

平成 31 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0109

研究課題名(和文)ヘテロクロマチン由来RNAがもたらす複雑系攪乱による発癌機構解明と病態検出法開発

研究課題名(英文)Oncogenetic process by the complexed system due to heterochromatin-derived RNA

研究代表者

大塚 基之(OTSUKA, Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90518945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌早期からヘテロクロマチン領域から反復配列をもつRNAが発現してくることに着目し、その生物学的意義を検討した。反復配列RNAの過剰発現は、YBX1蛋白との結合を介して、DNA損傷の蓄積や染色体分裂異常を惹起し、それにより癌化のポテンシャルを上げていることが示された。さらに反復配列RNAを高感度に血中から検出することで、膵癌早期診断マーカーとして有用であることが示唆された。さらに特殊な非コードRNAとして膵癌特異的な環状RNAを同定し全長配列を決定したうえでその組織内発現を確認し、今後の複雑系の解析次第では、新規の膵癌マーカーとして有用になる可能性が考えられた

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は予後の悪いがんの筆頭ともいえるが、それは発癌メカニズムが不明である点と、早期発見がしにくい点が理由として挙げられる。膵癌早期から、通常では発現していない一定の配列の繰り返しを持つ特殊なRNAが発現してくることが分かっている。本研究によって、この反復配列RNAの発現が複雑な系を介して細胞の遺伝子異常を惹起し、癌化に絡んでいることが判明した。今後反復配列RNAの血中での検出による膵癌早期発見への応用や、このRNAを標的とした新規治療法の開発がのぞまれる。

研究成果の概要(英文)：By focusing the expression of repetitive RNA from heterochromatin region from the early stage of pancreatic cancer, its biological function was examined. Repetitive RNA expression resulted in the accumulation of DNA damages and chromosomal instability through binding with YBX-1 protein. By detecting the repetitive RNA from the patients' sera, this may be a novel biomarker for the detection of early pancreatic cancer. In addition, we newly identified a novel circular RNA expressing specifically in pancreatic cancer and its expression in the tissues were examined. Through the analyses of complexed system involving DNA, RNA, and protein, clinically useful biomarkers can be developed.

研究分野：消化器内科学

キーワード：複雑系 ヘテロクロマチン RNA

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

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、慢性炎症に続発する癌(炎症性発癌)の病態として「炎症性ストレスによる慢性的な『miRNA 機能阻害』が原因の一端である」ことを明らかにし、miRNA 機能を増強する薬剤によって炎症性発癌の予防が可能になることを同定してきた。いっぽう、炎症性発癌ではなく、もうひとつの主要な発癌経路である sporadic な発癌については癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異に伴う多段階発癌が主要な発癌経路であると推定されているが、なぜそれらの遺伝子変異が最終的に雑多な遺伝子異常を伴う細胞癌化に結びつくのかは、いまだ明確になっていなかった。研究代表者は、多段階発癌の初期の遺伝子異常の段階から非コード反復配列 RNA が発現してくる事象に着目し、膵癌のマウスモデルを用いて、前癌病態である PanIN(Pancreatic intraepithelial neoplasia)の段階から発現してくる反復配列 RNA の細胞の悪性転化の観点から見た生物学的意義を解析し、翻訳されることのないこの反復配列 RNA が、染色体分裂異常等の癌化能の獲得に関連する表現型をもたらすことを観察していた。このような反復配列 RNA がなぜ転写されるのか、転写後どのように機能しているのか、は現時点では不明であるが、もともとゲノムのヘテロクロマチン部位にコードされているため、前癌病態ではクロマチンリモデリングなどの epigenetic な変化を介して転写されてくるのではないかと想定される。また、発現した反復配列 RNA は、他の non-coding RNA の大部分がそうであるように、特定の蛋白と相互作用しその蛋白の機能を修飾し、その結果、DNA 障害や染色体分裂異常が惹起されているのではないかと考えられる。さらにこの機能変化がさらなるヘテロクロマチンの開裂をもたらし反復配列 RNA の発現を増幅する可能性もある。そこで、これまでの研究内容をベースに「エピゲノム修飾 - ゲノム DNA - 非コード RNA - 蛋白機能修飾 - DNA damage・染色体異常」といった「非コード RNA 発現を主体にした DNA-RNA-蛋白 - 細胞機能といった多階層にわたる複雑系の機能攪乱によって生じる発癌ポテンシャル獲得の分子機構」を明らかにしたうえで、これを「臓器組織に関わらず病態として普遍的な発癌性獲得機構のひとつであること」を *in vivo*・*in vitro*での検討で証明しようと発想した。

