

平成30年6月18日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15649

研究課題名(和文) RNA結合因子を標的とした神経膠腫予後マーカー開発

研究課題名(英文) The glioma convalescence marker development which targeted an RNA-binding factor.

研究代表者

中村 有香 (NAKAMURA, Yuka)

金沢医科大学・総合医学研究所・助手

研究者番号：00565632

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)：グリオブラストーマ(GBM)でEJC関連因子の高い発現の意義を明らかにするために免疫染色し、発現量が高い群と低い群で生存率に差があるかを検討した結果、高発現群では低発現群と比較して有意に全生存期間が短いことが明らかとなった。また、Tet-ONシステムを利用して薬剤誘導による過剰発現(OE)系を作製し、影響を受ける遺伝子を検索したところ、多数の遺伝子の変動を検出できた。これらの遺伝子の機能をデータベースなどにより検索したところ、GBMに関連する遺伝子が多数を占めていた。この結果は、EJC関連因子がGBMに関わる遺伝子群のマスター因子であることを示唆するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the significance of high expression of EJC-related factors in glioblastoma (GBM), immunostaining was performed to examine whether there is a difference in survival rate between the group with high expression level and the group with low expression level. As a result, in the high expression group, it was revealed that the overall survival time was significantly shorter than that of the low expression group. In addition, using the Tet-ON system, drug-induced overexpression system was created in GBM cells and genes affected were searched. As a result, we were able to detect a large number of gene fluctuations. We searched the functions of these genes by database and others, and the genes related to GBM occupied. This result seems to suggest that the EJC related factor is the expression regulator of the gene group related to GBM.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腫瘍マーカー RNA 神経膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

(1) グリオブラストーマは難治性の悪性脳腫瘍である

グリオブラストーマ(神経膠芽腫、以下GBM)は神経膠細胞の悪性化により発症し、手術による摘出、放射線照射、化学療法が行われるが、5年生存率が約10%と予後が極めて悪いことで知られている。その再発は残存腫瘍の増殖、浸潤、脳内での転移によるが、再発防止あるいは延命のための治療法開発が急務とされている。これまで見いだされてきたGBMの予後マーカーや治療標的は他の癌種において見いだされてきたものが多く、本研究ではGBM特有の標的遺伝子の検索および同定を目指した。

(2) EJC(exon junction complex)は mRNA 結合因子である

EJCはmRNAのエクソンのつなぎ目に形成される複合体で、Magoh、Y14、Casc3、Upf3、eIF4A3などで構成されて、様々な因子が結合している。われわれのグループは、この複合体がmRNAの輸送、分解、翻訳にかかわることを報告してきた(連携研究者ら、2001, Cell)。

海外の複数のグループから、EJCの各因子の欠損が遺伝疾患に関与することが報告されてきた。マウスやヒトでの症状からEJCの各因子は胎児期の中枢神経系の正常な発達に必要な因子であることが示されている(Albersら、2012, Nat Genet など)。

われわれのグループは、EJC因子の欠損がさまざまな腫瘍細胞の増殖をM期に停止させ、アポトーシスを誘導することを明らかにし(研究代表者、連携研究者ら、2013, Exp Biol Med)、抗がん剤の新規標的因子として国際特許を出願・取得してきた(WO2011007801A1)。さらに、FACS解析によりEJCがM期進行に必須の因子であることと中心体成熟への直接的な関与を報告し(研究代表者、連携研究者ら、2014, Histochem Cell Biol)、各EJC因子の細胞内リン酸化修飾部位と意義を明らかにしてきた(研究代表者、連携研究者ら、2015, Exp Biol Med、連携研究者ら2018, Sci Rep)。

2. 研究の目的

EJC(Exon Junction Complex)はmRNAのつなぎ目に形成される複合体で、mRNAの代謝や輸送に関わる。申請者らは、EJCがmRNAの代謝と同時に中心体成熟に関わることを報告してきた。この複合体の異常は、遺伝子発現よりも中心体異常を

引き起こすため、染色体の不安定性に関与すると考えている。EJCとその関連因子を標的として、さまざまな遺伝子発現データベースを検索していく過程で、神経膠腫の中でも悪性度の高いGBMにおいて発現が変動しているものがあることを突き止め、さらに予後のデータと連結することにより、それらの発現異常が予後マーカーとして有用である可能性を見いだした。

そこで、EJC関連因子の診断マーカーとしての有用性を患者由来検体を利用して検討し、さらにEJC関連因子の発現がGBMにおいて果たす役割を解明し、より有効な診断・治療標的を探索することを目指した。

3. 研究の方法

(1) データベース解析結果のバリデーションを行う

脳腫瘍の予後診断におけるEJC発現の有用性を、実際の標本を使用し、免疫染色により明らかにする。

サンプルは、日本人かつ神経膠芽腫と診断された患者由来の組織を用いる。標的とする遺伝子は、データベース検索から腫瘍組織で発現が変動し、予後に関与する可能性が見いだせたEJCコア因子とする。それぞれの発現および局在情報と予後との相関をKaplan-Meierプロットにて解析する。

(2) EJCの発現変動が膠芽腫細胞に与える影響を網羅的に解析する

これまでの研究成果から、EJCの中でCASC3以外の因子のノックアウトまたはノックダウンは腫瘍細胞に致死効果をもたらすことが明らかとなっている。そこで、EJCの発現の影響を培養細胞レベルで解析するためにTet-ONシステムを利用して薬剤誘導による過剰発現(OE)系を作製した。ウエスタンブロットで発現誘導を確認後、DNAマイクロアレイによりトランスクリプトーム解析を行ない、影響を受ける遺伝子を検索した。さらに局在について、免疫染色にて検出をおこなった。

