

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590920

研究課題名(和文) p53経路に関わる機能性RNAと消化器発がん：バイオマーカーとしての有用性

研究課題名(英文) Identification and analysis of functional RNAs regulated by p53 family members in gastrointestinal tumorigenesis

研究代表者

佐々木 泰史 (Sasaki, Yasushi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70322328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：p53誘導性miRNA, miR-200b/200c/429の新規標的遺伝子CRKL (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like)を同定した。CRKL遺伝子の3'-UTRにmiR-200b/200c/429の結合配列を同定し、p53ファミリーがmiR-200b/200c/429を転写活性化し、この配列を介してCRKLの発現を抑制していることを明らかにした。CRKL遺伝子発現は胃癌患者の予後不良と相関しており、p53変異のある症例で有意に発現上昇していた。CRKLの導入により、胃癌細胞株の増殖、浸潤、遊走能が上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The miR-200 family includes two clusters: miR-200b-200a-429 located on chromosome 1; and miR-200c-141 located on chromosome 12. We identified response elements located around both clusters that are responsive to p53 family. Here, in silico miRNA target prediction identified the v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like (CRKL) as a potential miR-200b/200c/429 target. MiR-200b/200c/429 inhibits the expression of CRKL by directly targeting its 3'-UTR region. Importantly, CRKL expression was decreased in cancer cells with introduction of wild-type p53 and Tap63. Oncomine database shows that CRKL levels are significantly overexpressed in multiple cancer types compared with the corresponding normal tissues. We also found that CRKL was overexpressed in primary breast cancer tissues harboring mutant p53 genes. Our results indicate that a p53-inducible miRNA, 200b/200c/429 is a negative regulator of the CRKL oncoprotein and suggest a new p53-miR-200-CRKL pathway in carcinogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：p53 p73 p63 機能性RNA miRNA 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近のゲノム解析の進展により、転写されたRNAの多くがタンパクに翻訳されない non-coding RNA (ncRNA, 非コードRNA) であり、遺伝子発現の様々な段階で重要な制御因子として機能することが明らかとなってきた。microRNA (miRNA) は20塩基の短い機能性 RNA で、遺伝子の3'非翻訳領域に結合して転写・翻訳抑制に関与しており、多くの疾患との関連が知られている。がんの発生・進展における miRNA の役割に関する研究も進められているが不明な点も多く、食道癌、胃癌など消化器癌の浸潤・転移、治療抵抗性の関わる miRNA の研究は始まったばかりである (Lancet Oncol 11: 136, 2010)。一方比較的高分子の ncRNA の存在も知られていたが、複数の exon を含み、既知のタンパクコード遺伝子とは重なり合わずに遺伝子間領域に存在する大きい転写単位が最近多数見いだされ、Large intervening non-coding RNA (lincRNA) と呼ばれている (Nature 458:7235, 2009)。ヒトゲノムからは5000以上の lincRNA が転写されていることが示唆されているが、疾患との関係はほとんど明らかになっていない。

(2) p53 は、ヒトがんにおいて最も高頻度に遺伝子変異が検出されているがん抑制遺伝子であり、その遺伝子産物は転写因子としてゲノム上の応答配列に結合し、近傍の標的遺伝子の転写を活性化することで、細胞周期調節・アポトーシス誘導・血管新生抑制などに関与し、腫瘍抑制機能を発揮している。したがって、p53 が機能性 RNA の発現調節を介してその機能を発揮している可能性が高い。しかしながら、p53 によって転写制御される miRNA としては、これまでのところ miR-34 ファミリー、miR-192/215、miR-145 が報告されているのみである。また最近、Harvard 大の John L. Rinn 博士のグループが、p53 に誘導される初めての lincRNA を同定し、細胞死に関わっていることを報告した (Cell 142:409, 2010)。よって p53 に制御される未知の機能性 RNA が多数存在することが充分予想され、がんの発生、進展に関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

近年、ncRNA、miRNA を含む機能性 RNA が発がん、発生・分化に密接に関与していることを示唆する研究結果が蓄積されつつある。本研究では、最も高頻度に遺伝子変異が検出されているがん抑制遺伝子 p53 経路の異常が発がん、がんの進展過程におよぼす分子機構を多面的に理解するため、p53 によって制御される機能性 RNA を最新のゲノム情報を駆使して効率的に同定し、その機能解析へ

と展開する。さらに発現異常、遺伝子変異の解析、悪性度および化学療法効果との関連性の分析を通じて、胃癌、食道癌を中心とした消化器癌の新しい診断・治療予測システムを開発しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) p53 に制御される機能性 RNA の同定
すでにマイクロアレイ、および ChIP シークエンス (H3K4me3, H3Ac) によって同定した p53 によって発現が上昇する 81 の miRNA、649 の lincRNA について、in silico 解析により近傍に p53 結合配列がないかを解析し、p53 に制御される候補機能性 RNA を抽出する。これらの機能性 RNA のうち、miRNA については qRT-PCR により発現変化の再現性を確認する。lincRNA については種々の分子学的手法によって転写物の全長を同定し、qRT-PCR により発現変化を確認する。近傍に存在する結合配列に対して、クロマチン免疫沈降、レポーターアッセイによる転写制御様式の解析を順次行う。

