

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 5 月 25 日現在

機関番号：16401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21790280
 研究課題名（和文）細胞の腫瘍化及びウイルス増殖に関する非翻訳 RNA の産生調節機構の解明
 研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms of generating non-coding RNA involved in tumorigenesis and virus proliferation.

研究代表者
 坂本 修士 (SAKAMOTO SHUJI)
 高知大学・教育研究部医療学系・助教
 研究者番号：80397546

研究成果の概要（和文）：

1. 肝細胞がんの新たな腫瘍化促進機構として細胞増殖因子E2F1, 2がNF90-NF45複合体の発現を増加させ、増加したNF90-NF45ががん抑制microRNAであるmiR-7の産生を抑制することで腫瘍化が促進するモデルを提唱することができた。
2. 個体レベルにおいてNF90は核内ミトコンドリア遺伝子や筋繊維遺伝子のマスター因子であるPGC-1の翻訳を抑制し、その結果としてミトコンドリア生合成や筋繊維形成に影響するのではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

1. We have proposed a novel tumorigenic model in which NF90-NF45 complex raised by E2F1 and 2 transactivators impairs the generation of miR-7 which is known to be an anti-oncomiR, resulting in a promotion of tumorigenesis in hepatocellular carcinoma.
2. We found that an overexpression of NF90 causes muscular atrophy accompanied with mitochondrial disruption via NF90-induced translational repression of nuclear-encoded mitochondria-related proteins such as PGC-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：microRNA, NF90-NF45, 肝細胞がん, プロモーター解析, トランスジェニックマウス, 筋組織, ミトコンドリア空胞変性, PGC-1

1. 研究開始当初の背景

(1) MicroRNA (miRNA)は21-23塩基からなる小分子の非翻訳RNAである。miRNAは相補

的、一部相補的なメッセンジャーRNA (mRNA)の3'非翻訳領域に結合しそのmRNAの翻訳を抑制する。miRNAはその機能を通じ細胞の増殖、分化、アポトーシスに関与するため、多

くの疾患の発症との関連性が示唆されている。

(2) miRNA と疾患発症という点においては、がんとの関連性がよく研究されている。これまでに様々な臓器由来のがん組織を用いて miRNA のアレイ解析が行われ、多くの miRNA の発現ががん組織において低下していることが分かってきた。このような miRNA はがん遺伝子を標的としており、通常はがん抑制因子として機能していると考えられている。一方、がん組織における miRNA の発現低下の機構については不明な点が多く残されている。

(3) 我々はこれまでに核局在性の二本鎖 RNA 結合蛋白質である Nuclear Factor 90 (NF90) とその結合パートナーである NF45 の複合体 (NF90-NF45) が miRNA の生合成を負に制御することを見出した (Sakamoto et al MCB 2009 13: 3754-69)。また興味深いことに、肝細胞がん患者の手術標本を用いて NF90-NF45 の発現解析を行ったところ、非がん部と比較しがん部で NF90-NF45 の発現が顕著に高いことが分かってきた。このことより、がん組織における miRNA の発現低下に NF90-NF45 が関与し、それによりがん遺伝子の発現が増加することで、細胞の腫瘍化が促進するのではないかと想定された。

(4) ウイルス感染時においてウイルス DNA や RNA から産生される小分子の非翻訳 RNA はウイルス自身の複製に関与することが知られている。アデノウイルス (Ad) 由来の DNA から生じる Viral associated RNA (VA RNA) は Dicer によりプロセッシングされ小分子 RNA (svaRNA) となる。この svaRNA は宿主細胞の RNA 干渉機構に必要な因子群を占有することで宿主の RNA 干渉によるウイルス感染防御を抑制する。興味深いことに NF90 は Ad 由来の VA RNA と結合することが知られている。従って、NF90 は VA RNA との結合を介して Ad の増殖に関与するのではないかと想定された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では主に肝細胞がんの細胞株と手術標本を用いて、上記の miRNA を介した NF90-NF45 による細胞の腫瘍化機構に関して検証を行った。

(2) 本研究では Ad 増殖に NF90 の発現が及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) NF90-NF45 による細胞の腫瘍化機構の解

