

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：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591920

研究課題名(和文)短鎖RNAによるホルモン治療抵抗性乳癌の新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Exploring a novel therapy of hormone-resistant breast cancer by short RNA

研究代表者

大江 賢治(Ohe, Kenji)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定講師

研究者番号：30419527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HMGA1aのRNA結合性スプライシング誘導機能をエストロゲン受容体アルファ(ER α)において研究する過程で、HMGA1a「おとり」RNAが、安定発現MCF-7乳癌細胞株のヌードマウスにおける腫瘍形成時にER α の選択的スプライシングに対し逆の効果を示した。HMGA1aの発現を抑制するマイクロRNA(miR-16)の発現減少、HMGA1aの発現増強が原因と考えられた。HMGA1a「おとり」RNAとの配列相補性よりmiR-16の生成を阻害している可能性があり、HMGA1aが自身を制御するマイクロRNA(miR-16)の発現を抑制するpositive feedback機構が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have found HMGA1a binds to RNA in a sequence-specific manner and induces alternative splicing. While investigating this function in the estrogen-receptor alpha(ER α) gene, we found a “decoy RNA” of HMGA1a reverses its effect on ER α when stable transfectants of MCF-7 mammary carcinoma cells form tumors in nude mice. Since the expression of miR-16, which is known to downregulate HMGA1a, is decreased in these tumors, and has a strong homology to HMGA1a RNA binding sequence in its seed sequence, we hypothesized HMGA1a regulates its own regulating micro-RNA by its sequence-specific RNA binding function. This implies a positive feedback mechanism of HMGA1a which is known as oncogenic protein product.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳腺外科学 エストロゲン受容体 癌遺伝子産物 選択的スプライシング RNA結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

HMGA1aはDNAに結合する転写因子として知られているが、配列特異的にRNAに結合して、スプライシング関連複合体であるU1 snRNPを介して、アルツハイマー病関連遺伝子であるpresenilin-2の異常スプライシングを惹起することを見出した(図1)。この場合、低酸素によるHMGA1aの発現誘導が主因であったが、HMGA1は癌遺伝子産物としても知られているので癌組織においても同様の異常スプライシングが生じる可能性を考えた。

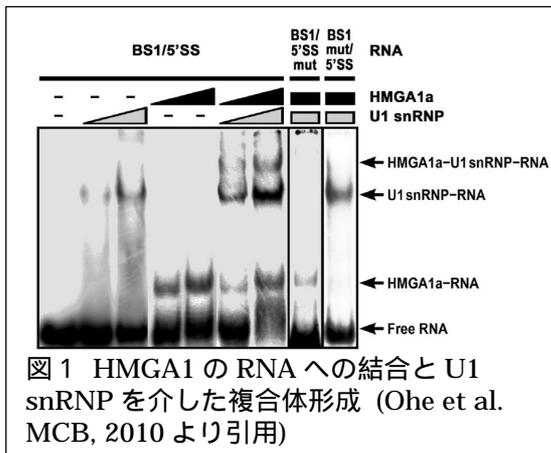


図1 HMGA1のRNAへの結合とU1 snRNPを介した複合体形成 (Ohe et al. MCB, 2010 より引用)

エストロゲン受容体アルファ(ER α) mRNA前駆体の選択的スプライシングにより、ER46が発現し、全長ER α の作用を標的DNA結合配列において競合的に阻害することが知られている。申請者は、癌遺伝子産物HMGA1aのRNA結合配列に5'スプライス部位を付加した配列(5'-GCUGCUACAAGGU-3')(太字のGUが5'スプライス部位)をER α 遺伝子のゲノム上をClustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustal/>)を用いて検索したところ、ER α エクソン1にHMGA1a RNA結合配列を見つけた。本研究応募までに、明らかにしたこと(論文投稿予定)を列挙すると、

(1) ER α エクソン1のHMGA1aのRNA結合配列と隣接する5'スプライス部位と下流の正規5'スプライス部位を含むRNAを作製し、RNAゲルシフトにより、HMGA1a蛋白質がER α エクソン1へ配列特異的に結合することを確認した。

(2) HMGA1aのRNA結合配列を「おとり」RNAとしてMCF-7乳癌細胞株に一過性に発現させたところ、HMGA1a「おとり」RNAは予想通り、ER α エクソン1の選択的スプライシングにより生じるER46の発現を低下させ、HMGA1aを再び発現させるとER46の発現が上昇した。

