

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293076

研究課題名(和文) 非コード反復配列RNAの発現を主因とした多段階発癌の発癌機構の解明と制御

研究課題名(英文) Multi-step carcinogenesis due to non-coding repetitive RNA expression

研究代表者

大塚 基之(Otsuka, Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90518945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌は癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異に伴う多段階発癌が主要な発癌経路であると推定されているが、なぜそれらの遺伝子変異が最終的に雑多な遺伝子異常を伴う細胞癌化に結びつくのかははまだ明確になっていない。本申請では、多段階発癌の初期の遺伝子異常の段階から非コード反復配列RNAが発現し、DNA修復因子であるYB-1蛋白と結合し細胞質に局在させることを明らかにした。この反復配列がゲノムDNAやミトコンドリアDNAの変異修復を阻害することで、細胞内環境を攪乱しDNA損傷を惹起することをつきとめた。反復配列RNAのYB1への結合を阻害するなどの介入法によって発癌を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：While oncogenesis is a process with multi-step mutations of oncogenes and tumor suppressor genes, the molecular mechanisms why and how such mutations accumulate during the carcinogenesis steps. In this study, it was revealed that non-coding repetitive RNA, which express at the early phase of carcinogenesis, binds to YB-1, a repair gene, and suppresses its function. Due to this, mutations of genomic DNA and mitochondrial DNA accumulate and the intracellular circumstances are disturbed, which leads to carcinogenesis. Based on these results, intervention to inhibit the binding between repetitive RNA and YB1 may be useful for the suppression of carcinogenesis steps.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子腫瘍学 非コードRNA ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は近年、消化器癌の発癌機序の解明と制御法について、非コード RNA の機能攪乱を素因とする発癌という観点を中心に解析を続けている。近年でこそ本邦でも多くの研究者が非コード RNA の研究を行なっているが、そもそも本研究代表者は、非コード RNA の黎明期から、哺乳類における microRNA (miRNA) の *in vivo* での生理的機能の解明をめざして研究に従事してきた。特に、mature な miRNA の生成に必須の分子である Dicer 遺伝子の deficient mouse を世界に先駆けて作製し、ウイルス感染時や血管新生時における miRNA の *in vivo* での意義を明らかにした (Otsuka. *Immunity*. 2007;27:123-34、Otsuka. *J Clin Invest*. 2008;118:1944-54、など)。その研究過程において、miRNA の産生不全によって大腸・肝臓における発癌が促進されることを観察し(未発表データ)、miRNA の生理機能が損なわれると易発癌性に傾くというという観点から癌研究に注力してきた。

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 k-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*. 2006:3147)。このマウスで大切な点は、TGF-beta receptor の knockout を除いて constitutively active k-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。

これまでの申請者の検討で、この多段階膵癌マウスモデルの 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 と呼ばれる領域)からの非機能性 RNA 産物が増えることをみいだしていたが、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*. 2011:593.)。このような反復配列は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の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 及び膵癌組織で高発現していることから、発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、多段階発癌の中でも解明の遅れている膵癌をまず最初のモデルとしてその *in vitro*, *in vivo* での検証を行ない、難治癌の予防・治療に応用することを発案した。

本申請のもう一人の分担研究者(前田)は、これまで様々な遺伝子改変マウスを用いて種々の組織の癌の発生進展について多数の報告をしてきた (Maeda et al. *Cell* 2005:977, Luo, Maeda et al. *Cancer Cell* 2004:297, Naugler, Maeda et al. *Science* 2007:121、など)。そこで今回の研究で得られる可能性のある知見について、他の臓器組織の多段階発癌モデルにおいても普遍性をもった発癌機構として観察されるか(大腸癌の前癌病変と考えられる大腸線腫においても非コード反復配列 RNA が発現していることはすでに確認済みである)、分担研究を依頼した。

