

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 2月29日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591679

研究課題名(和文) HMGA1の新規機能によるエストロゲン受容体の発現制御—新たな乳癌治療をめざす—

研究課題名(英文) Regulation of Estrogen Receptor Alpha through novel function of HMGA1a.—Towards a novel breast cancer therapy—

研究代表者

大江 賢治 (OHE KENJI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・准教授

研究者番号：30419527

研究成果の概要(和文)：HMGA1aはDNA結合性転写調節因子であるが、配列特異的RNA結合性スプライシング誘導因子としての新機能をもつ。その特異的RNA結合配列を指標に標的遺伝子を検索したところ、乳癌に関わるエストロゲン受容体(ER α)が有力な候補として見つかった。ER α エクソン1の5'スプライス部位の33塩基対上流にあるRNA配列にHMGA1aが結合し、MCF-7乳癌細胞において、ER α のアイソフォームであるER α 46 mRNAの発現を誘導した。HMGA1aのRNA結合を阻害する「おとり」RNAはER α 46 mRNAの発現を阻害した。ER α エクソン1のHMGA1aのRNA結合部位は、偽5'スプライス部位に隣接しており、正規5'スプライス部位に結合するはずのU1snRNPがHMGA1aにより偽5'スプライス部位に捕捉されてしまい、正規5'スプライス部位の機能喪失によりER α エクソン1除外、選択的スプライシングによるER α 46 mRNAの発現につながることを証明した。HMGA1aのRNA結合を阻害する「おとり」RNAによるER α 46アイソフォーム蛋白の発現減少を確認し、「おとり」RNAの安定発現MCF-7細胞株は、卵巣摘出、エストロゲンペレット埋め込みヌードマウスに細胞移植したところ、移植細胞の腫瘍増殖が促進された。ER α 46アイソフォームは、全長ER α のエストロゲン応答性を阻害することが知られているが、今回、HMGA1aのRNA結合を阻害する「おとり」RNAが、ER α 46アイソフォームを減少させ、MCF-7細胞のエストロゲン応答性を改善した結果は、ER α 陽性乳癌細胞のエストロゲン抵抗性獲得のしくみの解明につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：HMGA1a, known as a DNA-binding transcription factor, was found to induce alternative splicing through novel sequence-specific RNA-binding. We found an HMGA1a RNA-binding site in Estrogen Receptor alpha (ER α) pre-mRNA. HMGA1a binds an RNA sequence 33 nucleotides upstream the 5' splice site of ER α exon 1. Interestingly, HMGA1a induces ER α 46 isoform mRNA expression by exon skipping of ER α exon 1, and an RNA decoy of the HMGA1a RNA binding site inhibits ER α 46 isoform mRNA expression in cultured MCF-7 mammary carcinoma cells. The HMGA1a RNA binding site in ER α exon 1 is located adjacently upstream a pseudo 5' splice site. Thus, HMGA1a traps U1 snRNP to this upstream 5' splice site and leads to dysfunction of the authentic 5' splice site of ER α exon 1. In this way, exon skipping is induced and consequent expression of ER α 46 isoform is achieved through alternative splicing. Confirming the decrease of ER α 46 protein expression in MCF-7 cells expressing the RNA decoy of HMGA1a RNA binding site, a stable transfectant of MCF-7 cells was established. This stable transfectant was implanted subcutaneously to ovariectomized nude mice with estrogen pellet, resulting in attenuated growth of the implanted cells. Since ER α 46 isoform protein is known to inhibit the estrogen response of full length ER α , the findings shown here “an RNA decoy of HMGA1a improves estrogen response of MCF-7 cells by regulating alternative splicing of ER α ” will give us a clue in deciphering the mechanism of estrogen resistance in ER α positive mammary carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 23 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：内分泌外科学・エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

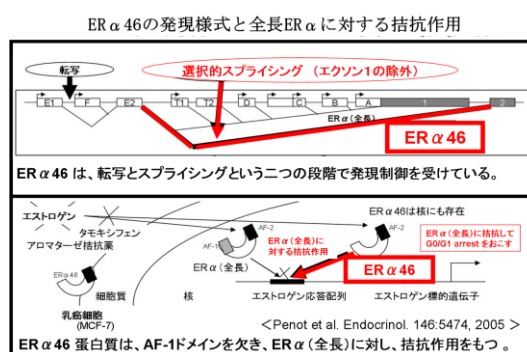
乳癌は、女性の癌罹患率では第一位であり、エストロゲン受容体 α (ER α)が関与していることは明らかである。内分泌治療は効果的であるが、女性ホルモンに対する拮抗作用（タモキシフェンなど）や枯渇作用（アロマターゼ阻害剤）を利用した治療という点では、受容体(ER α)から信号伝達を受けた後の癌細胞内に異常が生じた症例（進行例、治療抵抗性の生じた症例）に効果はなく、より病因に踏み込んだ治療が待望されている。

申請者は、孤発性アルツハイマー病特異的な異常スプライシングを引き起こす HMGA1a 蛋白質の配列特異的 RNA 結合機能の新たな標的遺伝子を探索する過程で、ER α 遺伝子が有力な候補であることを見いだした。HMGA1a の乳癌治療抵抗性における新たな分子機構、治療の可能性に発展する研究計画を立案した。

2. 研究の目的

HMGA1a 蛋白質の選択的スプライシング誘導因子としての機能による ER α 46 アイソフォームの発現機構を明らかにする。

ER α 46 アイソフォームは、転写とスプライシングの両段階で選択的制御を受けており、複雑であるが、その発現制御に関する研究は注目を浴びつつある。ER α 46 は、乳癌由来 MCF-7 細胞の核内に存在し、ER α のリガンド非依存性転写活性化ドメインを欠き、全長 ER α の転写活性を阻害する(図参照)。増殖抑制時（コンフルエント状態）に高発現する [Penot et al. Endocrinol. 146: 5474, 2005]。HMGA1 (旧称 HMG-I/Y) は、種々の癌において高い発現を認める癌遺伝子産物で、乳癌において悪性度と相関している。そこで、RNA の分子生物学的手法を駆使して、HMGA1a の選択的スプライシングによる ER α 46 発現機序、細胞増殖への影響を検討した。



3. 研究の方法

- (1) RNA ゲルシフトによる HMGA1a の ER α エクソン 1 への配列特異的 RNA 結合の確認。
- (2) RNAi ベクターに RNAi 配列の代わりに HMGA1a RNA 結合配列とマイクロ RNA の核内移行配列を付加した発現プラスミドを「おとり」RNA として MCF-7 乳癌細胞株に遺伝子導入し、選択的スプライシングによる ER α 46 の発現を検討する。
- (3) ER α エクソン 1 除外の pre-mRNA 基質を作製し、*in vitro* スプライシングにおける「おとり」RNA (2' -O-メチル RNA を合成) による効果を検討する。
- (4) RNA-RNA 結合を促進するソラレン UV クロスリンキングにより U1snRNP の ER α エクソン 1 への結合と HMGA1a の影響を検討する。
- (5) RNaseH と正規と偽 5' スプライス部位に対するアンチセンス DNA により、U1snRNP の結合をマッピングし、HMGA1a の影響を検討する。
- (6) HMGA1a の「おとり」RNA 配列の MCF-7 安定発現細胞株を作製し、ウエスタン解析による ER α 46 蛋白レベルを確認したのち、卵巣摘出、エストロゲンペレット埋め込んだ BALB/c ノードマウスに細胞移植し、腫瘍体積の測定による細胞増殖への影響を検討した。

4. 研究成果

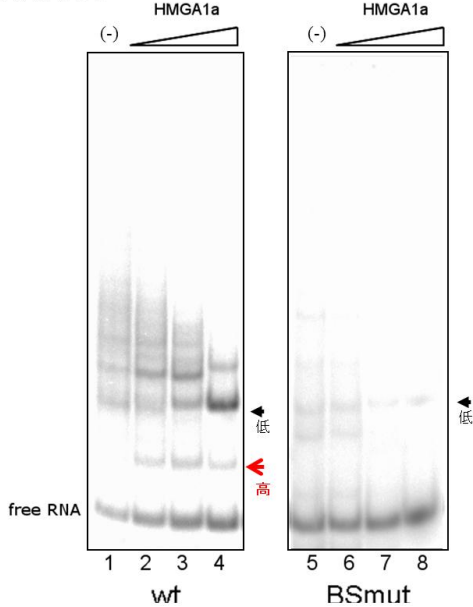
(1) ER α エクソン1の5' スプライス部位の33塩基对上流にあるRNA配列にHMGA1aが結合することをRNAゲルシフトによって確認した。