2. 研究の目的

「前癌病態からの過程で特異的に発現してくる反復配列 RNA を、血中で高感度に検出し個人の発癌ポテンシャルを予測する手段とする」こと、および「反復配列 RNA の機能に対する介入による発癌予防法開発」までを目的とする。これらの検討によって、異常 RNA 発現に伴う DNA-RNA-蛋白の多階層をまき込んだ複雑系の恒常性破たんが惹起する発癌系の分子機構を明らかにするとともに、発癌前段階の予知を臨床的に可能とする方法、あるいは分子機構に対する介入制御による発癌予防法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞における強制発現系での表現型解析:

マウス膵管上皮細胞に反復配列 RNA の強制発現系を導入し、それによる表現型の変化を解析する。

(2) 発癌ポテンシャル獲得機構への介入(標的分子の同定とレスキュー)・その *in vivo*での検討:

反復配列 RNA と結合する宿主蛋白を質量分析で同定し、その分子機構を解明する。さらに、反復配列を発現するトランスジェニックマウスを作製し、異常発現 RNA による表現型を *in vivo*で解析する。

(3) 反復配列 RNA のユニークな高感度検出法の発明・樹立と、臨床検体を用いた応用:

反復配列 RNA を血中から高感度に検出する方法を確立し、臨床検体を用いてその測定による膵癌の高感度検出法を確立する。

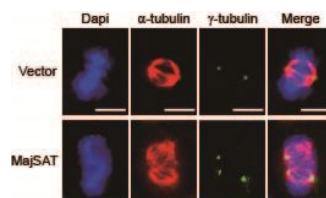
(4) その他の RNA の応用:

反復配列 RNA と同様に、膵癌で特異的に発現する non-coding RNA を同定し、あらたなマーカーとしての有用性や病態への関与について検証する。

4. 研究成果

(1) 培養細胞における強制発現系での表現型解析:

まず、遺伝子改変によって膵臓特異的に Kras 遺伝子(注3)に変異を持つマウスを用いて、膵臓に形成された腫瘍から細胞株を樹立した。マウスの場合は major satellite RNA (MajSAT RNA) と呼ばれるサテライト RNA が前癌段階で発現してくるので、この細胞に MajSAT RNA を強制的に発現させることで、組織中で起こる変化を培養環境で観察する系を樹立した。その結果、MajSAT RNA 発現細胞は足場のない場所での増殖や、細胞密度に捉われない無秩序な増殖など、癌細胞に見られる表現型を獲得することが分かった。さらに MajSAT RNA を発現させたまま 1 カ月間継続して培養した細胞を用いて、新たに蓄積した突然変異の数を次世代シーケンス解析によって調べたところ、MajSAT RNA を発現していない細胞よりも、ゲノム DNA に変異が多く蓄積していることが分かった。またミトコンドリア DNA についても、やはり



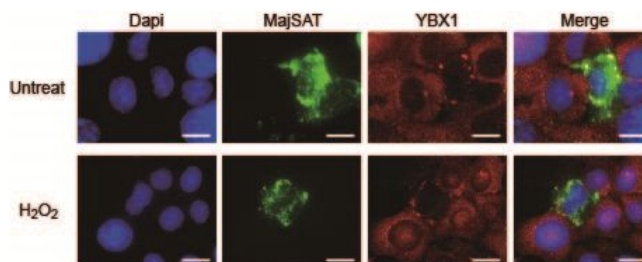
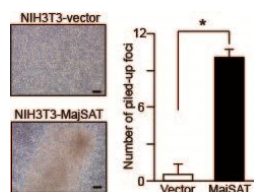
MajSAT RNA を発現する細胞の方で変異が多く、かつゲノムコピー数が減少していることが分かった。また染色体の分裂以上も惹起されることが染色で明らかとなった（前頁右下図）

（2）発癌ポテンシャル獲得機構への介入（標的分子の同定とレスキュー）

次に、MajSAT RNA 発現細胞で DNA 変異が蓄積するメカニズムを調べるために、MajSAT RNA と結合するタンパク質を質量分析法によって検索したところ、YBX1 という多機能タンパク質が同定された。YBX1 は通常時は細胞質に存在しているが、酸化ストレスなどのダメージ刺激を受けると核内に移動し、DNA 修復や転写調整などの役割を果たすことが知られている。MajSAT RNA は細胞質でこの YBX1 と結合することによって、ストレス刺激後の YBX1 の核内移行を阻害することが分かった。その結果、細胞内の酸化ストレスレベルは変わらないのに対して、塩基除去修復とよばれる DNA 修復機構の遅延が起こることが示された。またこれらの変化は MajSAT RNA 発現細胞に YBX1 を過剰に発現させ、核内移行機能を回復することによって、あるいは、MajSAT RNA と結合しない変異型の YBX1 を発現させることによってキャン

セルされることから、YBX1 の機能阻害は MajSAT RNA によって生じていることが示された。

（右図）反復配列 RNA が YBX1 蛋白と結合し細胞質に局在する図。



さらに、反復配列 RNA を発現するトランスジェニックマウスを作製して、kRas 変異マウスとの交配で膀胱癌の進展をみたところ、膀胱癌前がん病態である PanIN の形成が、Kras 変異単独に比べて反復配列 RNA が発現しているときのほうが早まることが確認された。

これは、反復配列 RNA の発現による DNA damage の蓄積が、kRas 変異単独の時に比べて早まり、したがって PanIN の形成は早まるものの、その後は反復配列 RNA が自然に発現してくるため癌化に関しては 大きくは変わらなかったと考えられた。

以上のことから、癌化の初期段階で発現してくる MajSAT RNA の存在によって、酸化ストレスなどで細胞に日常的に加わる DNA ダメージからの回復が遅延し、結果的にゲノムやミトコンドリア DNA の突然変異が蓄積されて、その後の細胞癌化を促進していることが示唆された。

（3）反復配列 RNA のユニークな高感度検出法の発明・樹立と、臨床検体を用いた応用：

マウスの反復配列に相当するヒト配列は HSATII とよばれるが、その血中での高感度検出による膀胱癌早期診断法を確立するべく検討を行った。すなわち反復する配列を高感度に検出するために TRAP 法と呼ぶ独特の方法を考案し、反復する RNA 配列を束ねて digital PCR で高感度に検出する方法をデザインした。この方法を用いて、HSATII RNA の高感度検出による膀胱癌スクリーニング法を確立し、現在多数検体を用いた有効性の検証に進んでいる。

（4）その他の RNA の応用：

さらに興味深いことに、膀胱癌組織でユニークには発現している非コード RNA として環状 RNA に着目した。直線状の通常の RNA をすべて RNase 処理して分解したのち、環状 RNA のみを集約して次世代シーケンシングにかけて、得られた配列から、どの遺伝子部分から発現してきた RNA かを推定した上で、これまでに報告のない環状 RNA の全長配列を決定した。非コード RNA 遺伝子座から出てくる環状 RNA で、これを用いた膀胱癌早期診断法の開発を目標に血中での検出を試みたが、おそらく発現量が極めて微小なため、じゅうぶんな感度で検出することができず、スクリーニング法としては現時点では感度の問題で困難であるが、組織内での発現状況は高感度 in situ hybridization を用いることで把握できるため、採取検体を用いた鑑別診断には応用できる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Sekiba K, #Otsuka M, Ohno M, Yamagami M, Kishikawa T, Seimiya T, Suzuki T, Tanaka E, Ishibashi R, Funato K, and Koike K. Pevonedistat, a first-in-class NEDD8-activating enzyme inhibitor, is a potent inhibitor of hepatitis B virus. *Hepatology* in press. doi: 10.1002/hep.30491.
2. Sekiba K, #Otsuka M, Ohno M, Yamagami M, Kishikawa T, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx-DDB1 interaction. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7(2):297-312. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.010.

