

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430108

研究課題名(和文) ミュータジェネシスで同定した新規脳腫瘍関連因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of candidate brain cancer-causing genes that were identified by transposon mutagenesis

研究代表者

高祖 秀登 (Koso, Hideto)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：50612876

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)：トランスポゾン・ミュータジェネシス法を用いることで、マウス個体レベルでがん原因遺伝子を網羅的に探索できる。本研究では、ミュータジェネシスで同定したグリオーマの原因候補遺伝子の中で、RNA結合タンパクLARP4Bに着目して解析を行った。トランスポゾン挿入変異から、LARP4Bはがん抑制遺伝子として働くと予測された。実際、グリオーマでゲノム欠失や発現低下を認め、予後不良因子であった。さらにLARP4Bの遺伝子導入により、グリオーマの増殖を強く抑制した。またLARP4Bのノックダウンにより腫瘍形成が促進された。以上から、LARP4Bがグリオーマの新規がん抑制遺伝子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Transposon-based insertional mutagenesis provides a method for an unbiased forward genetic screen for cancer genes in mice. Using this system, we identified an RNA-binding protein, La-related protein 4b (LARP4B), as a candidate cancer gene for GBM. The patterns of transposon insertions predict that Larp4b has a tumor suppressor function. LARP4B expression was consistently decreased in human GBM cell lines. Moreover, heterozygous deletion of LARP4B was detected in nearly 80% of GBMs in TCGA database. LARP4B loss resulted in low expression levels, and was associated with poor patient survival. LARP4B transduction into GBM cell lines strongly inhibited proliferation. Loss of function of Larp4b in mouse primary astrocytes promoted proliferation and led to tumor formation in combination with deficiency of p53 and Nf1. Taken together, these data provide strong evidence that LARP4B serves as a tumor suppressor gene in GBM.

研究分野：がん生物学

キーワード：ミュータジェネシス トランスポゾン グリオーマ グリオブラストーマ がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ゲノム中をランダムに動き回るトランスポゾンを用いたミュータジェネシス法は、*in vivo* で表現型の原因遺伝子を探すツールとして、発生研究を中心にさまざまな生物種で利用されて来た。2005年に、魚類で同定された Sleeping Beauty トランスポゾンを用いてマウス個体で体細胞変異を誘導することで、がん化を誘導できることが報告された。申請者は、ミュータジェネシスを誘導したマウスの脳室下帯から神経幹細胞を単離し、*in vitro* で増幅し、免疫不全マウスに移植することでグリオーマ幹細胞を作成した。形成した腫瘍において、変異遺伝子を解析したところ、受容体型チロシンキナーゼ経路を構成する分子に加え、多数のがん抑制遺伝子の候補を同定した。これらの候補分子の大部分が、グリオーマにおける機能は報告されていない。

2. 研究の目的

がん抑制遺伝子の候補の中で、特に癌化との関連性についていずれの組織でも報告されていない遺伝子に注目して機能解析を行う。そして、新規がん抑制遺伝子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

候補遺伝子の発現レベルをグリオーマ細胞株、およびグリオーマ幹細胞で検討する。次にTCGAデータベースを用いて、ヒトのグリオーマにおけるゲノム欠失や変異の有無を調べ、予後との相関を検討する。機能解析実験として、候補遺伝子の発現が低下しているグリオーマ細胞に遺伝子導入し、増殖抑制効果を検討する。増殖抑制効果を認めた遺伝子については、初代培養グリオーマ細胞でノックダウン実験を行い、増殖が促進するか検討する。さらに移植実験により *in vivo* で機能評価を行う。増殖抑制メカニズムについて分子生物学的な解析を行う。

4. 研究成果

トランスポゾン挿入変異のパターンから、がん抑制遺伝子であると予測された候補遺伝子 88 個に注目して解析を行った。まずTCGAデータベースを用いて、577 検体におけるゲノムコピー数の変化を解析したところ、54 遺伝子について、ゲノム欠失を認めた。特に、17 遺伝子においては、グリオーマの 20% 以上で欠失を認めた。これらの中には、既知のがん抑制遺伝子 PTEN や QKI に加えて、未知遺伝子として VT11A、DDX50、MLLT10、LARP4B などが含まれていた。これら 4 つの候補遺伝子について、コピー数の減少は、発現レベルの低下と相関し、予後不良因子であることが明らかになった。次に、ヒト iPS 細胞から誘導した正常な神経幹細胞をコントロールとして、グリオーマ幹細胞とグリオーマ細胞株における発現レベルを解析したところ、いず

れの遺伝子も、グリオーマで発現が低下していることが明らかになった。そこで LARP4B に着目して解析を行った。

LARP4B は、La-related protein 4B と呼ばれ、RNA 結合蛋白である。RNA シャペロン活性を持つ La モチーフと、RNA 結合ドメインから構成される。LARP ファミリーには、LARP4B 以外にも、LARP1, 1B, 3, 4A, 6, 7 などが存在するが、LARP4B 以外は、グリオーマ細胞で発現低下を認めず、予後とも相関しなかった。次に、LARP4B を 6 つのグリオーマ細胞株、および 2 つのグリオーマ幹細胞に遺伝子導入したところ、7 つの細胞で増殖を強く抑制することが明らかとなった。増殖抑制のメカニズムを検討するために、細胞周期を調べたところ、G2-M 期の細胞の割合が増加し、分裂期停止の表現型を示すことが明らかになった。さらに Annexin-V 陽性細胞の割合が増加したことから、アポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。