HMGA1a RNA 結合部位 Wt: GCGGCUACACG

HMGA1a RNA 結合部位変異 BSmut: GCCGAGAUACG

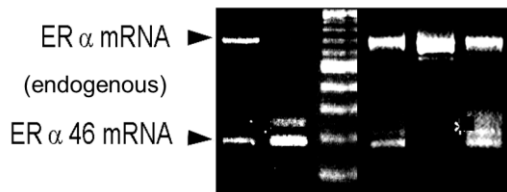
高親和性の結合部位(高)と低親和性のHMGA1a結合部位(低)が存在することが示唆された。

RNA-ゲルシフト

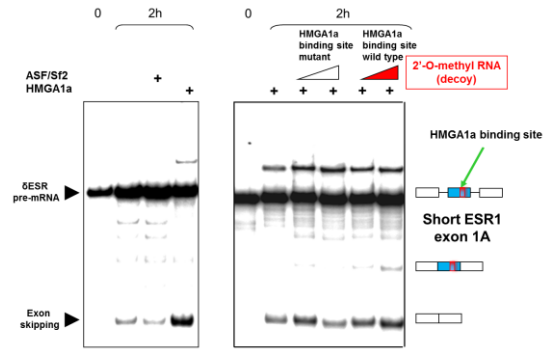


(2) HMGA1aは、ER α のアイソフォームであるER α 46 mRNAの発現を誘導し、HMGA1aのRNA結合を阻害する「おとり」RNAは効率よくER α 46 mRNAの発現を阻害することをMCF-7乳癌細胞において証明した。(1)の結果と合わせ、HMGA1aがER α エクソン1の5'スプライス部位の33塩基对上流にあるRNA配列に結合し、エクソン除外により、ER α 46 mRNAを選択的スプライシングにより誘導することが示唆された。

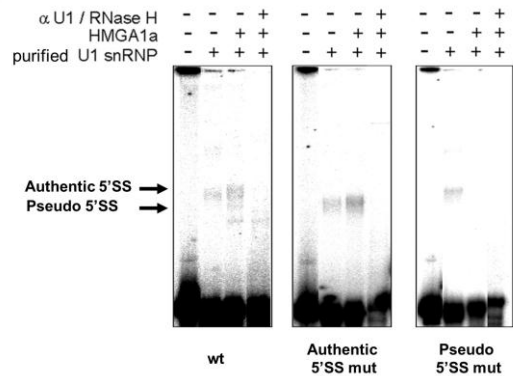
Nested RT-PCR	vector	+	+	+
	HMGA1a	+	+	+
HMGA1a「おとり」mut			+	+
HMGA1a「おとり」wt				+



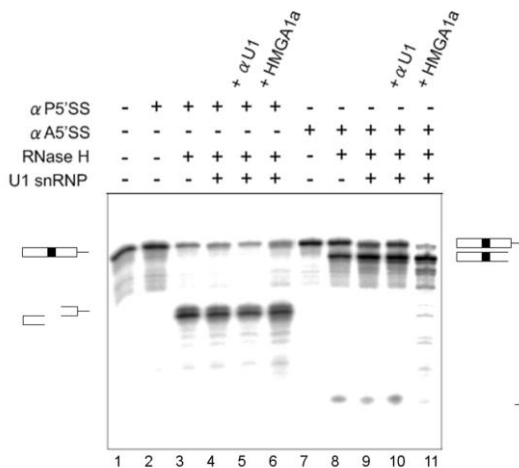
(3) *In vitro* スプライシングの系においても、HMGA1aがエクソン除外を誘導し、HMGA1aに対する「おとり」RNAによりエクソン含有が誘導された。



(4) ER α エクソン1のHMGA1aのRNA結合部位は、偽5'スプライス部位に隣接しており、ソラレンUVクロスリンクによるpre-mRNAとU1snRNAの結合を検討したところ、HMGA1aは、偽5'スプライス部位にU1snRNAを結合させ、正規5'スプライス部位のU1snRNAの結合を減弱させた。

