

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791579
 研究課題名（和文）テロメラーズの新機能を標的とした婦人科癌治療に向けての基礎的研究
 研究課題名（英文）Novel function of hTERT and its application to cancer therapy

研究代表者
 毎田 佳子 (MAIDA YOSHIKO)
 金沢大学・医学系・助教
 研究者番号：20397219

研究成果の概要（和文）：テロメア伸長酵素として知られるテロメラーズの触媒サブユニットであるhTERTは、悪性腫瘍に特異的に高発現する蛋白である。近年、TERTがテロメア伸長以外の機能を有することが示唆されている。我々は、hTERTがRNA分子であるRMRPと結合して、RNA依存性RNAポリメラーズ(RdRP)活性を示すことを見出した。RMRPは正常細胞株から癌細胞株まで幅広く発現している。hTERTとRMRPとを共に発現している子宮癌・乳癌細胞株を用いた検討では、hTERT-RMRP複合体のRdRP活性により、細胞内でRMRPを鋳型にした長い2本鎖RNAの合成、さらには2本鎖RNAの切断によってRMRPに由来するsmall RNAが生成されることがわかった。このRMRP由来small RNAは塩基配列特異的に遺伝子発現を抑制すること示唆された。

研究成果の概要（英文）：hTERT elongates telomere through its telomere-specific RNA dependent DNA polymerase activity. Accumulating evidence indicates hTERT has other function(s) beyond telomere maintenance. We identified RMRP as a novel binding partner of hTERT. hTERT-RMRP complex exhibited RNA dependent RNA polymerase (RdRP) activity and synthesized complementary strand of RMRP *in vivo*. The short RNA derived from the product of the RdRP activity was supposed to be involved in RNA silencing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：婦人科腫瘍学
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
 キーワード：テロメラーズ, 機能性RNA

1. 研究開始当初の背景

テロメラーズは染色体末端のテロメアを

伸長する酵素であり、RNAを鋳型にテロメアDNAを合成するRNA依存性DNAポリメラーズとして知られている。テロメラーズの構成成分

子には、触媒サブユニットである hTERT (human telomerase reverse transcriptase)、テロメア伸長の鋳型 RNA である hTR (human telomerase RNA)、その他複数のタンパク質があるが、テロメラーゼ活性に必要な最小単位は hTERT と hTR である。テロメラーゼによるテロメア長の維持は細胞の不死化・がん化に必須の要素と考えられている。特に hTERT は、その発現が悪性腫瘍に高度に限定しており、がんの診断や治療の標的分子として注目されてきた。このようにがん特異的なテロメア伸長酵素として認識されている hTERT に関して、近年、テロメア伸長を介さない新たな機能の存在が推定されており、TERT がテロメア伸長以外にも細胞内で重要な機能を担っていることが示唆されてきた。特に、この TERT の新たな機能発現にはテロメラーゼに必須の hTR が必要ないことが示されている。

今回我々は、hTERT の新たな機能を担う RNA-タンパク質複合体の同定を試み、hTERT に結合する第二の RNA として RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) を見出した。RMRP は 267 塩基の機能性 non-coding RNA であり、RMRP の異常は低身長や毛髪の異常、リンパ腫、易発癌性を示す遺伝性疾患 cartilage-hair hypoplasia (CHH) を引き起こす。興味深いことに、hTERT-RMRP 複合体はテロメラーゼとは異なるポリメラーゼ活性を有しており、hTERT の未知の機能に関与していることが示唆された。

乳癌は現在、日本女性の部位別罹患率において最も罹患率の高い癌である。抗癌剤や分子標的治療薬を組み合わせた有効な治療法の検討が進められる一方、新薬の開発にも世界中がしのぎを削っている。また、女性特有の癌である子宮癌の予後は Chemoradiation や Taxane 製剤の使用により近年改善傾向にあるが、子宮頸部腺癌や子宮体部癌肉腫など従来難治性とされた症例は現存の抗癌剤では予後改善が得られず問題となっている。乳癌や子宮癌を含む婦人科癌における hTERT の発現率は 90% と高率であり、hTERT やその機能を利用した婦人科癌の治療は現在有効な治療法のない症例にも光明をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、hTERT の新機能と婦人科癌との関連に注目し、hTERT の新規結合 RNA である RMRP および hTERT-RMRP 複合体の癌細胞における機能を明らかにするとともに、将来的な癌治療への応用の可能性について検討することを目的とした。

具体的に、以下の点について明らかにする

ことを目標とした。

(1) 正常細胞および癌細胞における RMRP の発現について
種々の正常細胞株、ならびに乳癌細胞株、子宮癌細胞株を用いて、RMRP の発現量を比較する。

(2) hTERT-RMRP 複合体と癌との関わりについて

乳癌ならびに子宮癌をモデルに hTERT-RMRP 複合体により合成される生成物について検討し、生成物を活性の指標として hTERT-RMRP 複合体の機能発現部位を組織レベルおよび細胞レベルで特定し、発癌や癌の進展との関連について検討する。

(3) hTERT-RMRP 複合体の癌治療への応用について

hTERT-RMRP 複合体の細胞内での生物学的機能を明らかにし、hTERT-RMRP 複合体の活性抑制が正常細胞および癌細胞に及ぼす影響、ならびに癌治療への応用の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) RMRP の発現に関する検討

正常細胞株、乳癌細胞株、子宮癌細胞株から抽出した RNA を用いて、RT-PCR により検討した。

(2) hTERT-RMRP 複合体による細胞内生成物の検討

in vitro での詳細な検討により、hTERT-RMRP 複合体は RMRP 3' 端の折り返し構造を分子内プライマーとして利用し、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) 活性により RMRP の相補鎖を合成することがわかった。そこで、細胞内にも同様な hTERT-RMRP 複合体の生成物が存在するか否かを Northern blotting および RNase protection assay により検討した。

(3) hTERT-RMRP 複合体の生物学的機能に関する検討

in vitro での検討から、hTERT-RMRP 複合体により合成される RNA は長いヘアピン型の 2 本鎖 RNA であることが示唆された。モデル生物における RNA サイレncing では、長い 2 本鎖 RNA から 2 本鎖 RNA 切断酵素 (RNase III) により切断を受けた 20 から 30 塩基長の小さな RNA (small RNA) が、塩基配列特異的に遺伝子の転写や翻訳を抑制することが知られている。そこで我々は「hTERT-RMRP 複合体はヒト細胞内における RNA サイレncing に関与する」との仮説を立て、以下の点について検

討を行った。

① hTERT-RMRP 複合体の生成物に由来する small RNA の検出

乳癌細胞株ならびに子宮癌細胞株から抽出した RNA を用いて、Northern blotting により hTERT-RMRP 複合体の生成物由来と考えられる small RNA の有無を検討した。また、検出された small RNA が DICER (RNase III) の切断によって生成されたものであるか否かを、DICER 依存性および化学的特性により検討した。

② hTERT-RMRP 複合体による RNA サイレンシングに関する検討

hTERT-RMRP 複合体を経て合成される small RNA と RNA サイレンシングに関与する他の分子との関連の有無、small RNA により発現調節される遺伝子の有無について、免疫沈降法や RT-PCR 等により検討した。

4. 研究成果

正常線維芽細胞株 (3 種)、乳癌細胞株 (2 種)、子宮癌細胞株 (4 種) を用いた検討により、RMRP は正常細胞・癌細胞を問わず種々の細胞に発現していることがわかった。

in vitro での検討により、hTERT-RMRP 複合体の RdRP 活性により合成される RNA は、RMRP のセンス鎖とアンチセンス鎖とが繋がった約 530 塩基の長いヘアピン型 2 本鎖 RNA であることが推定されていた。そこで、細胞内における hTERT-RMRP 複合体による RdRP 生成物の有無を Northern blotting により検討した。その結果、hTERT と RMRP をともに発現する乳癌細胞株・子宮癌細胞株において、*in vitro* における検討と同様に RMRP のセンス配列とアンチセンス配列とをともに含む約 530 塩基の RNA の存在が確認された。さらに、RMRP のアンチセンス配列を標的とした Northern blotting および RNase protection assay により、細胞内に認められる RMRP のアンチセンス鎖は、hTERT 依存性に発現していることがわかった。

hTERT-RMRP 複合体の細胞内での機能を明らかにするため RMRP の過剰発現を試みたところ、hTERT を発現している細胞株では、導入したウイルス由来の RMRP の細胞内過剰発現が確認されるにも関わらず RMRP の総量が減少することがわかった。一方で、hTERT を過剰発現させると内在性の RMRP 発現量は減少し、逆に hTERT の発現を抑制すると RMRP 発現量は増加した。これらの現象は、hTERT 依存性に RMRP の発現量を転写後に抑制する機構が細胞内に存在することを示唆するものと考えられた。

