

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790705

研究課題名(和文) 選択的ポリアダニレーションを介した新たな発癌機構の解明

研究課題名(英文) A new mechanism of alternative polyadenylation-dependent carcinogenesis

研究代表者

西田 憲生 (NISHIDA, Kensei)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10624033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸癌細胞HCT116を用いたリアルタイムPCR法を用いた遺伝子発現解析の結果、酸化ストレス下において、JUN遺伝子の3'UTR長が、ストレスと共に短縮化することを同定した。また、エキソアレイを用いて網羅的解析により、腫瘍抑制遺伝子依存的に3'UTR長が調節される遺伝子を同定した。複数の癌細胞株を用いてスクリーニング解析では、CCND1のポリアダニレーション部位のスクリーニングにより近位ポリアダニレーション部位を用いている細胞株は、乳がん細胞株MB453のみであった。

研究成果の概要(英文)：Alternative polyadenylation events in HCT116 human colon cancer cell lines were analyzed using exon array and real-time RT-PCR. We revealed that arsenite stress shorten the length of 3'UTR in JUN gene. We identified that eleven genes whose 3'UTRs were shortened in the cells knockout of a tumor suppressor gene. MB453 breast cancer cell lines preferred to use the proximal polyadenylation site of CCND1.

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：ポリアダニレーション ストレス 発がんメカニズム

1. 研究開始当初の背景

ポリアデニレーションは、mRNA プロセッシング過程において、pre-mRNA に polyA を付加する反応である。近年、ゲノムワイドな網羅的解析の結果、通常とは異なる部位に polyA 付加反応がおき、3' UTR の長さが異なる mRNA isoform を生成する選択的ポリアデニレーションが、全遺伝子の約 50% に存在することが明らかになった。3' UTR は、microRNA や RNA 結合タンパク質により制御される機能領域を多く含む。幼若な癌細胞では、複数の癌遺伝子で 3' UTR の短い mRNA isoform が増加し、mRNA の安定性、翻訳効率が上昇することが報告されており、3' UTR に存在する機能領域の欠如が、癌細胞の異常増殖に関わると想定されている。このように、3' UTR 長の調節による遺伝子制御機構は、多くの遺伝子に普遍的に認められ、特に、細胞分化や癌細胞における新たな遺伝子制御の基本メカニズムとして注目されている。しかしながら、発癌制御に関わる選択的ポリアデニレーションの詳細なメカニズムは全く分かっていない。選択的ポリアデニレーションによる癌遺伝子制御機構に着目した研究は、今後大きく発展すると考えられ、本研究では、癌遺伝子 *Cyclin D1* をターゲットとし、選択的ポリアデニレーションを介した大腸癌発癌の新規メカニズムの解明を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、選択的ポリアデニレーションを介した遺伝子発現調節メカニズムの解明と発がんとの関連について明らかにすることを目的とした。具体的には、1) 酸化ストレス化における 3' UTR の調節機構、2) 選択的ポリアデニレーション反応のターゲット遺伝子の探索、3) 癌遺伝子 *Cyclin D1* を標的とした選択的ポリアデニレーションを介した新たな発癌メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス下における 3' UTR 長の変化

大腸癌細胞株 HCT116 細胞に亜ヒ酸ナトリウム 100 μ M を添加し、経時的にサンプルを回収したのち、RNA iso plus を用いて total RNA を抽出した。total RNA から cDNA を作製し、JUN 遺伝子の 3' UTR 領域に予想される polyadenylation sites の上流と下流の計 3 箇所プライマーを設計し、リアルタイム PCR 法 (ABI7500 system) にて遺伝子発現解析をおこなった。

(2) エクソンアレイを用いた選択的ポリアデニレーションを持つ遺伝子のスクリーニング

DNA 障害の条件において、3' end processing 反応は抑制されることが報告されている。このため、選択的ポリアデニレ

ーション反応制御機構の存在について、検討を行った。HCT116 を用いて、腫瘍抑制遺伝子の有無の 2 条件のサンプルから total RNA 抽出し GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array を用いて、全遺伝子の exon 発現情報を GeneSpring software で解析を行った。得られたデータより、3' UTR 長に変化のあった遺伝子を抽出し、3' UTR 領域にプライマーを設計しリアルタイム PCR 法を用いて validation を行った。

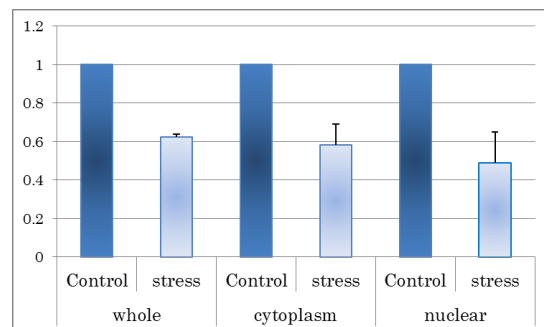
(3) *CCND1* の選択的ポリアデニレーション反応機構の解明

3' RACE 法を用いて *CCND1* のポリアデニレーション部位の同定を行う。また、複数の細胞株ならびに組織の違いによる *CCND1*-3' UTR 長の変化をリアルタイム PCR 法を用いて検討を行う。