次に遺伝子発現解析を行った。細胞増殖の負の制御因子として、CDK インヒビターが知られている。そこで、INK, Cip, Kip ファミリーの発現を調べたところ、CDKN1A のみが特異的に発現上昇することが明らかになった。一方、アポトーシスに關与する遺伝子として、BAK と BAX の発現を調べたところ、BAX の発現が上昇していた。CDKN1A と BAX はいずれも p53 の直接の標的であることが分かっている。そこで、LARP4B が p53 を活性化することで CDKN1A や BAX の発現を上昇させている可能性について、p53 のドミナントネガティブ (DN) 変異体を用いて解析した。その結果、DN 変異体によるレスキュー効果はごく僅かであり、p53 の寄与は少ないと考えられた。

LARP4B は、RNA 結合タンパクであり、RNA との結合を介して増殖を抑制している可能性がある。その可能性を検討するために、RNA 結合領域を欠損した変異体を作製した。その結果、増殖抑制能が大きく失われたことから、RNA との相互作用が必須であることが明らかになった。それでは、LARP4B はどのような RNA と相互作用するか検討するために、HEK293 細胞において LARP4B と結合する RNA のデータベースを利用した。興味深いことに、CDKN1A と BAX のいずれも含まれていた。実際、免疫沈降と RT-qPCR 実験から、グリオーマ細胞においても、LARP4B が、CDKN1A と BAX の mRNA と会合していることが明らかになった。LARP4B は RNA の安定性を高めることが分かっており、LARP4B は、CDKN1A と BAX mRNA の安定性を高めて、発現を上昇させることで、グリオーマ細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導していると考えられた。

最後に、LARP4B のノックダウンによって細胞増殖が促進されるかを検討した。初代培養し

たアストロサイトに、p53DN と Nf1 に対する shRNA を導入して不死化した細胞を利用した。この不死化アストロサイトで LARP4B をノックダウンしたところ、invitro での増殖能が高まった。次に LARP4B ノックダウン細胞をマウスの皮下に移植したところ、腫瘍形成が促進された。さらに、脳への移植実験から、LARP4B のノックダウンによりマウスの生存が短くなることが明らかになった。以上から、LARP4B は、グリオーマにおいてがん抑制遺伝子として機能していることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Suzuki-Kerr H, Baba Y, Tshako A, Koso H, Dekker JD, Tucker H, Kuribayashi H, Watanabe S. Forkhead box protein P1 is essential for lens epithelium transition to the fiber cells during development but does not play roles for retinal development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58:1916-1929. 2017 doi: 10.1167/iov.16-20085.
2. Kuribayashi H, Tshako A, Kikuchi M, Yoshida N, Koso H, Watanabe S. Role of transcription factor Tgif2 in photoreceptor differentiation in the mouse retina. *Experimental Eye Research.* 152:34-42, 2016 doi: 10.1016/j.exer.2016.09.005.
3. Koso H, Tshako A, Lai CY, Baba Y, Otsu M, Ueno K, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial morphology in the retina. *Glia.* 64(11):2005-24, 2016 doi: 10.1002/glia.23038.
4. Koso H, Yi H, Sheridan P, Miyano S, Ino Y, Todo T and Sumiko Watanabe S. Identification of RNA-binding protein LARP4B as a tumor suppressor in glioma. *Cancer Research.* 76(8):2254-64, 2016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2308.
5. Kohno H, Koso H, Okano K, Sundermeier TR, Saito S, Watanabe S, Tsuneoka H, Sakai T. Expression pattern of Ccr2 and Cx3cr1 in inherited retinal degeneration. *Journal of Neuroinflammation* 12:188, 2015. doi: 10.1186/s12974-015-0408-3
6. Takeda H, Wei Z, Koso H, Rust AG, Yew CC, Mann MB, Ward JM, Adams DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression. *Nature Genetics* 47 (2); 142-50, 2015. doi: 10.1038/ng.3175.

7. Koso H, Tshako A, Lyons E, Ward JM, Rust AG, Adams DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Watanabe S. Identification of FoxR2 as an oncogene in medulloblastoma. *Cancer Research* 74 (8), 2351-61, 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1523.

〔学会発表〕(計 7 件)

1 . 2017 年 1 月 18 日 新学術領域 細胞競合・ダイニングコード 合同若手ワークショップ「マウス神経系における細胞競合の検討」高祖秀登

2 . 2017 年 1 月 10 日 Advanced Genome Science International Symposium 「 Cancer Gene Discovery Using Transposon-based Insertional Mutagenesis 」 Hideto Koso, Sumiko Watanabe

3 . 2016 年 10 月 7 日 第 75 回日本癌学会 学術総会「グリオーマにおける新規がん抑制遺伝子 LARP4B の同定」高祖秀登

4 . 2016 年 3 月 18 日 細胞競合コロキウム 「 Identification of RNA-binding protein LARP4B as a tumor suppressor gene in glioma 」高祖秀登

5 . 2015 年 10 月 31 日 Retina Research Meeting 「誘導型杆体視細胞変性モデルマウスの作成と解析」高祖秀登

6 . 2015 年 9 月 10 日 International Symposium on Cell Competition 「 Transposon mutagenesis identifies genes that transform neural stem cells into cancer-initiating cells 」 Hideto Koso

7 . 2014 年 9 月 26 日 第 73 回日本癌学会 学術総会「トランスポゾン・ミュータジェネシスによる小脳髄芽腫の新規原因遺伝子の同定」高祖秀登

〔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://stemcell-u-tokyo.org/mdb/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高祖 秀登 (KOSO, Hideto)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：50612876