

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08381

研究課題名（和文）大腸癌におけるPolyadenylation関連遺伝子の検討

研究課題名（英文）Investigation of polyadenylation-associated genes in colorectal cancer

研究代表者

濱屋 寧（Hamaya, Yasushi）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20436968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：結腸直腸癌臨床検体でpolyadenylation関連因子を免疫組織化学法で評価した。Polyadenylation関連因子のうちPABPN1とNUDT21の過剰発現が多く症例で認められた。引き続き大腸癌細胞株をもちいてPABPN1またはNUDT21のノックダウン細胞を作成した。PABPN1またはNUDT21のノックダウンにより細胞増殖の抑制が認められた。RNAシーケンスによりpolyadenylationの異常がPABPN1またはNUDT21のノックダウン細胞でおきたことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌においてNUDT21、PABPN1の過剰発現が腫瘍増殖に関連している可能性が本研究から考えられた。とくにPABPN1は肺癌や膀胱癌では癌部で発現が低下していることが報告されていたため、大腸癌におけるPABPN1の過剰発現は特異的と考えられる。RNAシーケンスの結果をさらに発展させ、大腸癌のPABPN1の転写後調節に与える影響が将来的に明らかになれば、診断および治療法などのバイオマーカーの開発につながり大腸がん診療に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the expression of polyadenylation-related factors in colorectal cancer by immunohistochemistry. Overexpression of PABPN1 and NUDT21 was observed in many cases. Subsequently, PABPN1 or NUDT21 knockdown colorectal cell lines were established. Suppression of PABPN1 or NUDT21 in colon cancer cell lines inhibited proliferation. RNA sequencing revealed that alternative polyadenylation occurred in PABPN1 or NUDT21 knockdown colorectal cell lines.

研究分野：消化器病学

キーワード：大腸癌 転写後調節 Polyadenylation 3' 非翻訳領域

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対しては臨床病理学的な進行度により治療法が決定されているが、予期しない早期再発を経験することも多い。予後予測や経過観察に CT 検査などの画像診断や腫瘍マーカーが臨床的に用いられているが、十分とはいえない。

大腸癌では様々な mRNA 発現の異常がおこっているが、最近では microRNA(miRNA)による転写後調節に関する研究が広く行われている。miRNA 発現の異常が癌でおこっていることは広く知られているが、その miRNA の結合部位である mRNA の 3' UTR の変化は転写後調節の観点から大きな役割をもち注目を集めている。mRNA の 3' UTR の長さは数百から数千塩基におよぶ。半数以上の遺伝子は 2 個以上の polyadenylation signal となる配列をもつ。前駆体 mRNA のプロセシング過程で通常と異なる polyadenylation signal の選択がおこり(Alternative polyadenylation (APA))、3' UTR の長さが異なった mRNA 発現がおこることが知られている。3' UTR には RNA 結合蛋白や miRNA が結合するため、3' UTR を介した転写後調節は細胞の蛋白発現に重要な役割をもつ。例えば通常より短縮した 3' UTR をもつ mRNA は RNA 結合蛋白や non-coding RNA(miRNA や lncRNA)の結合部位を欠くため転写後調節が変化し、その結果としてタンパク質発現が変化する(左図)。

以前から癌細胞株と正常組織での APA を検討した報告が多くなされていたが様々な癌細胞株で APA を包括的に検討した報告が 2009 年になされた。癌細胞株では正常組織と比べると APA により様々な oncogene での 3' UTR の短縮が認められることや 3' UTR の短縮により mRNA は miRNA の制御を逃れ浸潤、転移や細胞増殖などが変化するなどが報告されていた。

APA の原因は長い間、不明であったが徐々に解明されつつあった。近年の APA に関する基礎的な検討により、癌や随伴する炎症によってもたらされる低分子リボヌクレオ蛋白や RNA 切断因子などの polyadenylation 関連因子(CFI、PABPN1、CTSF、CPSF など)の発現異常が APA と関連していることが解明されてきていた。しかし、polyadenylation 関連因や APA の検討は in vitro での検討が大多数であった。肺癌、前立腺癌や乳癌などでの報告はなされていたが、大腸癌における検討はごく限られており、それらの臨床的な位置づけは依然不明であった。

2. 研究の目的

そこで大腸癌における polyadenylation 関連因子の発現並びにそれら因子によりもたらされる mRNA の APA を検討し、それらが化学療法や予後予測因子となりえるか検討することにした。転写後調節に関する研究については現在では主に miRNA 発現や RNA 結合蛋白についての検討が広く行われており、特に miRNA は癌の悪性度や抗癌剤感受性を予測する新たなバイオマーカーとして将来的な臨床応用が期待されている。したがって miRNA が結合する 3' UTR の変化である APA を検討することは、miRNA 研究と同様に臨床的意義が大きいと判断し、転写後調節に関わる因子のうちで、広く検討されている miRNA だけではなく miRNA の結合部位である 3' UTR の変化 (APA) を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