(3) HMGA1aによるER46の選択的スプライシングの分子メカニズムを明らかにするために、まず、in vitro splicing解析によるHMGA1aによるER46エクソン1の除外とHMGA1a「おとり」RNAによるエクソン含有を確認した。

(4) さらに、ソラレン UV クロスリンク

ング解析により、U1 snRNAと正規5'スプライス部位の結合を認めたが、HMGA1aを加えるとU1 snRNAが上流の偽5'スプライス部位へ結合することを見出した。正規5'スプライス部位の変異により偽5'スプライス部位へのU1 snRNAの結合がHMGA1aにより増強した。逆に、偽5'スプライス部位の変異により正規5'スプライス部位へのU1 snRNAの結合がHMGA1aにより減弱した。

(5) U1 snRNAと5'スプライス部位の結合により、5'スプライス部位がアンチセンスDNA/RNaseHにより切断しにくくなることを利用し、HMGA1a添加により偽5'スプライス部位が切断しにくく、正規5'スプライス部位が切断しやすくなることをRNaseHプロテクソン解析により明らかにした。

(6) 実際の腫瘍増殖への影響を解析するため、HMGA1a「おとり」RNAの安定発現MCF-7細胞株を作製し、ウエスタンブロットにてER46蛋白質の減少を確認し、ヌードマウスへの移植実験を行なったところ、腫瘍増殖が促進された。

2. 研究の目的

当初の計画では、ER46蛋白質の減少により乳癌増殖が誘発されたので短鎖アンチセンスRNAにより、逆にER46蛋白質を発現させ乳癌増殖への影響を検討したいと考えた。また、ER α 陰性化に関与するマイクロRNAの共通モチーフを見つけたので、短鎖アンチセンスRNAによる全長ER α 、ER46の陽性化を試みて、ER46とHMGA1aの乳癌サブタイプや乳癌幹細胞様細胞における位置づけを確立し、薬剤送達システムを工夫して、短鎖RNAによる乳癌治療開発を試みたい、と考へ研究計画を立案した。しかし、いくつかの懸念事項のため、優先させたい実験を先に行なった。

<懸念事項1> HMGA1aの配列特異的RNA結合が重要なので、RNA-EMSA以外の方法で結合を確認したかった。

<懸念事項2> ER46は、全長ER α の増殖を介する作用を拮抗的に阻害することが知られているが、HMGA1aが選択的スプライシング制御によりER46の発現上昇を誘導することは、癌遺伝子産物であるHMGA1aが癌抑制的に働くことになる。

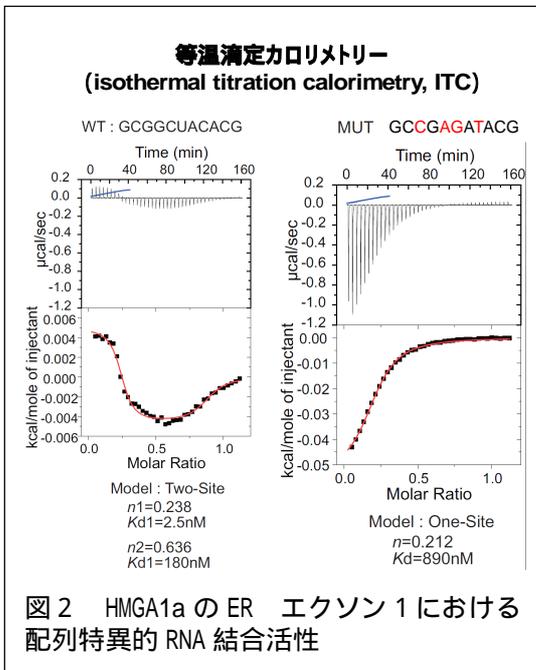
3. 研究の方法

<懸念事項1> HMGA1aの配列特異的RNA結合等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry)を用いた。

<懸念事項2> 腫瘍組織の解析を行なった。

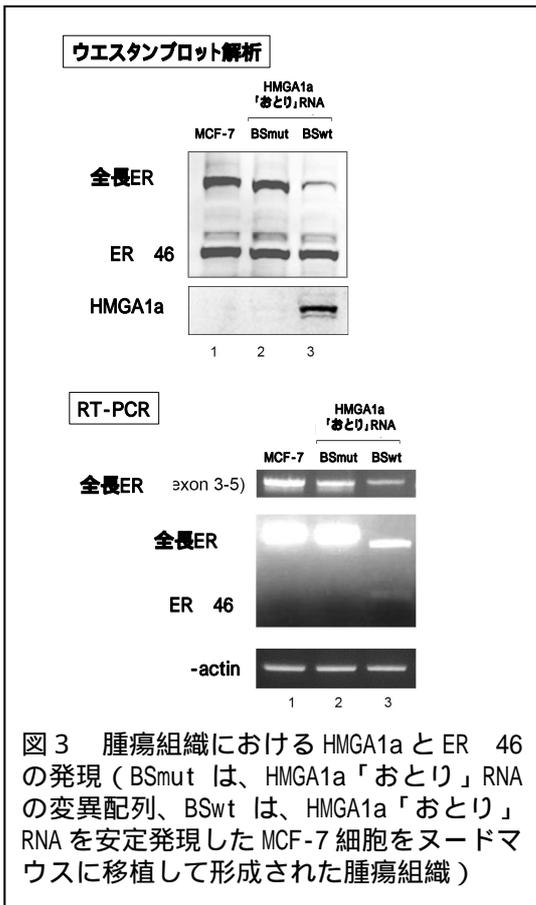
4. 研究成果

<懸念事項1> HMGA1の精製蛋白質を用いて、RNAゲルシフト解析および等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry)を用いて配列特異的RNA結合活性を確認した(図2)(桑迫香奈子、武藤裕(理研(現武蔵野



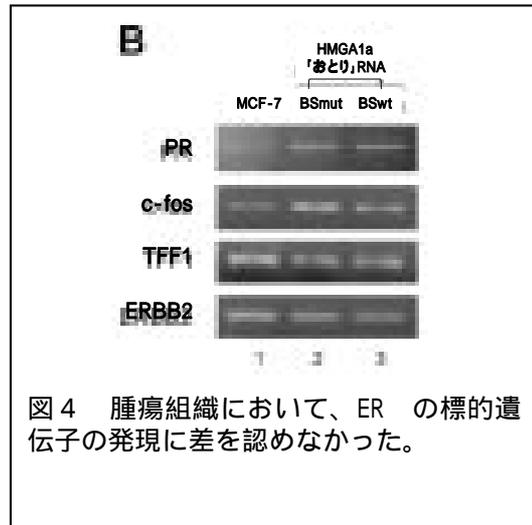
大学薬学部)に依頼)。HMGA1aのRNAゲルシフトで認められた高親和性と低親和性のHMGA1aの結合は、等温滴定カロリーメトリーにおいても認められた。

<懸念事項2>腫瘍組織の解析を行なった。
1. HMGA1a「おとり」RNAの安定発現 MCF-7細胞株は腫瘍形成により HMGA1aの発現上昇を認めた。



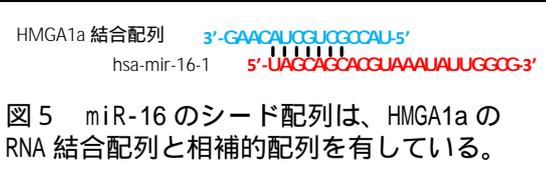
HMGA1a「おとり」RNAの安定発現 MCF-7細胞株をヌードマウスへの移植し腫瘍形成を認めた腫瘍において、HMGA1a蛋白質の発現上昇およびそれに伴う全長ER蛋白質の発現低下を認めた(ウエスタンブロット解析)。また、RT-PCRにより、HMGA1a蛋白質の発現上昇に伴い、全長ER mRNAの低下とER 46 mRNAの発現上昇を認めた(図3)

2. HMGA1a「おとり」RNA安定発現 MCF-7細胞の移植腫瘍組織におけるER標的遺伝子の発現を調べたところ、プロゲステロン受容体(PR)、c-fos、Trefoil factor 1(TFF-1)、HER2(ERBB2)の発現に変化を認めなかった(図4)。