これらの反復配列 RNA 産物の発現は、phenotypic な変化(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になっているとも考えられる。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 RNA の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ともに遺伝子異常の修復不全がおきるという *in vitro* の観察結果をすでに得ていた。

2. 研究の目的

1) **反復配列 RNA の発現自体が細胞分裂時の染色体分配の異常や遺伝子異常を惹起し発癌に至るのでは」という仮説を立ててその検証を行なう。** そのために、本申請研究内では、反復配列 RNA および反復配列 RNA に対するノックダウンコンストラクトの transgenic mouse を発現制御可能な状態で作製し、種々の遺伝子改変マウスによる多段階発癌モデルを駆使して、遺伝子変異から始まる非機能性反復配列 RNA が惹起する細胞癌化の普遍的な分子機構を明らかにする。

2) これまで研究代表者が解明してきた「慢性炎症性発癌の分子機構と制御」の続編として、もうひとつの主要な発癌経路である「癌遺伝子変異による多段階発癌」の発癌機構の解明と制御を、本研究代表者と研究分担者の得意分野を融合させることによって強力に推進し、多段階発癌の普遍的な分子機構を解明し、これまでの分子標的治療とは異なる視点で発癌の制御につなげる

3. 研究の方法

1) **膵癌組織における反復配列由来 RNA 産物の発現の確認:**

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組織の in situ hybridization にて確認する。実際にはこの検定は終了しており、癌組織では 100%これらの反復配列 RNA (マウスの場合は major satellite, ヒトの場合は HSATII) が発現していた (下図)。いっぽうこの反復配列 RNA は 正常組織ではほとんど発現していない。また、重要なことに k-ras 変異だけを持ったマウスにできる膵前癌組織である PanIN でも反復配列 RNA が 100%発現することを確認している。

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、培養細胞、あるいはモデルマウス由来組織を用いた Northern blotting 法にて、sense 側 probe, anti-sense 側 probe の両者を使って確認する。実際には この検討は既に済んでおり、癌細胞では両方向性の RNA が発現しているものの、一方の dominant な transcript の存在が確認された。

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、反復配列 RNA を過剰発現させる系を確立する。CMV promoter をもつ発現ベクターに mouse major satellite のうち dominant な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。反復配列は PCR による増幅が難しいため人工遺伝子として insert を作製し載せ換える方針とした。並行して、transgenic mouse 作製のために、tetracyclin による発現の on-off が制御可能な promoter 下のベクターにも載せ換えを行なった。

4) 反復配列 RNA の発現制御可能な transgenic mouse の作製 :

上記のコンストラクトから、promoter 部分を含めて切り出し transgenic mouse を作製する。テトラサイクリンによる発現制御には、テトラサイクリン応答遺伝子を発現する transgenic mouse との交配が必要となるが、膵臓での解析を念頭において、膵管上皮で特異的にテトラサイクリン応答遺伝子を発現する Pdx promoter-Tet transgenic mouse (ただしこれは成体では 腺房細胞での発現が中心となる) と CMV promoter-Tet transgenic mouse (CMV promoter のため理論的には全身で発現するはずであるが、成体では膵と腎臓と胸腺に比較的限局して働く) と報告されている (*Gut* 2007:227) を入手し (ともに commercial に available) Tet 応答性プロモーター下に反復配列を発現するコンストラクトを持つ transgenic mouse との掛け合わせに用いて、まず膵組織において反復配列 RNA の発現を時間的に制御できるマウスを作製する。

5) 非コード反復配列 RNA 過剰発現時の細胞形質変化の観察 :