4. 研究成果

(1) HCT116 細胞に亜ヒ酸ナトリウムを添加すると JUN 遺伝子レベルは、添加後 30 分以降に著しく上昇した。3' UTR 長の変化をリアルタイム PCR 法で測定すると、酸化ストレス負荷に伴い、3' UTR 長が短くなることが確認された。3' UTR 長は、mRNA の安定性にも寄与することから、細胞分画を行い、詳細に検討すると核内においても 3' UTR 長が短くなっていた。また、mRNA の安定性は、3' UTR 長の長さに関係しないことも確認された。以上のことから、JUN 遺伝子の 3' UTR 長の変化は、選択的ポリアデニレーション反応が関与していることが示唆された。(図 1)

図 1: Jun 遺伝子の 3' UTR 長の長さの変化



縦軸: RUD, relative usage of distal polyA

(2) HCT116 を用いて、腫瘍抑制遺伝子の有無の条件で抽出した RNA を Exon array を用いて解析したところ、腫瘍抑制遺伝子依存性に 3' UTR 長が変化する遺伝子を 12 遺伝子抽出した。このうち、3 遺伝子については、リアルタイム PCR 法にて validation に成功した。これらの遺伝子のうち、3' UTR 長が短くなり mRNA の発現量が増加するものが 2 つであった。この二つの遺伝子うち一つは、これまで発がんにおける機能解析が十分にされておらず、現在、その機能解析を行っているところである。(図 2)

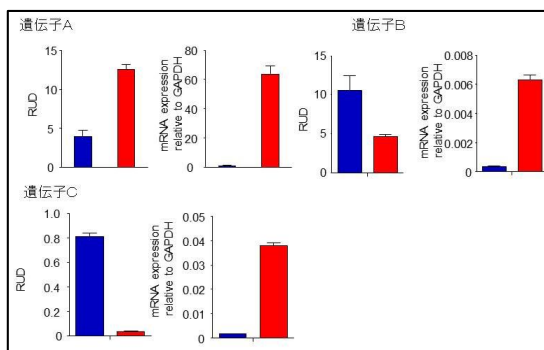


図2 腫瘍抑制遺伝子依存性の3' UTR長の調節機構の存在が示唆される遺伝子

(3) CCND1の選択的ポリアデニレーションの変化を複数の細胞株でリアルタイムPCR法を用いて検討を行った。(図3)多くの細胞株では、distal polyA部位を選択的に用いているが、特定の乳がん細胞株は、proximal polyA siteを選択的に用いていることが明らかとなった。現在は、乳がん細胞株をもちいて、CCND1の選択的ポリアデニレーション反応を制御している因子の同定を行っている。

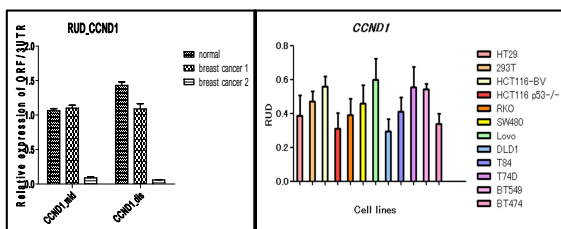


図3：乳がん細胞株および、大腸癌細胞におけるCCND1の選択的ポリアデニレーション部位の違い

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Kano S, Nishida K, Kurebe H, Nishiyama C, Kita K, Akaike Y, Kajita K, Kurokawa K, Masuda K, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306(3):C250-262, 2014, DOI: 10.1152/ajpcell.00091.2013. 査読有

Kano S, Nishida K, Nishiyama C, Akaike Y, Kajita K, Kurokawa K, Masuda K, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 accelerates cell growth through up-regulating c-Jun expression. *J Med Invest*. 60(3-4):228-235, 2013 査読有

Honda M, Kuwano Y, Katsuura-Kamano S, Kamezaki Y, Fujita K, Akaike Y, Kano S, Nishida K, Masuda K, Rokutan K. Chronic academic stress increases a group of

microRNAs in peripheral blood. *PLoS One*. 8(10):e75960, 2013, DOI:10.1371/journal.pone.0075960. eCollection 2013. 査読有

Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K, Imoto I. NF90 in posttranscriptional gene regulation and microRNA biogenesis. *Int J Mol Sci*. 14(8):17111-17121, 2013, DOI: 10.3390/ijms140817111. 査読有

Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K. Application of DNA microarray technology to gerontological studies. *Methods Mol Biol*. 1048:285-308, 2013 DOI: 10.1007/978-1-62703-556-9_19. 査読有

Yamagishi N, Teshima-Kondo S, Masuda K, Nishida K, Kuwano Y, Dang DT, Dang LH, Nikawa T, Rokutan K. Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 13:229, 2013, DOI: 10.1186/1471-2407-13-229. 査読有

Kajita K, Kuwano Y, Kitamura N, Satake Y, Nishida K, Kurokawa K, Akaike Y, Honda M, Masuda K, Rokutan K. Ets1 and heat shock factor 1 regulate transcription of the Transformer 2 gene in human colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 48(11):1222-1233, 2013, DOI: 10.1007/s00535-012-0745-2. 査読有

