

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830066

研究課題名(和文) がんにおけるスプライシング制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of tumor-specific alternative splicing

研究代表者

水谷 アンナ (MIZUTANI, Anna)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・研究員

研究者番号：30615159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん特異的なスプライシングががんの悪性化に関わっていることが明らかとなってきている。本研究により、明細胞型腎細胞がんにおいて、E3リガーゼArkadiaがスプライシング制御因子ESRP2をユビキチン化しスプライシング能を増強することを生化学的に見出し、その結果、がん細胞の増殖が抑制されていることが明らかとなった。さらに、データベースのデータ解析により、明細胞型腎細胞がんにおいてArkadiaは予後良好因子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Tumor-specific alternative splicing is implicated in the progression of cancer, including clear-cell renal cell carcinoma (ccRCC). Using ccRCC RNA sequencing data from The Cancer Genome Atlas, we found that epithelial splicing regulatory protein 2 (ESRP2), one of the key regulators of alternative splicing in epithelial cells, is expressed in ccRCC. ESRP2 mRNA expression did not correlate with the overall survival rate of ccRCC patients, but the expression of some ESRP2-target exons correlated with the good prognosis and with the expression of Arkadia in ccRCC. Arkadia physically interacted with ESRP2, induced polyubiquitination and modulates its splicing function. Arkadia and ESRP2 suppressed ccRCC tumor growth in a coordinated manner. Lower expression of Arkadia correlated with advanced tumor stages and poor outcomes in ccRCC patients. This study reveals a novel tumor-suppressive role of the Arkadia-ESRP2 axis in ccRCC.

研究分野：分子病理学

キーワード：スプライシング 明細胞型腎細胞がん ユビキチン化 タンパク質機能制御

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーの普及や技術の向上により、微量ながん患者検体から RNA シーケンスできるようになった。こうしたディープシーケンスの結果から、がんなどの疾患についても RNA に関する研究がなされるようになってきている。従来では個別に解析するしかなかった RNA スプライシングについても網羅的な研究が急速に進んでいる。がん患者検体を用いた RNA シーケンスの解析研究から、がん特異的なスプライシングが同定された研究もある。明細胞型腎細胞がんでは、Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) のアイソフォームについて、非がん組織部では IIIb 型であるのに対して、がん組織部では IIIc 型であることを見出し、がんマーカーになるという報告がある (Zhao et al. Clin. Cancer Res. 2013)。通常、上皮系の細胞では IIIb 型が発現しており、間葉系の細胞では IIIc 型が発現している。このスプライシングに関わる分子のうちの一つとして Epithelial Splicing Regulatory Protein (ESRP) が同定された (Warzecha et al. Mol. Cell 2009)。

いくつかのがん種で ESRP ががんの予後に関わっているという報告があるものの、報告によって予後良好因子であるのか、予後不良因子であるのかが異なり、議論を呼んでいる。

乳がんにおいて、ESRP は CD44 のスプライシングに関わり、がん幹細胞のポピュレーションを増やし、がんの悪性化に関わり、乳癌の肺転移を促進するという報告がある (Tae et al. Nat. Commun. 2012)。一方で、他のグループや当研究室は、乳がんにおいてがんの転移メカニズムのうちの一つであると提唱されている Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT、上皮間葉転換) に伴い、ESRP の発現が低下し、間葉系のスプライシングへと移行することで、がんの悪性化に関与

していることを報告している (Warzecha et al. EMBO J. 2010, Horoguchi et al. Oncogene 2011)。膵臓がんでは、ESRP1 の発現が高いとがんの悪性度が低く、より悪性度の高いがんでは、ESRP1 の発現が低下していることや、ESRP1 ががん転移を抑制することが報告されている (Ueda et al. Oncogene 2013)。このように ESRP はがんの悪性化に深い関わりがある。これまでの報告では、SNAI1、ZEB1、ZEB2 が転写レベルで ESRP の発現を抑制することがわかっている (Reinke et al. J. Biol. Chem. 2012, Horiguchi et al. Oncogene 2011)。しかしながら、ESRP の機能制御については未解明である。我々は、予備検討から、E3 リガーゼである Ring Finger Protein 111 (RNF111) が ESRP1 および ESRP2 に結合することを見出し、RNF111 が ESRP1 および ESRP2 をユビキチン化することを見出している。このことに着目し、ユビキチン化というタンパク質修飾が ESRP の機能を制御しているか検討を行う。

2. 研究の目的

我々は、予備検討から、E3 リガーゼである RNF111 が ESRP1 および ESRP2 に結合することを見出し、RNF111 が ESRP1 および ESRP2 をユビキチン化することを見出している。このことに着目し、ユビキチン化が ESRP のスプライシング能に関与しているのか、タンパク質修飾によるスプライシング機能制御があるかどうかについて明らかにする。

また RNF111 による ESRP のスプライシング能の制御とがん種、がんの悪性度、予後等との関連があるかどうか調べ、ESRP のスプライシング能とがんの予後の関係について明らかにするとともに、ESRP によるスプライシングががんにおいてどのような役割を果たしているのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 明細胞型腎細胞がんで、ESRP1 の発現低下と FGFR2IIIb 型から IIIc 型へのスイッチングが報告された (Zhao et al. Clin. Cancer Res. 2013)。この論文で解析している明細胞型腎細胞がんのトランスクリプトームおよびクリニカルデータは The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録があり、オープンであることから、同じデータを取得し、エキソンレベルでの発現変動や予後との関連の有無について解析を行った。

(2) 明細胞型腎細胞がんの細胞株である OS-RC-2 細胞を入手し、ESRP2 または RNF111 (Arkadia) ノックダウン下で RNA シーケンスを行い、トランスクリプトーム解析を行うとともに、フェノタイプの解析を行った。

(3) ヒト胎児腎臓細胞株である HEK293T 細胞を用いて、分子機序の詳細について生化学的手法により検討した。

4. 研究成果

(1) TCGA から入手した明細胞型腎細胞がんのレベル 3 の RNA シーケンスのデータ解析より、明細胞型腎細胞がんにおいてがん部で ESRP1 の発現が低下しているものの ESRP2 の発現は残存が認められ、その発現量は FGFR2IIIb 型のスプライシングとも相関は認められなかった。ESRP2 の機能として細胞運動抑制が報告されている (Warzecha et al. 2012)。明細胞型腎細胞がん細胞株である OS-RC-2 細胞で ESRP2 のノックダウンを行うと細胞運動の亢進が認められ、ESRP2 が機能的であることがわかった。

(2) TCGA の明細胞型腎細胞がんの RNA シーケンスのデータ解析から、ESRP2 の発現は予後と相関しなかったが、ESRP2 のターゲットエキソンの発現の高さと予後は相関した。このことから、ESRP2 の機能を制御している因

子がある可能性があると考え、ESRP2 のターゲットエキソンの発現と相関する因子を調べたところ、E3 リガーゼ Arkadia の発現と相関することを見出した。

(3) 上記 TCGA のデータ解析で見出された ESRP2 のターゲットエキソンと Arkadia の発現量の相関が、細胞株でも見られるか検討した。293T 細胞と OS-RC-2 細胞で Arkadia のノックダウンを行い、ESRP2 のターゲットエキソンの発現を調べたところ、減少が認められた。このことから Arkadia が ESRP2 のスプライシングを制御している可能性が示唆された。Arkadia は E3 リガーゼであるため、直接 ESRP2 を制御しているのであれば、両者は結合している可能性があると考え、両者の結合を検討したところ、Arkadia と ESRP2 の内因性の結合を認めた。

(4) E3 リガーゼである Arkadia が ESRP2 をユビキチン化していることを見出した。次に、Arkadia による ESRP2 のユビキチン化が ESRP2 のスプライシング能に影響を与えているか検討するために、ESRP2 のリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体を複数作製した。各種変異体を 293T 細胞に過剰発現させ、Arkadia をノックダウン下で ESRP2 のターゲットエキソンである ENAH エキソン 11a の発現を調べたところ、ESRP2 の 2 番目と 3 番目の RRM ドメインにあるリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体で Arkadia ノックダウンの影響が消失した。このことから、Arkadia が ESRP2 の 2 番目と 3 番目の RRM ドメインをユビキチン化することで ESRP2 のスプライシング能を増強していることがわかった。

(5) Arkadia による ESRP2 のスプライシング能の制御が細胞内でどのような意義があるのか網羅的に調べるために、Arkadia または ESRP2 ノックダウン下で RNA シーケンスを行った。その結果、Arkadia と ESRP2 が協調して細胞増殖を抑制していることがわかつ

た。TCGAの明細胞型腎細胞がんのデータを解析したところ、Arkadiaの発現が高いと予後が良いことがわかった。

以上の検討から、明細胞型腎細胞がんでは、ArkadiaがESRP2のスプライシング能を増強し、がん抑制的に作用していることが明らかとなった。

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 1件)

Mizutani A, Koinuma D, Seimiya H, Miyazono K. The Arkadia-ESRP2 axis suppresses tumor progression: analyses in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 2015 online 査読有り

DOI: 10.1038/onc.2015.4.12

[学会発表](計 4件)

Anna Mizutani, Daizo Koinuma, Hiroyuki Seimiya, Kohei Miyazono. The Arkadia-ESRP2 axis suppresses tumor progression: analyses in clear-cell renal cell carcinoma. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日~2015年10月10日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋)

Anna Mizutani, Daizo Koinuma, Hiroyuki Seimiya, Kohei Miyazono. The Arkadia-ESRP2 axis suppresses tumor progression: analyses in clear-cell renal cell carcinoma. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015. 2015年4月18日~2015年4月22日フィラデルフィア(米国)

水谷アンナ、鯉沼代造、宮園浩平 Arkadiaによるスプライシング制御因子ESRP2の機能

制御 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日~2014年10月18日 国立京都国際会館(京都府・京都)

Anna Mizutani. Arkadia modulates the activity of epithelial splicing regulatory protein 2 (ESRP2). TGF-beta Meeting 2014. 2014年5月8日~2014年5月10日ライデン(オランダ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷 アンナ (MIZUTANI, Anna)

公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 分子生物治療研究部 研究員

研究者番号: 30615159

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: