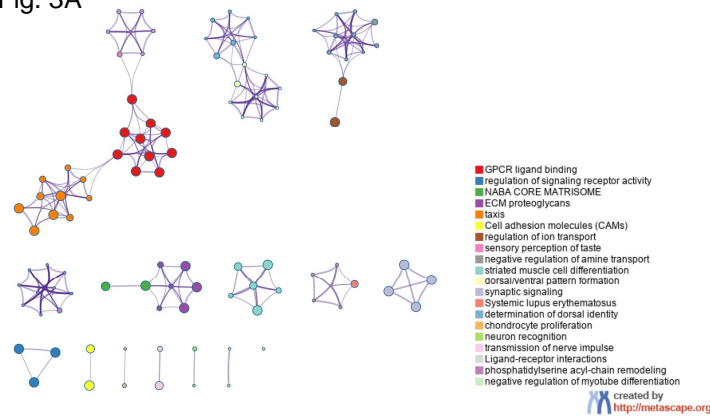
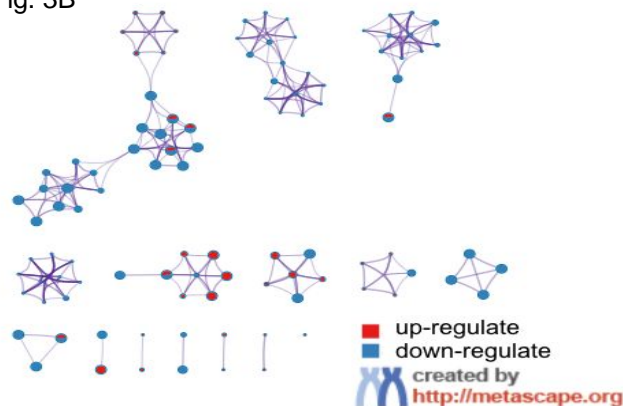


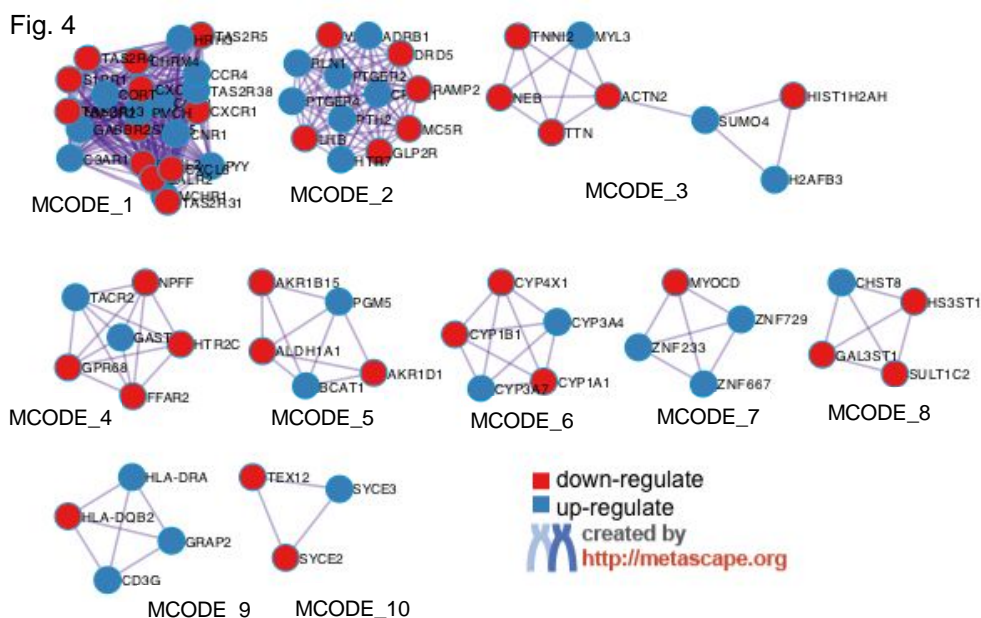
Fig. 3B



(5) down-regulate 群と up-regulate 群の遺伝子とその GO term に基づいて、BioGrid, InWeb_IM, OmniPath などの data から遺伝子ネットワークを構築した。構築された遺伝子ネットワークを Molecular Complex Detection (MOCDE) algorithm から densely connected

network components を同定し、MOCDE network を構築した (このネットワークは pathway/process network には依存していない)。GPCR ligand binding、Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)、Neuro interaction active ligand-receptor interaction がトップ 3 として提示された。特徴的なネットワーク部分を抽出した (Fig. 4)。MCODE_1 (G alpha (i) signalling events, GPCR ligand binding, Class A/1 (Rhodopsin-like receptor), MCODE_2 (GPCR ligand binding, G alpha (s) signalling events, Neuroactive ligand-receptor interaction), MCODE_3 (Striated Muscle Contraction, actin-myosin sliding, muscle filament sliding), MCODE_4 (G alpha (q) signaling events, peptide hormone secretion, regulation of hormone secretion), MCODE_5 (cellular hormone metabolic process, hormone metabolic process, small molecule catabolic process), MCODE_6 (lipid hydroxylation, Steroid hormone biosynthesis), MCODE_8 (glycoprotein biosynthesis process, glycoprotein metabolic process, carbohydrate derivative biosynthetic process), MCODE_9 (Generation of second messenger molecules, Costimulation by the CD28 family, TCR signaling), MCODE_10 (synaptonemal complex assembly, synaptonemal complex organization, synapsis)

これらの結果から、IGF2BP3 は GPCR ligand binding、Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)、Neuro interaction active ligand-receptor interaction などの遺伝子ネットワークに影響している可能性が示唆された。