Katsuura S, Kuwano Y, Yamagishi N, Kurokawa K, Kajita K, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. MicroRNAs miR-144/144* and miR-16 in peripheral blood are potential biomarkers for naturalistic stress in healthy Japanese medical students. *Neurosci Lett*. 516(1):79-84, 2012, DOI: 10.1016/j.neulet.2012.03.062. 査読有

Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol*, 47(8):883-895, 2012, DOI:10.1007/s00535-012-0547-6. 査読有

Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K. General RBP expression in human tissues as a function of age. *Ageing Res Rev*, 11(4):423-431, 2012, DOI: 10.1016/j.arr.2012.01.005. 査読有

[学会発表](計13件)

西田憲生, 赤池瑤子, 増田清士, 佐竹謙, 藤田絹代, 狩野静香, 桑野由紀, 六反一仁, Homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2)は、クロマチン構成因子 heterochromatin protein 1 (HP1)をリン酸化し、トリメチル化ヒストン H3 Lys9への結合を阻害する 第8回臨床ストレス応

答学会大会 信州大学(長野県), 2013年11月16日

狩野静香、西田憲生、赤池瑤子、藤田絹代、佐竹謙、桑野由紀、六反一仁、酸化ストレス下における truncated SRSF3 タンパク質のインターロイキン8発現調節機構、第8回臨床ストレス応答学会大会 信州大学(長野県), 2013年11月15日

喜多堅太郎、西田憲生、桑野由紀、赤池瑤子、狩野静香、六反一仁、酸化ストレス下におけるスプライシング調節因子 SRSF3 の機能解析、第29回日本ストレス学会学術総会 徳島大学大塚講堂(徳島県), 2013年11月8日

宮原圭吾、桑野由紀、西田憲生、赤池瑤子、狩野静香、六反一仁、ストレス応答性 Transformer 2b 遺伝子の発現を介した細胞増殖の調節メカニズム、第29回日本ストレス学会学術総会 徳島大学大塚講堂(徳島県), 2013年11月8日

Shizuka Kano, Kensei Nishida, Yuki Kuwano, Kensei Masuda, Ken Kurokawa, Kazuhito Rokutan. Ultraconserved exon-containing SRSF3 mRNA isoform is specifically translated to the truncated SRSF3 protein under oxidative stress. 第35回日本分子生物学会 マリンメッセ福岡(福岡県)、2012年12月11日

赤池瑤子、増田清士、黒川憲、佐竹謙、梶田敬介、本田真奈美、藤田絹代、西田憲生、桑野由紀、六反一仁、HIPK2 はクロマチン構成因子 HP1と相互作用し DNA 修復を制御する、第35回日本分子生物学会 マリンメッセ福岡(福岡県)、2012年12月13日

西田憲生、本田真奈美、桑野由紀、藤田絹代、梶田敬介、赤池瑤子、増田清士、六反一仁 健常大学生の医師国家試験ストレスに反応する末梢血マイクロRNAの検索 第28回日本ストレス学会学術総会 会議・研修施設 ACU(北海道) 2012年12月1日

桑野由紀、梶田敬介、佐竹謙、赤池瑤子、本田真奈美、藤田絹代、西田憲生、増田清士、六反一仁. 選択的スプライシング因子 Tra2 を介した Bcl-2 の転写後調節, 第7回臨床ストレス応答学会大会 東京女子医科大学弥生記念講堂(東京都), 2012年11月24日

赤池瑤子、増田清士、黒川憲、佐竹謙、梶田敬介、本田真奈美、藤田絹代、西田憲生、桑野由紀、六反一仁、HIPK2 はクロマチン構成因子 HP1と相互作用し DNA 修復を制御する、第7回臨床ストレス応答学会大会東京女

子医科大学弥生記念講堂(東京都), 2012年11月24日

西田憲生、増田清士、六反一仁、酸化ストレス下特異的に誘導される truncated SRSF3 protein の新規機能解析、第20回日本消化器関連学会週間 神戸国際展示場(兵庫県) 2012年10月11日

増田清士、西田憲生、六反一仁. 酸化ストレスにおける選択的スプライシング制御異常と消化器がん発症機構の解明. 第20回日本消化器関連学会週間 神戸国際展示場(兵庫県) 2012年10月10日

増田清士、神田瑞希、赤池瑤子、本田真奈美、梶田敬介、佐竹謙、黒川憲、山岸直子、西田憲生、桑野由紀、六反一仁 アドリアマイシンによる、選択的スプライシング制御を介した新たな腫瘍抑制分子機構 第97回日本消化器病学会四国支部例会 徳島県郷土文化会館(徳島県) 2012年6月30日

赤池瑤子、増田清士、山岸直子、黒川憲、佐竹謙、梶田敬介、本田真奈美、西田憲生、桑野由紀、六反一仁、酸化ストレス下での、HuR による transformer 2-beta (Tra2) の選択的スプライシング制御機構、第97回日本消化器病学会四国支部例会 徳島県郷土文化会館(徳島県)、2012年6月30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 憲生 (NISHIDA, Kensei)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 10624033