恒常的プロモーターによって major satellite RNA が発現するコンストラクトを培養細胞に強制発現させ、生じる phenotype の変化を観察する。その際、通常の癌細胞株ではすでに様々な遺伝子変異が蓄積しているため検討したい表現型が検出できない可能性もあるため、用いる細胞株としては、先のマウスモデルから単離し immortalize して樹立した PanIN 組織由来の独自の細胞株を選択する。Preliminary な結果では、mouse major satellite RNA 存在下では細胞分裂時の染色体の移動が不完全になること (下図 囲み)・抗癌剤で DNA の変異を誘導した際の修復不全が起きること、を観察している。これらの結果をもとにして、PanIN 細胞を xenograft としてマウスに移植した際の可植性の観察と in vitro での colony formation assay などによって、反復配列 RNA の発現による前癌細胞の transform 誘導について検討する。並行して、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。これらの点は、反復配列 RNA が積極的に細胞内環境の異常を惹起しているのかを見極める点で重要であるため、複数の手法をもって確認に努める。

6) 非コード反復配列 RNA と結合する細胞蛋白の同定 :

6)-a) 多くの非コード RNA は細胞内の蛋白と結合することによって機能を発揮する。例えば microRNA は Argonaute 2 や Dicer と結合し、長鎖非コード RNA である HOTAIR は PRC2 蛋白と結合し機能を発揮することが知られている。そこで、反復配列 RNA の機能の解明と制御法の開発を目的として、反復配列 RNA と結合しうる細胞内蛋白を同定する。このための基礎となる検討として、まず反復配列 RNA の細胞内局在を in situ hybridization・および核と細胞質に分けて抽出した RNA を用いた Northern blotting にて確認する。この検討はすでに一部終了しており、反復配列 RNA は主に各周囲の細胞質に局在することを確認している。

6)-b) 次に in vitro transcription にて biotin label した反復配列 RNA を作製し、それと細胞質と核から抽出した蛋白とを in vitro で混ぜたのち抗 biotin 抗体 にて免疫沈降 (RNA-IP) を行なう。それによって得られた蛋白をゲルに展開し質量分析法によって結合蛋白を同定する。実際にはこの検討の一部は既に終了しており、細胞分裂時の中心体形成に関わる蛋白や DNA 障害の修復に関わる因子などが結合蛋白として同定されている。

7) 同定した結合蛋白の機能と、RNA 結合能を欠失させた蛋白の過剰発現によるレスキュー実験 :

6) 項で同定した反復配列 RNA と結合する蛋白について、RNA 結合領域を欠失させたコンストラクトを作製し、反復配列 RNA

を発現させた細胞に、強制発現させることによって、染色体分裂像や遺伝子変異の誘導など反復配列 RNA の発現によって見られた表現型がキャンセルされるかを検定する。これにより、反復配列 RNA の発現による表現型がこれらの結合蛋白の機能攪乱に依存しているかを検証する。同様に、これらの蛋白の局在変化等も検証し、反復配列 RNA の発現に伴うこれら蛋白の機能変化について検討する。

8) 作製した遺伝子改変マウスの解析：

8)-a) 4) 項で作製した反復配列 RNA の膵での発現をテトラサイクリンで制御できるシステムを用いて、生直後から発現させた場合と成体になってから発現させた場合との表現型を観察する。このマウスは、細胞の分裂異常の蓄積などによって癌化あるいは分化異常をきたすのではないかと想定しているが、実際にどの程度までの表現型を呈するかは経時的な変化を含めて検討を要する。その場合にも、in vitro で見られた細胞分裂異常や結合蛋白の機能・局在変化などが in vivo でも再現されているかは最低限検証する。

8)-b) 反復配列 RNA に対する shRNA を発現する transgenic mouse と、k-ras 変異を有する膵癌マウスモデルを交配させることで、PanIN 組織で発現している反復配列 RNA をノックダウンし、それによって膵癌を予防できないか、発癌時期を遅らせることができるか検討する。その際にも組織学的検討によって上記までに得られた in vitro での検討結果が、反復配列 RNA ノックダウンによって減弱しているか検討する。

4. 研究成果

1) 膵癌組織における反復配列由来 RNA 産物の発現の確認：

膵癌組織を用いて、反復配列 RNA が癌組織及びその周囲で高発現していることを in situ hybridization および northern blotting にて確認した。