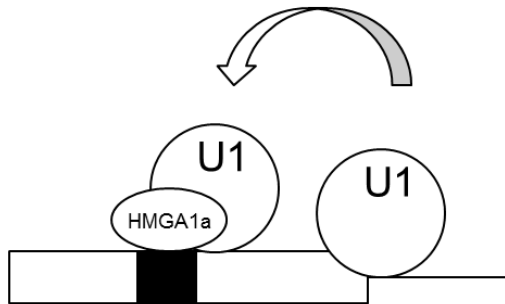


(5) RNaseHプロテクション解析により、通常の正規5'スプライス部位に結合するはずのU1 snRNPがHMGA1aにより偽5'スプライス部位に捕捉されてしまう。



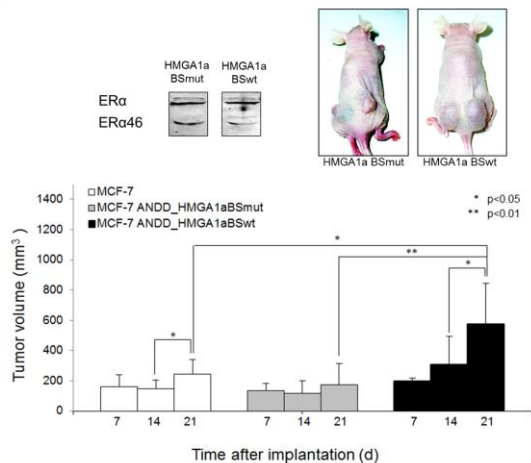
以上の結果より、HMGA1aによる、U1snRNPの偽5'スプライス部位への補足により、正規5'スプライス部位の機能喪失、ER α エクソン1除外、ER α 46 mRNAの発現につながる(モデル図参照)。

HMGA1によるU1snRNPの上流偽5'スプライス部位への補足



モデル図

(6) MCF-7細胞において、HMGA1aのRNA結合を阻害する「おとり」RNAによるER α 46アイソフォーム蛋白の発現減少を確認し、「おとり」RNAの安定発現MCF-7細胞株を作製し、卵巣摘出、エストロゲンペレット埋め込みヌードマウスに細胞移植したところ、移植細胞の腫瘍増殖が促進された。



以上より、HMGA1aの配列特異的RNA結合により、全長ER α と拮抗することが知られているER α 46が誘導され、HMGA1aの「おとり」RNAが、ER α 46誘導を抑制し、MCF-7乳癌細胞のエストロゲン依存性増殖が促進されることが示された。

HMGA1aの配列特異的RNA結合が、エストロゲン依存性乳癌細胞増殖に影響を与えることから、ER α 陽性エストロゲン抵抗性乳癌治療への新たな戦略が切り開けるものと信じる。

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8件)

①Honma N, Saji S, Hirose M, Horiguchi SI, Kuroi K, Hayashi SI, Utsumi T, Harada N. Sex steroid hormones in pairs of tumor and serum from breast cancer patients and pathobiological role of androstene-3 β , 17 β -diol. *Cancer Sci.* 102:1848-1854, 2011. 査読あり.

②Tsuruno C, Ohe K*, Kuramitsu M, Kohma T, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Okuma K* Equal contribution to first author and corresponding author. HMGA1a is involved in specific splice site regulation of human immunodeficiency virus type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406:512-517, 2011. 査読あり.

③Morikawa T, Manabe T, Ito Y, Yamada S, Yoshimi A, Nagai T, Ozaki N, Mayeda A. The expression of HMGA1a is increased in lymphoblastoid cell lines from schizophrenia patients. *Neurochem Int.* 56(6-7):736-9, 2010. 査読あり.

④Ohe K, Mayeda A. HMGA1a trapping of U1 snRNP at an authentic 5' splice site induces aberrant exon skipping in sporadic Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Biology* 30:2220-2228, 2010. 査読あり.

⑤Suzuki M, Ishida H, Shiotsu Y, Nakata T, Akinaga S, Takashima S, Utsumi T, Saeki T, Harada N. Expression level of enzymes related to in situ estrogen synthesis and clinicopathological parameters in breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 113:195-201, 2009. 査読あり.

