

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860492

研究課題名(和文) 膵の発癌過程で異常高発現する反復配列RNAによる細胞恒常性破綻の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular function of repetitive RNA which accerelates pancreatic carcinogenesis

研究代表者

岸川 孝弘 (Kishikawa, Takahiro)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：00724171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでゲノム上のジャンク領域と考えられてきた反復配列領域の中で、膵癌組織で異常高発現している反復配列RNAについて検討を加え、発癌における重要な分子生物学的意義を解明した。マウスの反復配列RNAは発癌過程早期の良性腫瘍の段階から高発現しており、良性腫瘍由来の細胞に反復配列RNAを過剰発現させると細胞のDNA修復機能が低下し、ランダムな突然変異率が上昇して易発癌性を高めるといふ、いわゆる「細胞内変異原」としての機能を持つことを報告した。

研究成果の概要(英文)：We focus on repetitive RNAs which are aberrantly expressed in pancreatic cancer tissue and showed their biological significance during oncogenic process. Mouse repetitive RNAs start to be expressed from pre-cancer benign tumor. The rates of random mutation and malignant transformation are increased in repetitive RNA-overexpressing precancer cells due to impairment of DNA damage repair machinery. These results suggest that repetitive RNA functions as "intrinsic mutagen" and accerelates oncogenic process.

研究分野：消化器内科

キーワード：ノンコーディングRNA 膵がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者はこれまで「発癌プロセスにノンコーディング RNA による細胞恒常性の攪乱が関与する」という仮説のもとに、消化器癌、特に膵癌の発生機序解明と新規治療標的の開発への試みを進めてきた。ノンコーディング RNA は、近年分子生物学において世界的に注目され、急速に発展を続ける領域の一つであるが、機能解析が進んでいるものは全体のごく一部に過ぎず、多くは機能や制御機構が不明なままである。このノンコーディング領域で多くの割合を占めるのが、通常はヘテロクロマチン化され転写が抑制されていると考えられていた反復配列領域である。反復配列は全染色体に広く存在し、高度反復という特性上、従来の網羅的探索では解析が困難であり、また転写産物の分子機構や生物学的意義について、ほとんど未解明のままであり、むしろ生物学的意義に乏しいと考えられてきた。

(2) 我々は反復配列の中でサテライト RNA と呼ばれる染色体のセントロメア領域近傍に高度に集中して存在する配列から転写される RNA に注目し、これらがヒトや遺伝子改変マウスモデルの膵癌組織において発現が亢進していることを見出していた。さらにその発現が前癌組織として知られる腺腫性腫瘍や、マウスの前癌病変モデルにおいてすでに認められるという知見を得ていた。

2. 研究の目的

上記の結果から我々は「本来生物学的意義に乏しいと考えられてきたサテライト RNA の異常発現が、単なる癌化過程の副産物ではなく、積極的に癌化を促進する機能を有している」という仮説を立てた。本研究では、サテライト RNA を強制発現するマウス前癌病変由来の細胞株を作成し、悪性形質獲得の有無について評価するとともに、その分子生物学的機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) サテライト RNA を過剰発現するマウス前癌細胞株の作成

Kras 遺伝子の恒常活性型変異をマウス膵組織に導入すると腺腫様病変を形成するが長期経過でも悪性化には至らない。当研究室でこの腫瘍から樹立した細胞株(K512)を用いて以下の検討を行った。サテライト RNA は腫瘍組織中では異常発現しているが、原因不明だが細胞株化するとサテライト RNA が発現しなくなる。このことを利用して、恒常活性型プロモーター下にマウスサテライト RNA を 3 回繰り返す配列を組み込んだコンストラクトを K512 に導入して、サテライト RNA 過剰発現細胞を作成した。