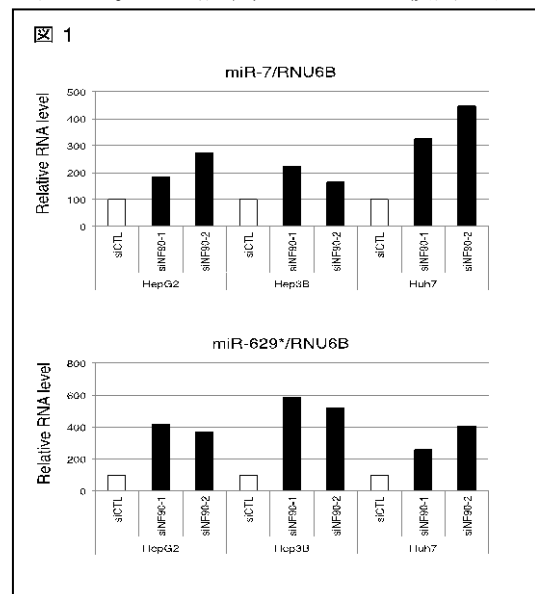
明に関しては、主に以下の方法により解析を行った。

- 肝細胞がん細胞株 Huh7 細胞を用い、NF90 をノックダウンした際に発現が変動する miRNA をアレイ解析により網羅的に解析する。
- 肝細胞がんのがん部における NF90 の発現増加メカニズムを NF90 遺伝子の転写調節機構に着目し解析を行う。具体的な方法としては主にルシフェラーゼ活性を指標にしたプロモーターアッセイ及びゲルシフトアッセイなどを用いる。
- 個体レベルにおける NF90-NF45 の生理機能 (腫瘍化促進を含む) を検証するために、NF90-NF45 が過剰発現したマウス (NF90-NF45 dbTg マウス) を作成し表現型の解析を行う。その過程において我々は NF90 及び NF45 をそれぞれ単独で過剰発現するマウス (NF90 Tg 及び NF45 Tg マウス) を作成した。これらのマウスを用いて、NF90-NF45 の dbTg マウスの作出を試みる。それと同時に NF90 Tg 及び NF45 Tg マウス各々の表現型の解析を行う。

(2) NF90 の発現が Ad 感染に及ぼす影響を検討するために、ヒト胎児腎細胞株 293 細胞を用いて NF90 を過剰発現もしくはノックダウンさせた後 Ad を感染させ、増殖率は Ad ゲノム DNA 量を PCR 法で測定することにより解析する。

4. 研究成果

(1) 野生型及び NF90 をノックダウンした Huh7 より RNA を調整し、miRNA のアレイ解析を行った。その結果、シグナルが検出可能で

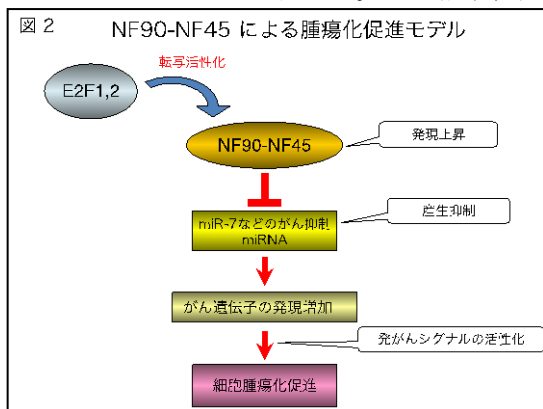


コントロールと比較し2倍以上のシグナル強度の増加が確認された miRNA は 16 種類であった。中でも miR-7 と miR-629* の増加は顕著であった。これらの miRNA に関してはリアルタイム PCR 法で確認実験を行った。その結果、様々な肝細胞がん細胞株 (Huh7, HepG2, Hep3B) において NF90 のノックダウンにより miR-7 と miR-629* の発現が顕著に増加することが分かった (図 1 黒バー)。

これまでの報告により miR-7 は上皮成長因子受容体 (EGFR) やアポトーシス抑制因子 (Bcl-2) などを標的とするがん抑制 miRNA として知られている。そこでこの miR-7 に着目しさらに解析を進めた。まず肝細胞がんの手術標本を用いて miR-7 の発現解析を行った。その結果、がん部で NF90-NF45 の発現が顕著に増加している手術標本において miR-7 の産生が低下する傾向にあることが分かった。また NF90-NF45 を過剰発現させたヒト胎児腎細胞株 293 細胞において miR-7 の初期転写産物 (pri-miR-7) の蓄積が確認された。成熟型 miRNA は pri-miRNA がプロセッシングされることにより産生される。我々は以前 NF90-NF45 が pri-miRNA のプロセッシングを抑制し miRNA 生合成を負に制御することを見出している (Sakamoto et al MCB 2009 13: 3754-69)。従って、NF90-NF45 過剰発現 293 細胞における pri-miR-7 の蓄積は、NF90-NF45 による pri-miR-7 のプロセッシングの抑制によるものではないかと考えられた。