2) 反復配列由来の RNA の方向性の検討：

反復配列 RNA は胎生期には両方向のアレルからの発現が一過性に見られるが、癌組織に置いては一方性の発現のみがあることが、両方向の probe を用いた発現確認で、判明した。そのため、以下の検討は発現のある向きの方の反復配列 RNA を発現するコンストラクトを用いた検討を行った。

3) 過剰発現系コンストラクトの作製：

恒常発現系、およびテトラサイクリンによる発現調節系のコンストラクトを作製した。このとき、junction 部分の影響を考慮するために 2.5 回の反復配列を組み込んだ。

4) 反復配列 RNA の発現制御可能な transgenic mouse の作製：

CMVpromoter 下による恒常的な反復配列 RNA 発現 transgenic mouse を作製した。

5) 非コード反復配列 RNA 過剰発現時の細

胞形質変化の観察：

反復配列 RNA 発現細胞では、high-throughput sequencing による whole exome sequence の結果、ゲノムの変異が蓄積されるとともに、ミトコンドリア DNA の障害もより多く惹起されていることが判明した。同時に focus formation assay によって悪性形質の獲得にも関与していることが示された。

6) 非コード反復配列 RNA と結合する細胞蛋白の同定：

上記の形質を惹起するメカニズムとして、反復配列 RNA の結合蛋白の同定を行った。その結果、YBX-1 タンパクが反復配列 RNA と結合し、この蛋白は YBX1 の細胞内局在を変え細胞質に留める働きがあることが判明した。

7) 同定した結合蛋白の機能と、RNA 結合能を欠失させた蛋白の過剰発現によるレスキュー実験：

もともと YBX1 にはゲノム DNA およびミトコンドリア DNA の修復機能があるが、これが反復配列 RNA の存在によってそこなわれ DNA 障害に結び付くことが示唆された。

そこで反復配列 RNA と結合しない YBX1 コンストラクトを作製し、それを細胞に導入することで、上記の形質がキャンセルされることを確認した。

8) 作製した遺伝子改変マウスの解析：

反復配列 RNA を発現するマウスと、k-ras 変異を持つマウスの交配によって、膵組織での炎症惹起と線維化、膵管拡張、膵管上皮の過形成がおきることが示された。このことから反復配列 RNA の発現は細胞悪性化のプロセスに強く関わることを想定され、そのレスキューには DNA 障害を抑える可能性があることが示唆された。

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5件)

1. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer *World J Gastroenterol.* 2015 Jul 28;21(28):8527-40.
2. 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.
3. Kang Y, Bang BR, Han KH, Hong L, Shim EJ, Ma J, Lerner R, Otsuka M. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumors and liver

inflammation by mitochondrial PGAM5-Drp1 signaling. *Nat Commun.* 2015;6:8371.

4. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M, Koike K. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP. *Carcinogenesis*. 2014;35(11):2404-14.
5. Ma J, Bang BR, Lu J, Eun SY, Otsuka M, Croft M, Tobias P, Han J, Takeuchi O, Akira S, Karin M, Yagita H, Kang YJ. The tumor necrosis family member 4-1BBL sustains inflammation by interacting with TLR signaling components during late-phase activation. *Sci Signal*. 2013;6:ra87.

〔学会発表〕(計1件)

1. 大塚基之、慢性炎症が惹起する microRNA 機能不全に伴う肝発癌機構の解明、第 15 回 日本抗加齢医学会総会 シンポジウム 炎症を標的とした疾患発症メカニズムの解明、福岡国際会議場(福岡県・福岡市) 2015 年 5 月 29 日

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 基之 (OTSUKA, Motoyuki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90518945

(2)研究分担者

伊地知 秀明 (IJICHI, Hideaki)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70463848

前田 慎 (MAEDA, Shin)

横浜市立大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40415956

(3)連携研究者

なし