モデル生物では RdRP は内在性 small interfering RNA (siRNA) の合成に重要な役

割を担うことが知られていたことより、我々は hTERT により合成されたセンス+アンチセンス型 RMRP は DICER による切断を受けて RNA サイレンシングに関与している可能性があると考え、RMRP に特異的な small RNA の有無を Northern blotting により検討した。種々のプローブを用いた検討の結果、hTERT を発現する子宮癌・乳癌細胞株において、RMRP の 21 塩基から 40 塩基の部位に設定したプローブによりセンス鎖・アンチセンス鎖がともに検出される 22 塩基の RNA の存在が確認された。これらの RMRP 由来 small RNA は 5'-monophosphate および 2', 3'-hydroxyl group の構造を有し、DICER 依存性に合成されることから、DICER による能動的切断産物であると考えられた。

RNA サイレンシングにおいて siRNA などの small RNA は AGO 蛋白に結合して機能を発現する。そこで RMRP 由来 small RNA と AGO 蛋白との関連について免疫沈降により検討したところ、RMRP 由来 small RNA は hAGO2 に取り込まれていることが示唆された。また、Luciferase assay を用いた検討により、RMRP 由来 small RNA は相補的塩基配列を標的とし、配列特異的に遺伝子発現を抑制することが示唆された。siRNA 同様に RNA サイレンシングに関与する small RNA である microRNA では、5' 側 2-8 塩基目の“seed 配列”の相補性が標的遺伝子の認識に重要であることが知られて

いる。そこで RMRP 由来 small RNA の標的配列の認識について検討したところ、RMRP 由来 small RNA の標的認識には、所謂“seed 配列”に加え、他の部位も重要であることが示唆された。

以上の結果より、hTERT が RdRP 活性によってヘアピン型の長い 2 本鎖 RNA を合成し、長い 2 本鎖 RNA から DICER による切断を受けて形成された RMRP 由来 small RNA を介して塩基配列相補的に遺伝子の転写後抑制に關

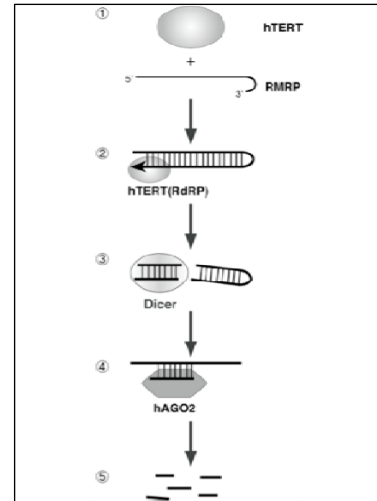


図1 hTERTのRdRP活性とRNAサイレンシング
hTERTとRMRPと複合体を形成し(1)、RdRP活性によってRMRPの相補鎖を合成する(2)、合成されたヘアピン型の2本鎖RNAはDICERによる切断を受け、短い2本鎖RNAが切り出される(3)、短い2本鎖RNAはAGO2に取り込まれる(4)、相補的な配列を持つRNAを分解してその発現を抑制する(5)

与する、という新しいモデルを立証した(図1)。

テロメラーゼとしてのhTERTはこれまでもがんを中心とした分子標的医療や再生医療分野などで臨床応用に向けた様々な研究がなされてきた。今回、hTERTの新規機能としてRdRP活性とRNAサイレンシングへの関与を明らかにしたことにより、がん細胞内での選択的なsiRNA合成技術やRNAの増幅技術などががん治療に向けた新たなアイデアが創出される可能性がある。

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)

- ①. Maida, Y., Masutomi, K. RNA-dependent RNA polymerases in RNA silencing. Biol. Chem., 392 (2011), 299-304, 査読有
- ②. Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., Masutomi, K. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. Nature, 461 (2009), 230-235, 査読有

[学会発表] (計2件)

- ①. 毎田佳子, 安川麻美, 岡本奈緒子, Vivi Kasim, Timo Lassmann, 林崎良英, 増富健吉. hTERT produces endogenous siRNA through its RNA-dependent RNA polymerase activity. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ②. 毎田佳子, 安川麻美, 岡本奈緒子, Vivi Kasim, Timo Lassmann, 林崎良英, William C. Hahn, 増富健吉. Involvement of hTERT in producing endogenous siRNA through its RdRP activity. 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月3日, パシフィコ横浜(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毎田 佳子 (MAIDA YOSHIKO)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号: 20397219

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし