

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591005

研究課題名(和文) 膵癌モデルマウスを用いた非機能性反復配列RNAの膵発癌における生物学的意義の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the biological function of non-coding repeat RNA in pancreatic cancer using mouse models

研究代表者

山本 夏代 (Yamamoto, Natsuyo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40599578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌で早期に発現する非コードRNAの一種、反復配列RNAの発現状況を検討したところ、膵癌組織特異的で正常組織では全く発現が見られなかった。そのためこの反復配列RNAが癌の表現型に何か寄与しているのではないかと考え、細胞で発現する状況を創って見たところ、遺伝子異常の修復障害や染色体の分裂異常が惹起された。その分子機構はまだ解明すべき点があるが、この非コードRNAの発現が癌の悪性化に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Repeat RNA, one of the non-coding RNAs which express in pancreatic cancer tissues, is expressed exclusively in the cancerous tissues. Its expression was not detected in the normal pancreas tissues. Thus, we hypothesized that this repeat RNA may be involved in the parthenogenesis of the pancreatic cancer. To clarify this, we constructed overexpression system of this repeat RNA in culture cells. We observed deregulated chromatin division and impaired repair of the damaged DNA in cells, which may contribute to the malignant phenotype of cancer cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は長年にわたり、膵癌患者に対する抗癌剤治療の最適化や内視鏡的な減黄術について臨床的検討を続けてきた。しかしながら、Gemcitabine や TS-1 といった抗癌剤の進歩と metallic stent をはじめとする内視鏡的な減黄術の改善によって膵癌患者の予後は以前に比べて確実に伸びてはいるものの、まだその成績は満足のものとは言えない。このような現状の膵癌患者の臨床を鑑みると、既存の方法を最適化することによる患者の予後延長には限界があると日々感じるようになり、既存の方法の改変ではなく、より本質的に、膵癌の発癌過程を明らかにすることによって、従来にない予防法・治療法を確立したいと考えるに至った。

いっぽう、本研究の研究分担者(伊地知)は、遺伝子改変マウスを用いてヒト膵癌に類似する組織像を呈するマウス膵癌モデルの作製に成功した。すなわち膵組織特異的に constitutively active Ras の発現と TGF-beta receptor typeII のノックアウトの遺伝子改変を施すことにより、生後3カ月ほどでヒト膵癌と同様の形態を示す膵癌自然発生モデルが樹立できた(Ijichi et al. *Genes Dev.* 2006;20:3147)。このマウスで大切な点は、TGF-beta receptor の knockout を除いて constitutively active Ras だけを膵組織で発現すると、膵癌の前癌病変である PanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasia) を呈することである。このマウスは一年以上の経過で PanIN から通常型膵癌を発生するため、前癌組織 PanIN から進行膵癌 PDAC(Pancreatic duct adenocarcinoma)に convert していく過程を観察できるメリットがある。

もう一人の研究分担者(大塚)は、microRNA をはじめとする non-coding RNA の研究に以前から従事しており、特に最近では肝における microRNA122 の発現低下と肝癌悪性度との関連について in vivo, in vitro で解析し報告した(Kojima, Otsuka et al. *Nat Commun.* 2011)。その他にも多数の non-coding RNA について研究報告を行っており、今回の研究を遂行するために必要な RNA 研究の手法に精通していた。

PanIN 及び膵癌組織においては正常膵組織では転写されていないゲノム上の反復配列(特に Major satellite 領域)からの非機能性 RNA 産物が増えることをみだしていた。実際に類似の情報が最近他所からも報告された(Ting DT et al. *Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. Science.* 2011;331(6017):593-6)。このような反復配列は、ヒトゲノムの大部分を占めているが、これまではそれらの配列は RNA には転写されないか仮に転写されても蛋白に翻訳されないため、生物学的な意義は無いもの(いわゆる“junk”)と考えられていた。

本研究では、これらの反復配列からの転写産物が PanIN 及び膵癌組織で特異的に高発現していることから、膵癌の過程でなんらかの生物学的な意義をもっているのではないかと考えて、その in vitro, in vivo での検証を行ない、癌の予防・治療に応用することを考えた。

まずヒト臨床検体での膵癌における反復配列 RNA の発現状況を免疫染色で確認のうえ、マウス膵癌モデルの PanIN および PDAC 発現マウスで経時的に反復配列 RNA の発現状況を検討する。次に、これらのマウスの病変部から樹立した PanIN および PDAC の細胞株に反復配列 RNA を過剰発現するコンストラクトを組み込んだうえで(PanIN および PDAC 組織由来の細胞は、細胞株にして二次元 dish 上で培養していると、組織の状態では発現していた反復配列 RNA の発現が、おそらく DNA のメチル化によって発現しなくなることを観察している)発現 on-off のスイッチを行なって、特に PanIN における反復配列 RNA の発現による癌化につながる細胞内シグナルの攪乱を検証する。

また、申請者は、この反復配列が複数の異なる driver による発癌モデルでも発現してくることを確認している。すなわち膵癌マウスモデルだけではなく、他の driver による発癌マウスモデル由来の組織でもこれらの反復配列は発現してくる。したがって、これらの反復配列は発癌原因の種類によらず普遍的に発現している可能性がある。このことから、これらの RNA 産物は、癌化の結果の(例えば細胞回転亢進の)単なる反映とも考えられるが、逆に、発癌の普遍的な原因の可能性もある。この後者の可能性を示唆する結果として、これらの反復配列の強制発現によって細胞分裂におけるクロマチン移動が不完全になるという in vitro の観察結果をすでに得ている。したがって、**「これらの反復配列由来 RNA 自体が、細胞分裂時の染色体分配の異常を惹起し、癌細胞に見られる異常な遺伝子変化を普遍的に惹起しているのでは、」**との仮説をたてた。その検定をするために、この反復配列 RNA の transgenic mouse を、発現制御可能なかたちで作製し、癌の「原因」なのか「結果として出てくる phenotypic な変化」なのかを検定する。これによって細胞癌化の普遍的な機構を明らかにしたいと考えていた。

2. 研究の目的

1)膵癌発癌過程における反復配列 RNA の発現状態(マウス・ヒト)

2)反復配列 RNA の in vitro 過剰発現コンストラクトの作製と発現時の細胞内状態の変化の検定

3) nude マウス xenograft model による反復配列 RNA 発現の組織形成における生物学的意義の検定

4)反復配列 RNA の時間的・空間的発現

制御が可能な transgenic mouse の作製・それを用いた反復配列 RNA の carcinogenesis における生物学的意義の検証

5) 反復配列 RNA の発現機構の解明と制御法の探索 および反復配列 RNA が惹起する細胞内シグナル攪乱の予防法や対処法の開発

3. 研究の方法

(1) 膵癌組織における反復配列由来の RNA 産物の発現の確認と膵癌診断への応用:

膵癌組織において反復配列由来の RNA の転写が増加することを、ヒト癌組織アレイ、および当研究室で既に樹立しているマウス膵がんモデル由来組織の in situ hybridization にて確認する。

(2) 反復配列由来の RNA の方向性の検討:

反復配列由来の RNA はゲノム DNA から 5' 3' および 3' 5' の両方向に読み取られている可能性がある。この点を、培養癌細胞、あるいはモデルマウス由来の癌組織の Northern blotting 法にて、sense 側 probe、anti-sense 側 probe を用いて確認する。

(3) 過剰発現系コンストラクトの作製:

上記の結果に基づき、培養細胞において反復配列 RNA を過剰発現させる系を確立する。すなわち、両方向に向けた promoter をもつ発現ベクターに、それぞれの方向の反復配列の最小単位の n 倍 (n = 2 or 3 をまず作製) の長さのコンストラクトを組み込んで、過剰発現に用いる plasmid を作製する。ここでは、両方向のコンストラクトをヘアピン構造で結んだ一本の RNA として転写させる方法も考えられるが、その場合は生理的な発現の仕方と異なってしまふこと、ヘアピン構造に由来する人工的な修飾が加わる可能性が危惧されることから、bidirectional な発現ベクターを選択した。

(4) 反復配列過剰発現時の形質変化の観察:

このコンストラクトをまず培養細胞に過剰発現させ、生じる phenotype を観察する。の詳細な機構を解明するとともに、その他の細胞内情報伝達の攪乱や遺伝子発現変化などの獲得形質があるかについても検討を加える。

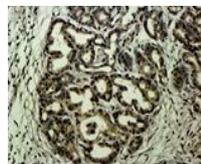
(5) 反復配列 RNA の発現制御可能な transgenic mouse の作製のためのコンストラクトの作製:

反復配列 RNA を in vivo で発現させるための transgenic mouse の作製のためのコンストラクトを作製する。

4. 研究成果

(1) 膵癌組織における反復配列由来の RNA 産物の発現の確認と膵癌診断への応用:

反復配列 RNA を in situ hybridization で発現を確認したところ、癌組織では 100%、これらの反復配列 RNA が発現している(下図)。同時にこの反復配列は正常組織ではほとんど発現していないことも確認している