3. 腫瘍組織において、HMGA1a結合配列と相補的な配列をもつmiR-16の発現低下を認めた。

miR-16は、HMGA1aを標的にしてその発現レベルを調節することが報告されている。miR-16の配列を調べると、図5に示すようにmiR-16のシード配列は、HMGA1aの結合配列と相補性を認めた。



miScript miRNA PCR(Qiagen)により、miR-16、miR-21、RNU-6の発現を確認したところ、miR-21やRNU-6に比べ、miR-16の発現は、HMGA1a「おとり」RNA発現 MCF-7細胞の腫瘍組織において低下していた(図6)。miR21は、トリプルネガティブ乳癌において発現上昇を認めるが、図6の腫瘍組織において顕著な差を認めなかった。

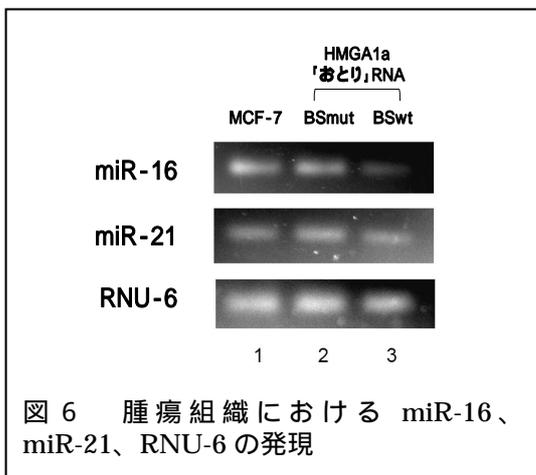


図6 腫瘍組織における miR-16、miR-21、RNU-6 の発現

<まとめ>

以上より、HMGA1a「おとり」RNA 安定発現 MCF-7 細胞株は、HMGA1a の配列特異的 RNA 結合活性を阻害することにより ER 46 蛋白質の減少を認めていた(事項1.(6))が、形成されたヌードマウスの腫瘍では、逆に全長 ER 蛋白質の減少、すなわち、ER 46/全長 ER 蛋白質比の上昇を認めた(図3上パネル lane3)。RT-PCR においても、ER 46/全長 ER mRNA 比の上昇を認めた(図3下パネル lane3)ことより、HMGA1a「おとり」RNA の効果が失われ逆に HMGA1a のスプライシング効果が顕著になった。

この原因を探るため、HMGA1a 蛋白質の発現を調べたところ、著明な発現上昇を認めた(図3上パネル lane3)。HMGA1a「おとり」RNA により、フィードバックがかかったと考えられた。このフィードバックの原因として、miR-16 のシード配列の HMGA1a RNA 結合配列と相補的な部分が関与していると考えられ、miR-16 の発現を調べた。HMGA1a「おとり」RNA を安定発現した MCF 細胞の腫瘍組織では、miR-21 や RNU-6 に比べ、miR-16 の発現が低下していた。miR-16 は、細胞増殖抑制、癌細胞のアポトーシス促進に働くことが知られており、HMGA1a「おとり」RNA が核内で miR-16 の生成を阻害したと考えられる。その作用に関して、図7のような分子機構が考えられた。

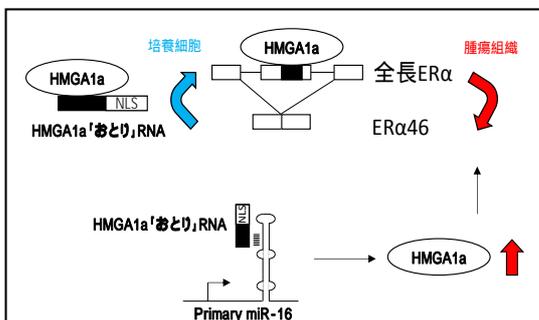


図7 HMGA1a「おとり」RNA の作用 安定発現 MCF-7 細胞株と MCF-7 の腫瘍組織における分子メカニズム

図7の分子機構から推定されることは、HMGA1a が自身の microRNA の発現を抑制する positive feedback により腫瘍増殖とともに HMGA1a の miR-21 抑制が増強される、ことである(図8)。論文投稿予定である。

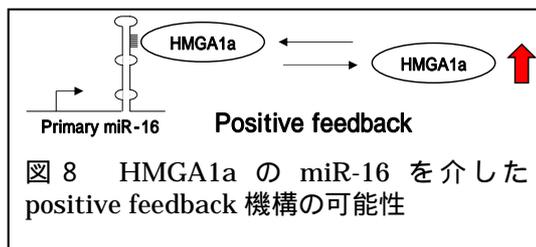


図8 HMGA1a の miR-16 を介した positive feedback 機構の可能性

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)