4. 研究成果

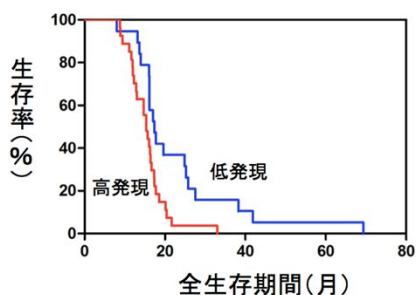
(1) EJCの発現量がGBM患者の予後に影響することを明らかにした。

GBMではEJC関連因子においてmRNA量が増加していることを見いだした。この結果は、正常組織で発現が低いEJC関連因子が腫瘍では発現が高いこと、細胞分裂にEJCが寄与することから、増殖する腫瘍細胞はEJCの発現を獲得することが必要と考えられる。そこでGBM腫瘍組織および周辺部よりタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを行ったところ、腫瘍

組織での高発現を見いだした(未発表データ)。この実験結果は、がん化にともなうEJCの活性化がGBM細胞の増殖に必須であることを強く示唆する。

次に、EJC関連因子の高い発現の意義を明らかにするために免疫染色し、発現量が高い群と低い群で生存率に差があるかを検討した。

46名の腫瘍組織標本について、あるEJC関連因子で染色し、発現量と予後との関係をKaplan-Meierプロットしたところ、高発現群では低発現群と比較して有意に全生存期間が短いことが明らかとなった($p=0.0081$)。



この結果は、何らかの原因でGBMにおいてEJCが高発現すること、または高発現してしまうような場合には患者の予後が悪いことが推測される。

(2) EJCの発現変動が膠芽腫細胞に与える影響を網羅的に解析する

上記の臨床データのメカニズムを培養細胞レベルで明らかにするためにTet-ONシステムを利用して薬剤誘導による過剰発現(OE)系を作製した。ウエスタンブロットで発現誘導を確認したところ、薬剤添加後1日目から誘導が開始され、3日目まで明らかな発現が認められた。この外から発現誘導をかけたEJCに対して内在性の遺伝子発現は特にタンパク質レベルで低下しており、EJCのような生体に必須な遺伝子については発現量を一定に保つ仕組みがあると予想された。このことから、腫瘍組織においてEJCを高発現させる機構については今後とも検討する必要があると考えられる。

発現誘導をかけた細胞について、全RNAを抽出し、DNAマイクロアレイによりトランスクリプトーム解析を行ない、影響を受ける遺伝子を検索したところ、多数の遺伝子の変動を検出できた。これらの遺伝子の機能をデータベースなどにより検索したところ、GBMの悪性化に関連する遺伝子が多数を占めていた。この結果は、EJC関連因子がGBMの悪性化に関わる遺伝子群の発現マスター因子であることを示唆するものと思われる。

また、EJC関連因子について核内への局在についても確認を行なったところ、これまでの報告通り転写の活性化部位である核スペckルに局在していることが確認された。

以上の結果をまとめると、今後マイクロアレイのデータよりGBMの悪性化に関連する遺伝子群を同定することによって臨床データで得られた予後への影響を分子レベルで解析し、GBM悪性化の新しい分子機序を推定していけることが期待される。なお、本研究の遂行中に肝臓がんにおいてEJCが予後マーカーとなる可能性が他の研究グループから論文発表されており(Liang R et al. Oncol Rep. 2017)、本研究についても論文発表を急ぎたい。

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)

Tatsuno T, Nakamura Y, Ma S, Tomosugi N, Ishigaki Y. Nonsense-mediated mRNA decay factor Upf2 exists in both the nucleoplasm and the cytoplasm. Mol Med Rep., 査読有, 14(1), 2016, 665-660 DOI: 10.3892/mmr.2016.5331.

(学会発表)(計 6 件)

石垣靖人、辰野貴則、中村有香、馬清峰: phos-tagを利用した腫瘍細胞における核内タンパク質群のリン酸化制御機構の解明、第67回日本電気泳動学会総会、2016.

石垣靖人、中村有香、辰野貴則、竹原照明: イオン液体処理が固定培養細胞内部構造に与える影響、医学生物学電子顕微鏡技術学会、第32回学術講演会および総会、2016.

岩井邦充、奥野太寿生、森田卓朗、矢野浩、入谷敦、大黒正志、森本茂人、辰野貴則、中村有香、石垣靖人: 血管平滑筋細胞におけるNucleosteminは癌関連遺伝子の発現を惹起し動脈硬化巣形成に積極的に関与する、第58回日本老年医学会学術集会、2016.

岩井邦充、山崎愛大、渡邊啓介、姫野太郎、入谷敦、大黒正志、森本茂人、辰野貴則、中村有香、石垣靖人: 血管平滑筋細胞の老化過程における核移行担体Importin 1発現抑制の意義について、58回日本老年医学会学術集会、2016.

砂谷優実、辰野貴則、中村有香、逆井良、松井理、橋本光正、石垣靖人、岩淵邦芳: DNA二本鎖切断修飾タンパク質53BP1を介した神経前駆細胞の分化抑制効果、日本放射線影響学会第59回大会、2016.

辰野貴則、馬清峰、中村有香、石垣靖

人：RNA 結合タンパク Y14 の細胞内局在機構の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 有香 (NAKAMURA, Yuka)
金沢医科大学・総合医学研究所・助手
研究者番号：00565632

(3)連携研究者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号：20232275

赤井 卓也 (AKAI, Takuya)
富山大学・附属病院・講師
研究者番号：50222500

中田 光俊 (NAKADA, Mitsutoshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：20334774

中田 聡子 (NAKADA, Satoko)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：30569091

島崎 猛夫 (SHIMASAKI, Takeo)
金沢医科大学・総合医学研究所・准教授
研究者番号：50377420