癌組織での発現。

(2) 反復配列由来の RNA の方向性の検討:

Northern blotting によって、反復配列由来の RNA はゲノム DNA から 5' 3' 方向が中心に転写されていることが判明した。両方向に等量発現している場合は二本鎖 RNA が形成されるので、その結果 IFN シグナルなどが活性化するのではないかと考えられた。

(3) 過剰発現系コンストラクトの作製:

過剰発現下系コンストラクトを作製するために、bidirectional ベクターから両方向の反復配列を発現するベクターを作製した。

いっぽうで、一方向性のベクターも同時に作成し、形質変化の確認に用いることとした。発現は Northern blotting でセンス鎖・アンチセンス鎖の probe を用いて、それぞれを確認した。

(4) 反復配列過剰発現時の形質変化の観察:

両方向、片方向を発現させた細胞を観察した結果では、細胞分裂時の染色体の移動が不完全になり、さまざまな倍数体が生じることを観察した。さらに、活性酸素などの細胞ストレス条件下で、遺伝子障害を修復しにくいことを見出した。

その分子機構はまだ完全には解明できていないが、これらの反復配列 RNA が遺伝子修復に関わるタンパクの一部と結合し、その局在を変化させたり、遺伝子修復に必要な遺伝子発現の転写を抑えてしまうためと考えられた。

(5) 反復配列 RNA の発現制御可能な transgenic mouse の作製のためのコンストラクトの作製:

上記の結果に基づいて、それらの変化を in vivo でも観察するために、transgenic mouse を作製することを考え、そのためのコンストラクトを作製した。

マウスは既に個体として手に入っており、今後も検討を続けていく予定である。

上記のような結果で、癌組織の早期から発現してくる反復配列 RNA は、癌の遺伝子異常を惹起する中心的な要因になっていることが示唆された。

癌化の原因ではなく、癌化した後の癌細胞表現型を規定している因子ではないかと考えられ、これを抑えることが、癌化を抑えることにはならないにしても、癌の多様な遺伝子異常の惹起を抑えることになり、例えば遠隔転移や抗がん剤耐性などの変化を抑えることになるのではないかと考えられた。

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. Kishikawa T, #Otsuka M, Poh Seng T, Ohno M, Sun X, Yoshikawa T, Shibata C, Takata A, Kojima K, Takehana K, Ohishi M, Ota S, Noyama T, Kondo Y, Sato M, Soga T, Hoshida Y, Koike K. Decreased miR122 in hepatocellular carcinoma leads to chemoresistance with increased arginine. **Oncotarget** 2015 in press. [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=3234](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=3234)
2. Shibata C, #Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol.** 2015;7(1):1-6. doi: 10.4254/wjh.v7.i1.1.
3. Nakai Y, Isayama H, Sasahira N, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Saito K, Umefune G, Akiyama D, Kawahata S, Matsukawa M, Saito T, Hamada T, Takahara N, Mizuno S, Miyabayashi K, Mohri D, Hirano K, Tada M, Koike K. Risk factors for post-ERCP pancreatitis in wire-guided cannulation for therapeutic biliary ERCP. *Gastrointest Endosc.* 2015 Jan;81(1):119-26. doi: 10.1016/j.gie.2014.06.005.
4. Kogure H, Yamada A, Isayama H, Saito T, Hamada T, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Tada M, Koike K. Multiple metal stenting using a double-balloon endoscope for malignant biliary obstruction in a patient with hepaticojejunostomy. *Endoscopy.* 2014;46 Suppl 1 UCTN:E472-3. doi:10.1055/s-0034-1377541.
5. #Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. **J Gastroenterol.** 2014 Feb;49(2):173-84. doi: 10.1007/s00535-013-0909-8.
6. Yamamoto N, Isayama H, Sasahira N, Tsujino T, Nakai Y, Miyabayashi K, Mizuno S, Kogure H, Sasaki T, Hirano K, Tada M, Koike K. Endoscopic minor papillaballooning dilation for the treatment of symptomatic pancreas divisum. *Pancreas.* 2014 Aug;43(6):927-30. doi: 10.1097/MPA.0000000000000148.

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncr/na/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本夏代 (Yamamoto Natsuyo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40599578

(2) 研究分担者

大塚 基之 (Otsuka Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院消化器内科・助教 研究者番号：90518945

(3) 研究分担者

伊地知秀明 (Ijichi Hideaki)

東京大学・医学部附属病院消化器内科・助教 研究者番号：70463841