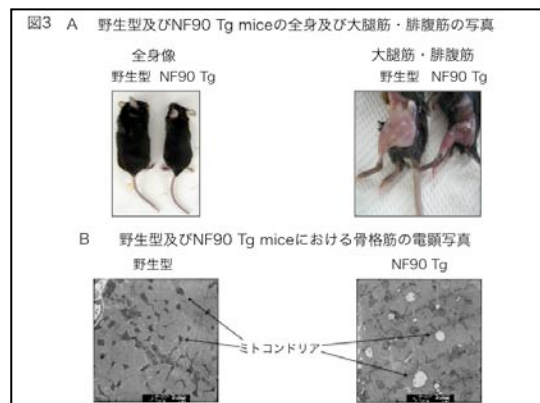
これらの知見をまとめると、肝細胞において NF90-NF45 の発現が増加するとがん抑制 miRNA である miR-7 の産生が低下し、腫瘍化が促進する (図 2) のではないかと考えられた。

(2) 肝細胞がんの手術標本における NF90 の発現増加は RNA レベルで確認される。そこで、NF90 遺伝子のプロモーター領域に着目し解析を行った。まず肝細胞がんの細胞株 Huh7 細胞における NF90 遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法により同定した。次に同定した転写開始点をもとに Huh7 細胞を用いてプロモーターアッセイを行った。その結果、転



写開始点上流-52 から+3 領域が本遺伝子の転写に重要であることが明らかとなった。この領域にはがん抑制遺伝子 Rb の標的である細胞増殖因子 E2F の結合モチーフが存在する。そこで Huh7 細胞の核抽出液を用いて-52 +3 領域内の E2F モチーフをプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。その結果、特異的なバンドシフトを検出することができた。また E2F1 及び 2 の抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行ったところ、この特異的バンドが E2F2 抗体を用いた場合は上部にシフトし、E2F1 抗体の場合は減少することが分かった。このことから E2F1, 2 が NF90 遺伝子の-52 +3 領域に結合し転写を活性化している可能性が考えられた。実際、E2F1 及び 2 をダブルノックダウンした Huh7 細胞においては内在性の NF90 の発現が RNA レベルで低下することが確認された。従って、肝細胞がんにおける NF90 の発現増加は E2F1, 2 による NF90 遺伝子の転写活性化が一因である (図 2)と考えられた。また NF90 は NF45 の安定化を促すことが知られている。従って、E2F1, 2 の転写活性化により発現増加した NF90 は NF45 の安定化を促進させ結果として NF90-NF45 の発現が上昇すると考えられる (図 2)。

(3) NF90-NF45 は miRNA の産生を調節することにより miRNA の機能を介して様々な生体制御 (腫瘍形成を含む) に関与する可能性が考えられる。そこで、このことを生体内で検証するために NF90 及び NF45 をダブルで過剰発現したマウス (NF90-NF45 dbTg mice) の作出を試みている。この過程において我々は NF90, NF45 を各々に過剰発現したマウスを作成した。現在、この NF90 Tg mice 及び NF45 Tg mice を掛け合わせ dbTg mice を作出中である。それと同時に各々の Tg マウスの表現型の解析を行った。野生型と比較し NF45 Tg マウスに関しては顕著な表現型の違いは確認されなかった。一方、NF90 Tg マウスでは興味深い表現型を見出すことができた。明らかとなった表現型を以下に列挙する。



• NF90 Tg マウスは体が小さい (図 3 A)。この体の小ささは 10 週齢以上で顕著になる。

- NF90 Tg マウスは筋量・筋力が低下している(図3A)。
- NF90 Tg マウスの心機能は低下しており、心不全を引き起している。

これらの表現型発症の要因を探るために組織化学的解析を行ったところ、NF90 Tg マウスの骨格筋(図3A)や心筋においてはミトコンドリアが空胞変性していることが分かった。

