

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860509

研究課題名(和文) 選択的ポリアダニレーション制御を介した新規大腸癌悪性形質獲得のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of alternative polyadenylation during epithelial-mesenchymal transition on cancer cell growth

研究代表者

西田 憲生 (NISHIDA, Kensei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：10624033

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)：ヒト大腸癌細胞HCT116を用いて、選択的ポリアダニレーションによるがん細胞の悪性形質獲得メカニズムの解明のために上皮間葉移行モデルの構築を行った。独自に構築した上皮間葉移行モデル細胞において、Exon arrayにより3' UTRの短縮する遺伝子を同定することに成功した。また、選択的ポリアダニレーション制御関わるプロセッシング因子の発現解析では、遊走能獲得細胞において、CPSFファミリーの発現が上昇していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of alternative polyadenylation during epithelial-mesenchymal transition (EMT) on the HCT116 colon cancer cell line, we succeeded to select a population of cells capable of migrating. Pathway analysis was performed using Ingenuity pathway analysis (IPA) software. IPA revealed that VIM, ZEB1 and FOXQ1, which are EMT marker genes, were upregulated in the selected cells. We identified the genes whose 3' UTR are shorten in the selected cells using Exon Array. Furthermore, we found that protein levels of CPSF family were increased in the highly migrated cells. These data suggested that regulation of CPSF family protein levels alters the ability of migration through changing 3'UTR length of the certain genes.

研究分野：RNAバイオロジー

キーワード：選択的ポリアダニレーション制御

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の転写後調節機構の一つである、3' 非翻訳領域(以下 UTR)の長さを変える選択的ポリアデニレーション機構の重要性が注目されている。幹細胞や未分化癌細胞では、3' UTR 長の短い mRNA を選択的に発現し、非コード RNA や RNA 結合蛋白質による発現制御を回避する性質を獲得している。選択的ポリアデニレーションを介した細胞の形質転換・発癌の研究はこれからの重要な課題である。本研究では、上皮間葉移行に注目し、大腸癌の悪性形質獲得機構の新たな制御因子として、選択的ポリアデニレーションに注目した。本研究で開発した解析法により、選択的ポリアデニレーションの制御因子を同定することで、新しい大腸癌治療法の開発に綱が得ることが期待される。

2. 研究の目的

申請者は、遺伝子発現調節の基本機構である転写後の mRNA プロセシングの研究(スプライシング、ポリアデニレーション)の研究を行ってきた。

本研究では、mRNA プロセシングの大腸癌悪性形質獲得における役割を明らかにするために、

(1) 新規に樹立した上皮間葉移行(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)モデルを用いて、選択的ポリアデニレーションの変化を受ける遺伝子の同定し、

(2) 上記で同定した遺伝子の選択的ポリアデニレーション活性を制御する因子を同定する

ことを目的とした。選択的ポリアデニレーション制御を介した大腸癌悪性形質獲得のメカニズムの解明を通じて、今後の発癌プロセスの理解に加え、新たなコンセプトに基づ

く治療・予防の可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 上皮間葉移行モデルの構築

大腸癌細胞株 HCT116 細胞を用いて、Transwell 上で 48 時間培養し、その後、transwell membrane を通過した細胞と membrane 上に残った細胞を分けて回収する。それぞれを bottom cells と upper cells とにわけける。

(2) 遺伝子発現解析

上記の細胞から、RNA iso plus (Takara) を用いて、total RNA を抽出した。得られた RNA は、マイクロアレイ(アジレント社)のプロトコールに従って網羅的遺伝子発現解析を行った。また、ReverTra Ace kit (Toyobo) を用いた cDNA を合成し、SYBR green 法を用いてターゲット遺伝子発現解析を行った。網羅的遺伝子発現解析で得られたデータは、Ingenuity pathway analysis ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った。

(3) ポリアデニレーション因子 CPSF ファミリーならびに CSTF ファミリーの発現をウェスタンブロット法によって同定した。

4. 研究成果

(1) 上皮間葉移行モデルの構築

Transwell membrane の通過性によって二つの細胞集団を作製した。membrane を通過する細胞(bottom cells)と membrane を通過せずに上部に残る細胞(upper cells)として、遊走能と細胞増殖を検討したところ、bottom cells は、有意に遊走性が亢進していたが、細胞増殖能には変化を認めなかった。(図 1)

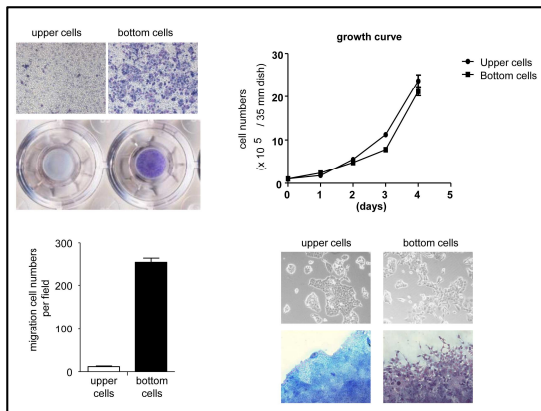


図1 EMTモデルの構築

(2) 網羅的遺伝子発現解析

bottom cells と upper cells との比較では、bottom cells では、細胞の遊走性に関わる遺伝子が有意に変化していた。また、上皮間葉移行に関する遺伝子群 (VIM, ZEB1, FOXQ1) の上昇を認めた。パスウェイ解析から、上皮間葉移行を上昇させる方向に遺伝子発現が変化していることを同定した。(図2)

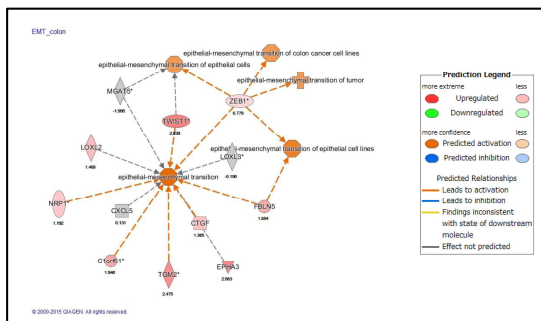


図2 bottom cells のパスウェイ解析

(3) ポリアデニレーションに関わる因子の発現解析

bottom cells では、upper cells に比べて、CPSF ファミリーの発現が低下し、CSTF ファミリーが増加する傾向が認められた。

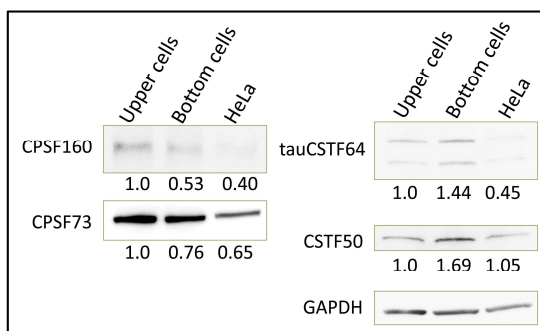


図3 ポリアデニレーション因子の発現変化

今後の展開 :

本研究では、分化制御に関わる SR protein が、CPSF/CSTF 複合体と結合することを見出している。これらの RNA 結合タンパク質の発現を介した 3' UTR 長の調節が、発がん、特に転移を制御する可能性が考えられた。

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3件)

Saijo S, Kuwano Y, Masuda K, Nishikawa T, Rokutan K, Nishida K. Serine/arginine-rich splicing factor 7 regulates p21-dependent growth arrest in colon cancer cells. *J Med Invest*. 2016 (in press) 査読有り

Kajita K, Kuwano Y, Satake Y, Kano S, Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, Nishida K, Rokutan K. Ultraconserved region-containing Transformer 2 4 controls senescence of colon cancer cells. *Oncogenesis*, 5:e213. 2016 doi: 10.1038/oncsis.2016.18. 査読有り

Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Satake Y, Akaike Y, Fujita F, Kano S, Masuda K, Rokutan K. Transformer 2 and miR-204 regulate apoptosis through competitive binding to 3' UTR of BCL2 mRNA. *Cell Death Differ*., 22(5):815-825. 2015 doi: 10.1038/cdd.2014.176. 査読有り

[学会発表](計8件)

西田憲生、狩野静香、佐竹謙、板井美樹、田中裕基、桑野由紀、六反一仁、上皮間葉移行モデルを用いた EMT 関連

microRNA の探索、第 12 回日本消化管学会総会学術集会、(東京都・新宿区)、2016 年 2 月 26-27 日

西條早希、西田憲生、狩野静香、佐竹讓、藤田絹代、板井美樹、田中裕基、桑野由紀、六反一仁、大腸がん細胞における SRSF7 を介した細胞周期調節機能の解析 第 38 回日本分子生物学会年会(兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 1 日

Kensei Nishida, Saki Saijo, Shizuka Kano, Takuya Naruto, Yuki Kuwano, Kazuhito Rokutan, Analysis of 3' end processing factors expression during epithelial-mesenchymal transition, CSHL meeting; eukaryotic mRNA processing, Aug 18-22, 2015, (Cold Spring Harbor, NY)

Saki Saijo, Kensei Nishida, Shizuka Kano, Takuya Naruto, Yuki Kuwano, Kazuhito Rokutan, A role of serine/arginine-rich splicing factor 7 in cell cycle progression, CSHL meeting; eukaryotic mRNA processing, Aug 18-22, 2015, (Cold Spring Harbor, NY)

Kano S, Nishida K, Kuwano Y, Naruto T, Rokutan K. Analysis of functional transcribed-ultraconserved regions in SR protein family. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic mRNA processing. (Cold Spring Harbor, New York, U.S.A) 2015 年 8 月 19 日

狩野静香、西田憲生、桑野由紀、増田清士、佐竹讓、藤田絹代、板井美樹、六反一仁, Function of Serine / Arginine-rich splicing factor (SRSF3)

in malignant transformation, 第 37 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、2014 年 11 月 25~27 日

西田憲生、狩野静香、板井美樹、藤田絹代、佐竹讓、成戸卓也、桑野由紀、六反一仁, 上皮間葉移行モデルの構築とメカニズム解析、第 9 回臨床ストレス応答学会(岡山県・岡山市) 2014 年 11 月 2 日

Kano S, Nishida K, Kuwano Y, Masuda K, Satake Y, Fujita K, Itai M, Rokutan K. Analysis of functional transcribed-ultraconserved regions in SR protein family. **Cell Symposia Regulatory RNA** (Barkley, USA) 2014 年 10 月 19~21 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西田 憲生 (NISHIDA, Kensei)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号 : 10624033