(2) RNA-immunoprecipitation 法によるサテライト RNA の結合タンパク質の探索

ノンコーディング RNA は酵素活性やタンパク質複合体の足場機能、転写調節因子としての機能を持つが、一般的にタンパク質と結合し協調して

機能することが多い。そこでサテライト RNA においても、その分子生物学的機能を解明するために共役タンパク質の検索を行った。具体的には BrU でラベリングしたサテライト RNA を細胞抽出液と混和し、抗 BrU 抗体付加 beads で共沈してきたタンパク質を SDS-PAGE で分離し、LC-MS/MS による質量解析にて候補タンパク質の同定を行った。候補タンパク質についてはウエスタンブロットングで確認を行った。

(3) ランダムな突然変異率の定量法

細胞内で培養中に新たに獲得されるランダムな突然変異率を数値化するために、HPRT 遺伝子変異を指標に用いた。6-Thioguanine は通常細胞内では HPRT 酵素によって 6-Mercaptopurine に代謝されることで細胞致死をもたらすが、HPRT 遺伝子に失活性変異が存在すると毒性を示さず生存可能となる。この特徴を用いて新たに HPRT 遺伝子に突然変異が起きた細胞をコロニー化して定量し、変異率を求めた。

(4) 高感度 RNA-in situ hybridization 法を用いた反復配列 RNA の詳細な局在解析

サテライト RNA と結合タンパク質 YBX1 の結合の確認、およびストレス下での YBX1 の局在変化へ影響を詳細に検討するために増幅法による高感度 RNA in situ hybridization とタンパク質の蛍光染色の共染色の系を確立した。

(5) サテライト RNA と結合しない変異型 YBX1 発現細胞の作成

YBX1 の deletion mutant を複数作成し、Biotin ラベルしたサテライト RNA との RNA immunoprecipitation による結合部位の同定を行った。その結果をもとにサテライト RNA との結合に必要な CTD domain を欠損させた変異型 YBX1 コンストラクトを作成し、K512 に導入した。さらに内在性 YBX1 を YBX1 mRNA の 3' UTR を標的とした siRNA によって knock down することで、サテライト RNA と結合しない YBX1 を発現する細胞を作成した。

4. 研究成果

(1) サテライト RNA の過剰発現をもたらす膵前癌細胞の表現型の変化

悪性形質転換能の変化

サテライト RNA 過剰発現細胞では細胞増殖能に変化を認めないものの、既報通り有糸分裂時の多中心体性分裂像や lagging chromosome, micronuclei などの分裂異常所見を認めた。さらに full confluent 培養下でのフォーカス形成アッセイでは piled up コロニー数が増加し、アガロースゲルを用いたコロニー形成アッセイでは足場非依存性増殖コロニーが有意に増加していた。

DNA 突然変異誘導率の変化

で認めた悪性形質転換の増加の原因を検索するために、長期細胞培養下での突然変異の発生率について、次世代シーケンサーを用い

た exon sequence による解析を行った。この系ではドキシサイクリンの投与によって発現のスイッチを切り替えることができる Tet 制御型プロモーター下にサテライト RNA を発現する細胞株を用いて、1ヶ月間継代培養を行い、ドキシサイクリンの有無による変化を解析した。その結果、サテライト発現細胞において点突然変異や微小塩基挿入/欠失の数が増加していた。さらに突然変異が発生しやすいミトコンドリアゲノムについても検討したところ、同様に突然変異率が二倍以上に増加していた。この結果を確認するために HPRT 変異コロニー形成アッセイを行い、サテライト RNA 発現細胞では細胞継代培養期間が増加するにつれて突然変異率が有意に増加することを示した。

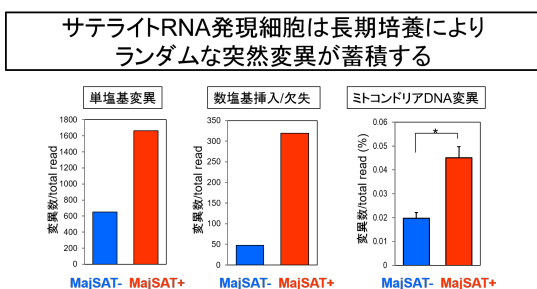


図1 サテライト RNA 発現によるランダムなゲノム/ミトコンドリア DNA の突然変異率の上昇

DNA 損傷修復能の変化

上記の結果から突然変異率の上昇をきたす原因として DNA 損傷修復能が関与しているのではないかと考え、検討を行った。その結果、酸化ストレス刺激を加えた後の酸化損傷塩基 8-OHdG の回復がサテライト RNA 発現細胞において優位に遅延していることが示された。さらに、酸化損傷塩基を修復する塩基除去修復(BER)経路の酵素活性を in vitro のアッセイ系で確認したところ、サテライト RNA 発現細胞において有意に損傷塩基切断活性が低下しており、酸化ストレス刺激での活性上昇効果も認めないことが示された。

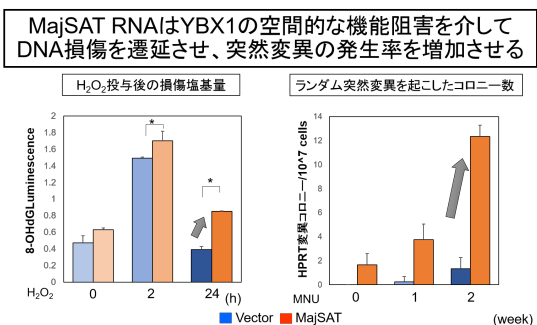


図2 サテライト RNA 発現による酸化損傷塩基修復遅延と突然変異率の上昇

(2) サテライト RNA の結合タンパク質の探索と関連する分子生物学的機能の評価

サテライト RNA 結合タンパク YBX1 の同定と酸化ストレス刺激時の局在変化

突然変異率を増加させるサテライト RNA の分子生物学的機構解明の足掛かりとして、その結合タンパク質を RNA immunoprecipitation 法にて検索したところ、YBX1 のみが再現性を持って同定できた。YBX1 は転写の促進や抑制、翻訳制御や中心体の機能維持など多岐に渡る機能を持つことが知られているが、我々の検討した範囲では、サテライト RNA 発現の有無によって既知の転写因子としての機能、翻訳制御因子としての機能に有意な変化は認められなかった。

サテライト RNA 発現による YBX1 の DNA 損傷修復能の阻害

YBX1 は本来は細胞質に局在するタンパク質であるが、酸化ストレスが細胞に加わると核内に移行し損傷 DNA を修復する機構を活性化することが知られている。しかし、サテライト RNA の RNA in situ hybridization と YBX1 の蛍光免疫染色の共染色を行うことによって、サテライト RNA 発現細胞では酸化ストレス刺激後の YBX1 の核内移行が起きず、サテライト RNA が局在する細胞質に dot 状に捉われるという結果が得られた。

(3) 変異型 YBX1 を用いたサテライト RNA 発現細胞の DNA 修復能の回復

変異型 YBX1 導入によるサテライト RNA 発現細胞での酸化ストレス後の核内の回復

YBX1 の核内移行の阻害がサテライト RNA によるものであることを確認するために、YBX1 のサテライト RNA 結合ドメインを除去した deletion mutant タンパク質を作成した。これをサテライト RNA 発現細胞に導入し、内在性の YBX1 を knock down することで、サテライト RNA に結合しない YBX1 を発現する細胞株を作成した。この細胞ではサテライト RNA 発現下でも変異型 YBX1 が核内に移行することが確認された。

変異型 YBX1 導入サテライト RNA 発現細胞での DNA 修復能の回復と突然変異率の改善

この細胞を用いて酸化損傷 DNA 修復能を評価したところ、酸化ストレス後の 8-OHdG の残存遷延はサテライト RNA 発現細胞と比較して改善していた。また HPRT 変異コロニー形成アッセイにおいても、サテライト RNA 発現で上昇した突然変異率が有意に改善するという結果が得られた。以上の結果からサテライト RNA 発現による突然変異率の上昇は YBX1 の核内以降を阻害することによる DNA 損傷修復能の低下を介していると示唆された。

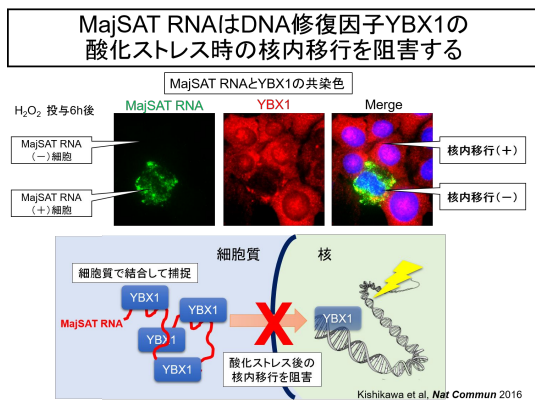


図3 サテライト RNA による YBX1 を介した DNA ダメージ損傷修復機構の阻害

(4) 今後の展望

本研究で得られた成果は、これまでの網羅的解析において解析対象にすらならず、かつ生物学的意義に乏しい、すなわちジャンクとみなされてきた反復配列 RNA に、「細胞内変異原」という重要な分子生物学的意義があることを見出した点で、ノンコーディング RNA の分野のみならず、細胞に内包される複雑な恒常性維持機構を解明する上でも、新たな視点をもたらす一助になると考える。反復配列 RNA の異常発現は発癌過程の早期から始まっていることから、癌の早期診断というマーカーとしての臨床応用が期待できるだけでなく、その制御法を確立することで、癌化へのステップを封じ込める いわゆる予防医学への貢献にも応用できると考える。

今後は遺伝子改変マウスを用いた in vivo での検討を加えながら、どのようにサテライト RNA の脱抑制のメカニズムを解明することで、その制御法の導出に努めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, and Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic process via the dysfunction of YBX1. *Nat Commun.*2016;7:13006 DOI: 10.1038/NCOMMS13006.

Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, and Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. *JCI Insight.* 2016;1(8): e86646 DOI: 10.1172/jci.insight.86646

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; 21(28): 8527-8540 [PMID: 26229396 PMID: 4515835 DOI: 10.3748/wjg.v21.i28.8527]

[学会発表] (計 7 件)

岸川孝弘、膵がんの早期発見を可能にする血清中の反復配列 RNA の高感度検出法の開発、第 54 回 日本臨床分子医学学会 学術集会、東京国際フォーラム(東京・文京区)、2017 年 4 月 14 日

Takahiro Kishikawa, High sensitive detecting procedure of circulating repetitive RNA as a novel early marker of pancreatic cancer, AACR annual meeting 2017, Washington DC(USA), April 2 2017
Takahiro Kishikawa, Establishment of highly sensitive method of repetitive RNAs in the serum as an early detecting marker of pancreatic cancer, Fourth Annual US Japan Workshop on Cancer Biomarkers in Collaboration with NCI Early Detection Research Network, Tempe(USA), Mar 6th 2017

岸川 孝弘、反復配列 RNA の異常発現が膵発癌を促進する分子生物学的機構の解明、第 2 回 G-PLUS、ホテルイースト 21 東京(東京・江東区)、2016 年 12 月 17 日

Takahiro Kishikawa, Deregulated transcription of mouse satellite sequences accelerates oncogenic processes via functional inhibition of YBX1 protein, AACR annual meeting 2016, New Orleans(USA), April 18th 2016

岸川 孝弘、酸化ストレスを介した膵発癌プロセスを加速させるノンコーディングサテライト RNA の異常発現、第 101 回 日本消化器病学会総会、仙台国際センター(宮城・仙台)、2015 年 4 月 22 日

Takahiro Kishikawa, Detection of human satellite RNA in the serum of high-risk patients of pancreatic cancer, AACR annual meeting 2014, San Diego(USA), April 6th 2014

[図書] (計 1 件)

岸川孝弘・小池和彦 北隆館 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 肝胆膵の慢性炎症 血中遊離核酸からみた膵癌の早期診断マーカーの探索 p105-110

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸川 孝弘(KISHIKAWA, Takahiro)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
研究者番号:00724171