⑥Honma N, Takubo K, Sawabe M, Arai T, Akiyama F, Sakamoto G, Utsumi T, Yoshimura N, Harada N. Alternative use of multiple exons 1 of aromatase gene in cancerous and normal breast tissues from women over the age of 80 years. *Breast Cancer Res.* 11(4):R48, 2009. 査読あり.

⑦前田明, 眞部孝幸, 大江賢治 がん遺伝子産物HMGA1aがひき起こす孤発性アルツハイマー病の異常スプライシング. 蛋白質核酸酵素(12月増刊号)54:2245-2250, 2009. 査読なし.

⑧ Ohe K, Tamai KT, Parvinen M, Sassone-Corsi P. DAX-1 and SOX6 molecular interplay results in an antagonistic effect in pre-mRNA splicing. *Developmental Dynamics* 238: 1595-1604, 2009, 査読あり.

〔学会発表〕(計9件)

①Kenji Ohe. Regulating Cancer-Associated Alternative Splicing by Decoy RNA.

第70回 日本癌学会学術総会(2011.10.3 名古屋国際会議場)

②Kenji Ohe, Eiji Sakashita, Hitoshi Endo, Akila Mayeda. A Novel Sequence Signal That Promotes Pre-mRNA Splicing without U1 snRNP.

第16回 RNA society 国際会議(2011.6.15 国立京都国際会館)

③大江 賢治、内海 俊明、前田 明 HMG1A1 に対する「おとり」RNA は、エストロゲン受容体 α の異常スプライシングを是正する。

第18回 日本ステロイドホルモン学会年会。(2010.11.27 名古屋市、WINC AICHI)

④Kenji Ohe, Toshiaki Utsumi, Akila Mayeda. HMG1A1 induces aberrant splicing of Estrogen Receptor α in MCF-7 breast cancer cells.

第6回 国際ホルモン依存性癌シンポジウム(2010.9.12 千葉、シエラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル)

⑤大江 賢治、鶴野 親是、倉光 球、高浜 洋一、浜口 功、大隈 和、前田 明。ヒト免疫不全ウイルス特異的なスプライシングに必要な新しい宿主因子の解析。

第12回 日本RNA学会年会。(2010.7.27 東京、学術総合センター、一ツ橋記念講堂)

⑥ Kenji Ohe, Toshiaki Utsumi, Akila Mayeda. HMG1A1 induces aberrant splicing of Estrogen Receptor α in MCF-7 breast cancer cells.

14th International Congress of Endocrinology (2010.3.26 京都市、国立京都国際会館)

⑦Kenji Ohe, Toshiaki Utsumi, Akila Mayeda. Oncogenic Product HMG1A1 Might Function as Aberrant Splicing Inducer of Estrogen Receptor α in Breast Cancer.

2009 EUKARYOTIC mRNA PROCESSING meeting (Cold Spring Harbor Laboratory meeting) (2009.8.18. ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバー)

⑧大江 賢治、内海 俊明、前田 明 癌遺伝子産物 HMG1A1 が、乳癌においてエストロゲン受容体 α の異常スプライシングの誘導因子として機能しているかもしれない!

第11回日本RNA学会年会(2009.7.27 新潟市)

⑨大江 賢治 エストロゲン受容体 α 46 アイソフォーム発現に対する HMG1A1 の影響

第82回日本内分泌学会学術総会(2009.4.22 前橋市)

〔その他〕

(1) ホームページ等

<http://researchmap.jp/ohekenji/>

(2) 雑誌論文⑤ (Molecular and Cellular Biology 誌に発表した HMG1A1 のスプライセオソームとの関わりを解析した成果)において、孤立性アルツハイマー病における意義を伝えた新聞記事。

2010年4月13日(火) 朝日新聞、読売新聞、中日新聞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大江 賢治 (OHE KENJI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・准教授

研究者番号：30419527

(2) 研究分担者

内海 俊明 (UTSUMI TOSHIAKI)

藤田保健衛生大学・医学部乳腺外科・教授

研究者番号：10176711

(3) 連携研究者

前田 明 (MAYEDA AKILA)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：50212204