従って上記の表現型発症にはミトコンドリア変性が深く関与するのではないかと考えられた。

次にこのミトコンドリア変性の機構を解明するために解析を進めた結果、以下の点を明らかにすることができた。

- NF90 は蛋白質合成速度を低下させる。
- NF90 Tg マウスの筋組織において核内ミトコンドリア遺伝子や筋繊維遺伝子のマスター因子である PGC-1 の発現が翻訳レベルで低下している。

これらの知見をまとめると、NF90 Tg マウスの骨格筋・心筋でのミトコンドリア変性を伴う筋量・筋力・心機能の低下は NF90 による PGC-1 の翻訳抑制に起因するのではないかと考えられた。

(4) 以前我々はNF90の発現がAd増殖に及ぼす影響を検討するために、NF90をノックダウンした293細胞にルシフェラーゼ(luc)を組み込んだAdを感染させ luc 活性を指標に Ad 増殖率を解析した。その結果、NF90 のノックダウンにより Ad 増殖率の顕著な上昇が確認された。しかしながら、他のグループより NF90 をノックダウンすることで luc 活性が著しく上昇することが報告されている。そこで本研究において Ad そのものを用いて感染実験を行った。Ad 増殖率の変化は Ad 自身のゲノム DNA を鋳型とした PCR 法により検討した。その結果、NF90 の過剰発現及びノックダウンともに Ad 増殖率に有意な変動は確認されなかった。このことより、NF90 は Ad 由来の VA RNA と結合するが、その結合が Ad の増殖自体に直接影響するものではないと考えられた。

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6件)

1. Ishida W, Fukuda K, Sakamoto S, Koyama N, Koyanagi A, Yagita H, Fukushima A.

Regulation of experimental autoimmune uveoretinitis by anti-Delta-like ligand 4 monoclonal antibody.

Invest Ophthalmol Vis sci. 査読有り, 52(11):8224-30. 2011.

2. 坂本修士, 樋口琢磨, 戸高寛. microRNA生合成における負の制御 The Lung perspective 査読無し, 19(3): 96-103. 2011.
3. Nozaki M, Wakae K, Tamaki N, Sakamoto S, Ohnishi K, Uejima T, Minato N, Yanagihara I, Agata Y. Regulation of T Cell Receptor Vg2 Gene Rearrangement by the Helix-Loop-Helix Protein, E2A. International Immunology. 査読有り 23(5):297-305. 2011.
4. Ogasawara M, Hirose A, Ono M, Aritake K, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Sakamoto S, Iwasaki S, Asanuma T, Taniguchi T, Ueda Y, Onishi S, Saibara T, Oben JA. A Novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold-thioglucoase and a high-fat diet. Liver International. 査読有り, 31(4): 542-51. 2011.
5. Ishida W, Fukuda K, Higuchi T, Kajisako M, Sakamoto S, Fukushima A. Dynamic changes of microRNAs in the eye during the development of experimental autoimmune uveoretinitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 査読有り, 52 (1):611-617, 2011.
6. Ishida W, Tsuru E, Tominaga A, Miyazaki J, Higuchi T, Sakamoto S, Fukushima A. Systemic overexpression of IFN-gamma and IL-5 exacerbates early phase reaction and conjunctival eosinophilia, respectively, in experimental allergic conjunctivitis. Br. J. Ophthalmol. 査読有り, 93(12):1680-1685, 2009.

[学会発表] (計12件)

1. Shuji Sakamoto, Takuma Higuchi, Yoshihiko Kakinuma, Shoko Kai, Eunsup Chi, Hiroshi Todaka, Keiko Morisawa, Takako Ujihara, Ken-ichi Yagyu, Atsuki Fukushima, Masayuki Tsuda, Taketoshi Taniguchi. A novel regulatory mechanism