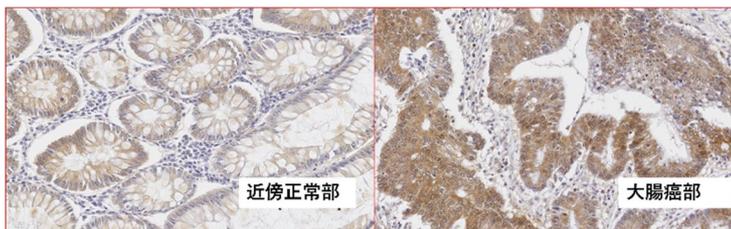
臨床研究の対象は、当院で外科治療や内視鏡治療をうけ病理学的に診断がなされているステージ 0~IV の大腸癌患者とした。内視鏡検査や外科治療時に病変部と近傍正常部から採取し新鮮凍結検体についても保管されている症例を対象とした。Polyadenylation 関連因子をホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本サンプルを用いて免疫組織化学染色でタンパク質発現を行った。同一患者で正常部と癌部を比較した。

細胞株の実験には SW480、HCT-116、RKO、HT-29 などの代表的な大腸癌細胞株を用いた。NUDT21 の polyadenylation 関連因子のノックアウトは CRISPR-CAS9 法で行った。市販のレンチウィルスベクターを用いて polyadenylation 関連因子のノックダウンも行った。ピューロマイシンセレクション、レポーター遺伝子発現でシングルセルセレクションし、各細胞で複数のクローンを樹立した。細胞増殖はレサズリンアッセイや clonogenic assay を用いて評価した。APA の評価は 3' UTR を標的とした RNA シーケンスを用いて評価した。

4. 研究成果

(1)大腸癌臨床検体を用いた検討結果

質の良い RNA の抽出ができたステージ I/II/III/IV 14/23/28/17 例、合計 81 症例の大腸癌患者の polyadenylation 関連因子を免疫組織化学染色で行った。PABPN1 と NUDT21 の癌部での発現を近傍の正常部と比較したが大多数の症例で発現亢進が認められた(右図、PABPN1 発現を癌部と近傍正常部で評価)。



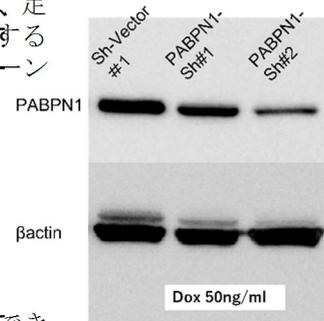
なお臨床病理学的な因子との関連を検討したがステージ I の患者においても発現が亢進が認められたため、進行度や予後との関連は認められなかった。

(2) 大腸癌細胞株を用いた検討

大腸癌細胞株でも臨床検体と同様に PABPN1 および NUDT21 のタンパク発現の亢進が認められた。最初に NUDT21 を CRISPR-CAS9 法でノックダウンした。両アレルのノックアウトがなされると細胞の生存率が極端に低下しクローンを得ることができなかった。そのため片アレルのコンディショナルノックアウトとしたがやはり生存率が極端に低下し、RNA シーケンスや薬剤感受性の評価にそれらの細胞を用いることができなかった。

引き続きノックダウンによる発現低下を行い細胞増殖に与える影響を評価した。ノックアウトで著明に細胞死が認められたため、定常発現ではなくドキシサイクリンによる発現誘導システムを有するレンチウイルスベースの shRNA 発現ベクターを用い複数のクローンを得ることができた(右図、ドキシサイクリン投与による PABPN1 shRNA 発現により RKO 細胞で PABPN1 タンパク発現が低下した)。

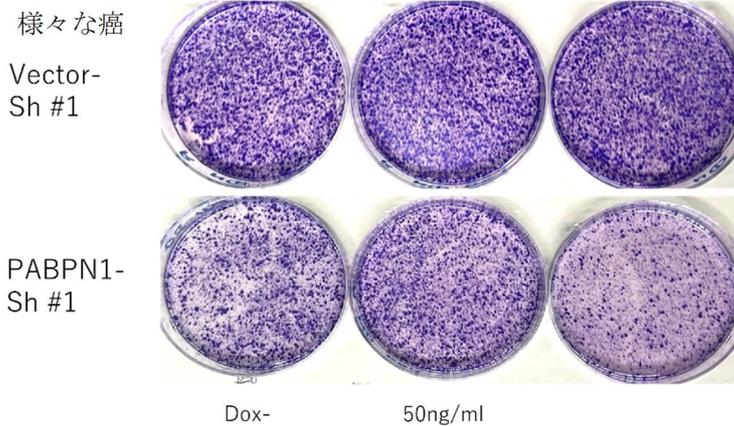
WBによるPABPN1発現



様々な細胞で数クローンのノックダウン細胞を作成することができた。

それら細胞を用いて細胞増殖に NUDT21 または PABPN1 の発現低下が与える影響を検討したところ、細胞増殖の抑制が認められた(下図、PABPN1 ノックダウンした RKO 細胞の増殖を clonogenic assay を用いて比較した)。

Clonogenic Assay



細胞株にトポイソメラーゼ阻害薬を投与すると PABPN1 に関連した APA が誘導されるとの報告が過去にあったため PABPN1 のノックダウン細胞にトポイソメラーゼ阻害薬 SN-38 を投与したが、コントロールと比較して薬剤感受性は変化が認められなかった。

NUDT21 または PABPN1 ノックダウン細胞とコントロール細胞を用いて RNA シーケンスにより APA を評価した。オリゴ(dT)プライマーを用いた cDNA 作成後にランダムプライマーを用いて二本鎖の cDNA を合成しシーケンスを 2.1Gb のリードを行った。過去の報告になかった APA を含め複数の遺伝子の APA を検出することができた。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------