3. Yamagami M, #Otsuka M, Kishikawa T, Sekiba K, Seimiya T, Tanaka E, Suzuki T, Ishibashi R, Ohno M, Koike K. ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells. *npj Aging Mech Dis.* 2018;4:11. doi: 10.1038/s41514-018-0030-6.
4. Kishikawa T, #Otsuka M, Suzuki T, Seimiya T, Sekiba K, Ishibashi R, Tanaka E, Ohno M, Yamagami M, Koike K. Satellite RNA Increases DNA Damage and Accelerates Tumor Formation in Mouse Models of Pancreatic Cancer *Mol Cancer Res.* 2018 Aug;16(8):1255-1262. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0139.
5. Sekiba K, #Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yamagami M, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels. *Oncotarget* 2018; 9(39):20953-20964. doi: 10.18632/oncotarget.25104.
6. Takata A, #Otsuka M, Kishikawa T, Yamagami M, Ishibashi R, Sekiba K, Suzuki T, Ohno M, Yamashita Y, Abe T, Masuzaki R, Ikenoue T, Koike K. RASAL1 is a potent regulator of hepatic stellate cell activity and liver fibrosis *Oncotarget* 2017 May 4;8(39):64840-64852. doi: 10.18632/oncotarget.17609. eCollection 2017 Sep 12. doi: 10.18632/oncotarget.17609.
7. Sekiba K, Yamagami M, #Otsuka M, Suzuki T, Kishikawa T, Ishibashi R, Ohno M, Sato M, Koike K. Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr 29;486(2):521-525. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.076.
8. Yoshikawa T, Wu JF, #Otsuka M, Kishikawa T, Suzuki N, Takata A, Ohno M, Ishibashi R, Yamagami M, Nakagawa R, Kato N, Miyazawa M, Han J, Koike K. Repression of miRNA Function Mediates Inflammation-associated Colon Tumorigenesis. *Gastroenterology* 2017 Feb;152(3):631-643. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.043.
9. Kishikawa T, #Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic process via the dysfunction of YBX1. *Nat Commun.* 2016;7:13006. doi: 10.1038/ncomms13006.
10. Kishikawa T, #Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. *JCI Insight* 2016;1(8):e86646. doi: 10.1172/jci.insight.86646.

〔学会発表〕(計6件)

1. 2017.9.1. 第9回RNAi研究会・第4回細胞外小胞学会 シンポジウム (招待講演)
リピーターRNAの異常発現をめぐる膵がんの基礎と臨床. 大塚基之
2. 2016.2.19. 25th conference of the Asian Pacific Association for the Study of Liver (APASL) Tokyo Post Graduate Course B Motoyuki Otsuka miRNA and Liver Disease
3. 2016.5.23. DDW2016 San Diego poster (Mo1475)
Arginine Depletion May Be a Therapeutic Option Against Aggressive Hepatocellular Carcinoma With Reduced Mir122 Levels Motoyuki Otsuka, Takahiro Kishikawa, Takeshi Yoshikawa, Motoko Ohno, Kazuhiko Koike
4. 2017.5.6. DDW2017 Chicago Poster Sa1552
RASAL1 IS A POTENT REGULATOR OF HEPATIC STELLATE CELL ACTIVITIES AND LIVER FIBROSIS Motoyuki Otsuka, Akemi Takata, Kazuma Sekiba, Tatsunori Suzuki, Mari Yamagami, Rei Ishibashi, Takahiro Kishikawa, Motoko Ohno, Tsuneo Ikenoue, Kazuhiko Koike
5. 2017.5.20. The 37th Annual Meeting of the Korean Society of Nephrology Seoul Korea Basic Science Session Regulatory RNA Invited keynote lecture Novel pathological role and clinical usage of repetitive non-coding RNAs in pancreatic cancer Motoyuki Otsuka
6. 2017.9.11. Tumor heterogeneity and Network (THEN) Research Center 2017 Annual Symposium Kyungpook National University Daegu Korea Pathological role and clinical usage of repetitive RNAs in pancreatic cancer Motoyuki Otsuka

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：伊地知 秀明

ローマ字氏名：(IJICHI, Hideaki)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 70463841

(2)研究分担者

研究分担者氏名：前田 慎

ローマ字氏名：(MAEDA, Shin)

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40415956

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。