(6) 次に、W480 を IGF2BP3si で処理し 48 時間後のタンパク質発現を質量分析法で解析し、コントロールに比べて 2 倍以上、発現が減少したタンパク質を down-regulate 群、発現が増加したタンパク質を up-regulate 群として、発現変化したタンパク質のネットワークを構築した。down-regulate 群として 75 種類、up-regulate 群として 69 種類のタンパク質が選択され、遺伝子発現でのネットワーク解析同様に、ontology term を元にクラス分けした。down-regulate 群では translation や regulation of growth がクラス化され、up-regulate 群では positive regulation of apoptotic process や response to oxidative stress が特徴として示された。

(7) up-regulate 群と down-regulate 群での ontology term によるネットワークを構築した (Fig. 5)。特徴的なクラスを赤点線で示した。

(8) 構築したネットワークから特徴的なネットワークを抽出した (Fig. 7)。赤の node は down-regulate 群、青の node は up-regulate 群を示している。MCODE_1 (GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit, Eukaryotic Translation Initiation, Cap-dependent Translation Initiation), MCODE_2 (cellular amino acid metabolic process, Metabolism of amino acid and derivatives), MCODE_4 (regulation of DNA recombination, Apoptosis induced DNA fragmentation, Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF)), MCODE_5 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway)

これらの結果より、IGF2BP3 の KD により apoptosis の正の制御に關与する経路のタンパク質発現や機能が增強されている一方、DNA 合成、翻訳、アミノ酸代謝などに關与する経路のタンパク質の減少やそれらの機能の抑制されていることが示唆された。

siRNA 実験、RNA-seq による mRNA 定量、質量分析法によるタンパク質定量、さらに、それらのデータを用いた遺伝子ネットワーク解析は、IGF2BP3 の大腸癌細胞の増殖抑制に關与する

遺伝子ネットワーク経路を推定することが可能であると考えられた。

大腸がん細胞での IGF2BP3 の細胞動態に影響を与える遺伝子ネットワークの解析は、大腸がんの診断・治療の研究に大いに貢献する可能性が示唆された。

Fig. 5

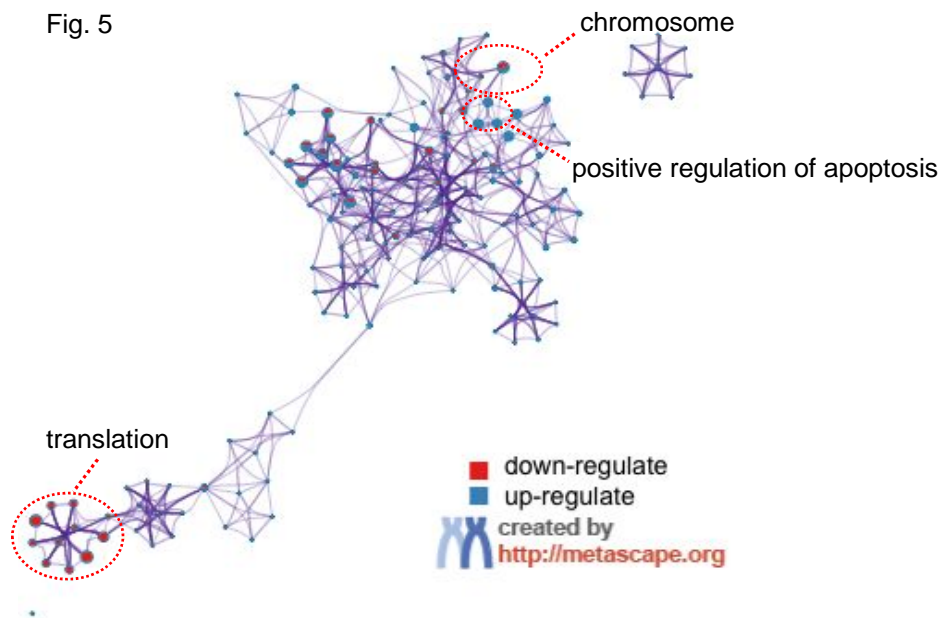
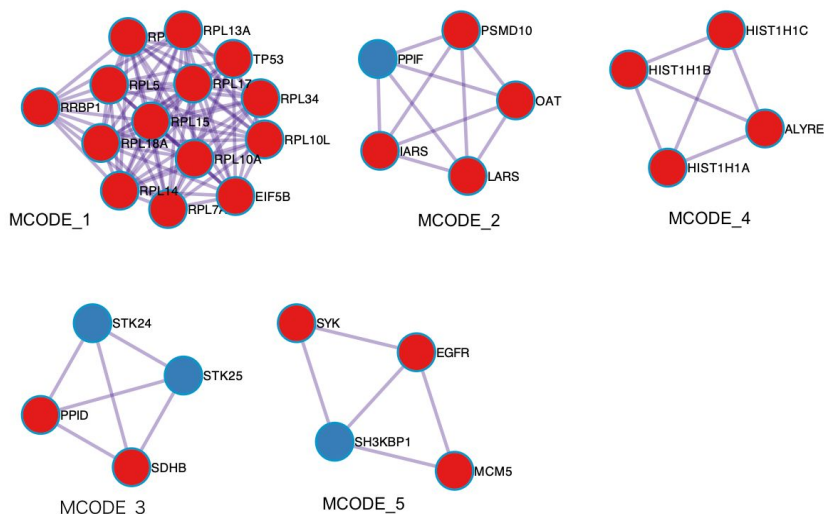


Fig. 6



< 引用文献 >

(1) Zhou Y, Zhou B, Pache L, *et al.*: Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. Nat Commun 10, 2019.

(2) Chen H, Kong Y, Yao Q, *et al.*: Three hypomethylated genes were associated with poor overall survival in pancreatic cancer patients. Aging (Albany NY), 2019.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：