- of cellular energy balance by Nuclear Factor 90 (NF90).
- 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011. 12/13-16.
2. 戸高寛, 樋口琢磨, 森澤啓子, 小野正文, 玉置信行, 波多野悦郎, 氏原隆子, 池恩秀, 津田雅之, **坂本修士**, 谷口武利. Nuclear Factor 45 (NF45)による細胞増殖促進作用に関与するNF45複合体の同定 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011. 12/13-16.
 3. 樋口琢磨, 戸高寛, 森澤啓子, 小野正文, 西原利治, 玉置信行, 波多野悦郎, 竹崎由佳, 花崎和弘, 津田雅之, **坂本修士**, 谷口武利. 肝細胞癌における Nuclear Factor 90 (NF90)の発現増加機構の解明 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011. 12/13-16.
 4. 森澤啓子, 小味秀行, 苫谷文子, 近藤基樹, 都留忍, 戸高寛, 樋口琢磨, 尾畑恩秀, **坂本修士**, 津田雅之, 村上雅尚, 大畑雅典, 谷口武利. 遺伝的背景を維持した Lewis ラットおよび Brown Norway ラット骨髄由来の樹状細胞株の樹立 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011. 12/13-16.
 5. **Shuji Sakamoto**, Takuma Higuchi, Yoshihiko Kakinuma, Shoko Kai, Hiroshi Todaka, Ken-ichi Yagyu, Eunsup Obata, Keiko Morisawa, Atsuki Fukushima, Masayuki Tsuda, Taketoshi Taniguchi. Molecular Mechanisms of Muscular Abnormality in Transgenic Mice Overexpressing NF90, a dsRNA binding protein. RNA 2011 (Kyoto) 2011. 6/14-18.
 6. 若江亨祥 (京大・医・免疫細胞生物学)、**坂本修士 (高知大・教育研究部)**、山下政克 (かざさ DNA 研究所・ゲノム医学)、中山俊憲 (千葉大・医・免疫発生学)、湊長博 (京大・医・免疫細胞生物学)、縣保年 (京大・医・免疫細胞生物学). 発生段階特異的な TCR γ 遺伝子再構成における転写抑制因子 Gfi-1 の役割 KTCC 2011 (京都) 2011. 6/10-11.
 7. **Sakamoto S**, Higuchi T, Kakinuma Y, Yagyu K, Todaka H, Fukushima A, Tsuda M, Taniguchi T. Overexpression of Nuclear Factor 90 (NF90) Triggers the morphological abnormality of mitochondria in cardiac and skeletal muscles of Transgenic (Tg) mice. Biochemistry and Molecular Biology 2010 (神戸) 2010. 12/7-10.
 8. 樋口琢磨, **坂本修士**, 氏原隆子, 矢生健一, 竹崎由佳, 上村直, 花崎和弘, 小野正文, 西原利治, 玉置信行, 波多野悦郎, 森澤啓子, 戸高寛, 甲斐翔子, 津田雅之, 谷口武利. 肝細胞癌において発現上昇しているNF90遺伝子のプロモーター解析 Biochemistry and Molecular Biology 2010 (神戸) 2010. 12/7-10.
 9. 戸高寛, 沈淵, 近藤基樹, 森澤啓子, 樋口琢磨, **坂本修士**, 津田雅之, 福島敦樹, 谷口武利. IL-27 分泌型 Dendritic-like cell を用いたコラーゲン誘導型関節炎抑制効果の検討 Biochemistry and Molecular Biology 2010 (神戸) 2010. 12/7-10.
 10. 樋口琢磨, **坂本修士**, 氏原隆子, 矢生健一, 竹崎由佳, 上村直, 花崎和弘, 小野正文, 西原利治, 玉置信行, 波多野悦郎, 森澤啓子, 戸高寛, 甲斐翔子, 津田雅之, 谷口武利. 肝細胞癌における二本鎖 RNA 結合タンパク質 Nuclear Factor 90 (NF90)の発現機構の解析第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (北九州) 2010. 6/25-26.
 11. 戸高寛, 苫谷文子, 小味秀行, 森澤啓子, 樋口琢磨, **坂本修士**, 沈淵, 津田雅之, 福島敦樹, 谷口武利. Lewis rat 骨髄由来の IL-27 発現型 dendritic-like cell (DLC) の樹立とその応用 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (北九州) 2010. 6/25-26.
 12. **Sakamoto S**, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Aoki K, Taniguchi T, Agata Y. 二本鎖 RNA 結合蛋白質 NF90-NF45 による miRNA 生合成経路における負の制御. 第 11 回 RNA ミーティング (新潟) 2009. 7/27-29.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
坂本 修士 (SAKAMOTO SHUJI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号 : 80397546
 - (2) 研究分担者
該当なし
 - (3) 連携研究者
該当なし