Ohe K, Hagiwara M. Modulation of alternative splicing with chemical compounds in new therapeutics for human diseases. ACS chemical biology 10(4):914-924, 2015. 査読あり。

Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, Hagiwara M. Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112:2764-2769, 2015. 査読あり。

Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. Identification of a gene associated with autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. The Lancet Neurology. 14:274-282 2015. 査読あり。

Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. Sci. Rep. 4:6841. doi: 10.1038/srep06841, 2014. 査読あり。

Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA. Sci. Rep. 3:2931. doi: 10.1038/srep02931, 2013. 査読あり。

Suzuki H, Kameyama T, Ohe K, Tsukahara T, Mayeda A. Nested introns in an intron: Evidence of multi-step splicing in a large intron of the human dystrophin pre-mRNA.

FEBS Letters 587(6):555-561, 2013. 査読あり。

〔学会発表〕(計7件)

大江賢治、吉田真弓、片岡直行、二宮賢介、武内章英、萩原正敏 1. Rbm24 は、家族性自律神経失調症の組織特異的異常スプライシングに關与する。第120回日本解剖学会総会(2015.3.21-23, 神戸国際会議場)

片岡直行、吉田真弓、宮内健常、大江賢治、薄井知美、鈴木勉、萩原正敏 家族性自律神経失調症における IKBKAP 遺伝子の異常スプライシングの低分子化合物による是正。第16回日本RNA学会年会(2014.7.23-25, 名古屋市)

Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Iida K, Usui T, Ohe K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, Hagiwara M. RECTAS, a candidate of the therapeutic drug for Familial dysautonomia, rectifies aberrant splicing of IKBKAP. RNA society annual meeting 2014, Plenary Session, 2014.6.3-8 Quebec City, Canada)

Ohe K, Miyajima S, Kuwasako K, Yoshimura N, Ohno K, Harada N, Muto Y, Utsumi T, Mayeda A. HMGA1a is responsible for inducing alternative splicing of Estrogen receptor-alpha and modulates growth in MCF-7 mammary carcinoma cells. EUKARYOTIC mRNA PROCESSING meeting (CSHL 2013.8.20-24 New York City, U.S.A.) Poster presentation

Ohe K, Kuwasako K, Miyajima S, Yoshimura N, Muto Y, Ohno K, Harada N, Utsumi T, Mayeda A. HMGA1a Induces Alternative Splicing of Estrogen Receptor alpha by Trapping U1 snRNP to an Upstream Pseudo 5' Splice Site in Human Mammary Carcinoma Cells. グローバル COE 形成プログラム「機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点」4th international symposium (2012.11.16 名古屋市、ウェスティンナゴヤキャッスル) ポスター発表

宮島慎介、大江賢治、牛窓かおり、引地理浩、小林尚美、前田明、内海俊明。乳癌における癌遺伝子産物 HMGA1a による ER 46 の発現調節機構。第20回日本乳癌学会学術総会(2012.6.28-30 熊本市) 口頭発表

大江賢治、宮島慎介、内海俊明。HMGA1 に対する「おとり」RNA は、エストロゲン受容体 -46 アイソフォームの選択的スプライシングを改変し、腫瘍増殖を促進する。第85回日本内分泌学会術総会(2012.4.19-21 名古屋市) ポスター発表

〔図書〕(計3件)

大江賢治、萩原正敏。選択的スプライシング・ネットワークを化合物で操作する。金原一郎医学医療振興財団 生体の科学

特集「細胞を化学で観察する・操作する」66(2):114-118, 2015. 査読なし。

大江賢治、萩原正敏。選択的スプライシングを標的とした低分子化合物の医薬品開発。BIO Clinica 29(3): 95-99, 2014. 査読なし。

Ohe K, Masuda A, Ohno K. Intronic and exonic nucleotide variations that affect RNA splicing in humans. Genomics I - Humans, Animals and Plants. ISBN: 978-1-477554-91-3. iConcept Press, 2013. 査読あり。

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

ホームページ等

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

https://www.researchgate.net/profile/Ke-nji_Ohe2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大江 賢治 (OHE KENJI)

京都大学大学院学際融合教育研究推進センター・健康長寿社会の総合医療開発ユニット(LIMS) 特定講師

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