(2) p53 に制御される機能性 RNA の発現解析

いくつかの初代培養細胞の分化段階、個体の発生段階、正常組織、がん組織における発現パターンを ISH 法、qRT-PCR 法を用いて解析する。癌部と隣接正常部の発現を定量的に評価し、臨床病理学的因子や治療反応性との相関を解析する。さらにはがん組織での発現変化、予後、悪性度との相関を分析し、がん関連機能性 RNA の同定を試みる。

(3) p53 に制御される機能性 RNA の機能解析

発現変化が著しい機能性 RNA については、遺伝子の構造異常やエピジェネティック異常がないか、解析を加える。癌症例における発現と悪性度、予後との相関から、癌関連機能性 RNA を抽出し、機能解析の対象とする。またデータマイニングによって、特定の機能性 RNA の発現プロファイルが消化器癌の診断・治療マーカーになりうるかどうかを詳細に解析する。公共のデータベース、ソフトウェアを利用して、同定した機能性 RNA によって転写・翻訳抑制を受けるタンパクコード遺伝子を推測し、実験的に確認を行う。

4. 研究成果

(1) miR-200 ファミリーの新規標的遺伝子 CRKL の機能解析

p53 誘導性 miRNA、miR-200b/200c/429 の新規標的遺伝子 CRKL (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like) を同定し、発がん過程における役割を解析した。CRKL 遺伝子の

3'-UTR に miR-200b/200c/429 の結合配列を同定し、p53 ファミリーが miR-200b/200c/429 を転写活性化し、この配列を介して CRKL の発現を抑制していることを明らかにした。臨床検体の解析から、CRKL 遺伝子発現が胃癌組織で上昇し、予後不良と関連することをつきとめた。また、p53 変異のある症例で有意に CRKL が発現上昇していた。CRKL の導入により、胃癌細胞株の増殖、浸潤、遊走能が上昇することを明らかにした。以上の結果から、p53 ファミリーが miR-200b/200c/429 の転写誘導を介して CRKL の発現を制御し、がんの浸潤、転移能を抑制していることが示唆された。

(2) miR-142-3p を介した p53 による XPO1 の発現抑制

p53 により発現抑制される遺伝子として、核外輸送受容体をコードする XPO1 (exportin 1) を同定し、その転写調節機構、癌組織における発現を検討した。qRT-PCR、ウエスタンブロットにおいて、外来性、および内在性 p53 は XPO1 の mRNA、蛋白発現を抑制した。一方、XPO1 プロモーターに対するリーポーターアッセイでは、p53 による変化はわずかであった。miRNA のマイクロアレイ、複数のアルゴリズムを利用した miRNA の標的予測から、p53 が miR-142-3p の転写誘導を介して XPO1 を発現抑制していることを明らかにした。miR-142-3p 導入により、XPO1 の mRNA、蛋白レベルが抑制され、核局在 p53 の増加と細胞周期の G1 期停止をもたらした。この効果は XPO1 の外来性発現によって阻害された。さらに XPO1 の 3'-UTR に miR-142-3p の標的配列を同定した。乳癌組織の解析では、p53 変異を持つ症例で有意に XPO1 遺伝子の発現上昇を認めた。本研究は p53 が miR-142-3p の転写誘導を介して XPO1 の発現抑制し、自らの機能を増強させる正のフィードバック機構を示唆しており、新たながん治療の標的となりうることを示された。

(3) p53 に制御される新規機能性 RNA の同定

マイクロアレイ、および p53 結合コンセンサス配列の全ゲノム網羅的解析より、76 の p53 誘導性 ncRNA 候補を同定した。それらすべてについて、RT-PCR 法により p53 ファミリーによる発現誘導を確認したところ、6 つの ncRNA の強い転写誘導が認められた。さらに 6 つの ncRNA すべてについて近傍の p53 応答性配列を同定した。

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 14 件)

1. Tamura M, Sasaki Y, Koyama R, Takeda K, Idogawa M, Tokino T. Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target gene of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness. **Oncogene**. 査読有, in press (2014). doi: 10.1038/onc.2013.427.
2. Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Noshō K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. **Int J Cancer**. 査読有, in press (2014). doi: 10.1002/ijc.28920.
3. Idogawa M, Ohashi T, Sasaki Y, Maruyama R, Kashima L, Suzuki H, Tokino T. Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53-binding sites. **Hum Mol Genet**. 査読有, 23:2847-2857, 2014. doi: 10.1093/hmg/ddt673.
4. Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Noshō K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Tumour Biol**. 査読有, 35:973-985, 2014. doi: 10.1007/s13277-013-1131-2
5. Ohashi T, Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Tokino T. AKR1B10, a transcriptional target of p53, is downregulated in colorectal cancers associated with poor prognosis. **Mol Cancer Res**. 査読有, 11:1554-1563, 2013. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0330-T.
6. Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y, Tokino T. CHFR Protein Regulates Mitotic Checkpoint by Targeting PARP-1 Protein for Ubiquitination and Degradation. **J Biol Chem**. 査読有, 287:12975-84, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.321828.
7. Sasaki Y, Oshima Y, Koyama R, Kashima L, Idogawa M, Yamashita T, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. A novel approach to cancer treatment using structural hybrids of the p53 gene family. **Cancer Gene Ther**. 査読有, 19:749-56, 2012. doi: 10.1038/cgt.2012.51.
8. Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N. Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the

- activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **Cell Stress Chaperones**. 査読有, 17:757-63, 2012. doi: 10.1007/s12192-012-0348-0.
9. Sasaki Y, Koyama R, Maruyama R, Hirano T, Tamura M, Sugisaka J, Suzuki H, Idogawa M, Shinomura Y, Tokino T. CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. **Cancer Biol Ther**. 査読有, 13:1512-21, 2012. doi: 10.4161/cbt.22280.
 10. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular Dissection of Premalignant Colorectal Lesions Reveals Early Onset of the CpG Island Methylator Phenotype. **Am J Pathol**. 査読有, 181:1847-61, 2012. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.007.
 11. Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. **J Gastroenterol**. 査読有, 46:143-152, 2011. doi: 10.1007/s00535-010-0320-7
 12. Kamimae S, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishiwaki M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. **Cancer Prev Res**. 査読有, 4:674-83, 2011. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0214.
 13. Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of MicroRNA genes in colorectal cancer. **Cancer Res**. 査読有, 71: 5646-58, 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1076.
 14. Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Yokota I, Koyama R, Kusano M, Suzuki H, Fujita M, Maruyama R, Toyota M, Saito T, Tokino T. p53 negatively regulates the hepatoma growth factor HDGF. **Cancer Res**. 査読有, 71:7038-47, 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1053.
 1. Sasaki Y, Tamura M, Kobayashi T, Idogawa M, Suzuki H, Shinomura Y, Tokino T. p53 regulates negatively the expression of the nuclear export protein XPO1, establishing a positive feedback loop. 41st Congress of the International Society of Oncology and BioMarkers. 2014/03/17, Barcelona, Spain.
 2. 佐々木泰史, 小橋健太, 鈴木信太郎, 田村みゆき, 竹田康祐, 井戸川雅史, 篠村恭久, 時野隆至. p53 による XPO1 の抑制機構とその意義. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013/12/05, 神戸.
 3. 佐々木泰史, 田村みゆき, 竹田康祐, 井戸川雅史, 丸山玲緒, 鈴木拓, 篠村恭久, 時野隆至. p53 による XPO1 の抑制機構とその意義. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013/10/04, 横浜.
 4. Sasaki Y, Tamura M, Koyama R, Takeda K, Idogawa M, Tokino T. Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target gene of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness. 6th International p63/p73 Workshop. 2013/07/10, Kisarazu, Chiba, Japan.
 5. Sasaki Y, Koyama R, Maruyama R, Tamura M, Ohashi T, Idogawa M, Suzuki H, Shinomura Y, Tokino T. CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. 9th AACR-JCA Joint International Conference. 2013/02/24, Maui, Hawaii.
 6. 佐々木泰史, 大島雄一郎, 小山良太, 田村みゆき, 井戸川雅史, 篠村恭久, 時野隆至. p53 ファミリーを用いた人工ハイブリッド遺伝子の作成とアポトーシス誘導活性. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012/12/12, 福岡.
 7. 佐々木泰史, 井戸川雅史, 時野隆至. p53 family network and tumor suppression. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012/09/19, 札幌 (シンポジウム).
 8. 佐々木泰史, 根岸秀明, 小山良太, 井戸川雅史, 鈴木拓, 今井浩三, 篠村恭久, 時野隆至. p53 により発現抑制される分泌性増殖因子 HDGF の同定とがん組織における発現解析. 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会. 2012/04/12, 京都.
 9. Sasaki Y, Koyama R, Kobayashi T, Suzuki H, Shinomura Y, Tokino T. hCLCA2, a p53 inducible transmembrane protein regulates cancer cell migration and invasion. 39th Congress of the International Society of Oncology and BioMarkers. 2011/10/17, Firenze, Italy.
 10. 佐々木泰史, 根岸秀明, 横田育子, 鹿島理沙, 井戸川雅史, 丸山玲緒, 鈴木拓, 豊田

実、今井浩三、篠村恭久、時野隆至 . p53
により発現抑制される分泌性増殖因子
HDGF の同定がんの浸潤・遊走への関与 .
第 70 回日本癌学会学術総会 2011/10/03,
名古屋 .

11. 佐々木泰史 .がん抑制遺伝子 p53 研究の新
展開 . 第 2 回 道南分子病態研究会 ,
2011/06/30 , 函館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/canmol/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 泰史 (YASUSHI SASAKI)

札幌医科大学 医学部 准教授

研究者番号 : 70322328

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし