

非機能性反復配列 RNA が惹起する癌と間質相互作用

東京大学大学院 医学系研究科 消化器内科
大塚 基之

1. はじめに

次世代シーケンサーを用いた RNA deep sequencing 技術によって、膵癌を代表とする癌組織においては、定常状態では転写されていない、ゲノム中の反復配列からの非機能性 RNA の転写が増えることが明らかになった (Science 2011 593 Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers)。このような反復配列は、pericentromeric を中心にヒト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で生物学的な意義は無い（いわゆる“junk”）と考えられていた。実際、それらの転写物の存在が示唆されるようになった今でも、その生物学的意義に関しては不明である。

本研究では、昨今の“非機能性”RNA 研究の進展に即して、これらの従来 junk と考えられていたゲノム中の反復配列からの転写産物が特異的に発現してくる病態においては それらの転写産物も細胞内あるいは細胞間で未知の生物学的な作用をもつのではないかとの仮説を立てて、in vitro と in vivo の両者でその機能を検討し 将来の発癌予防法の開発に結びつけることを目標とする。

2. 方法

1) 膵癌組織における反復配列 RNA の転写の確認: 膵癌組織における反復配列 RNA の転写が増加することを、当研究室に保存してある臨床検体、ヒト膵癌組織アレイ、および 当研究室で樹立した“膵特異的な Ras の変異と TGFb-R1 のノックアウトの掛け合わせによるマウス膵がんモデル”での in situ hybridization 他の方法で確認する。

2) 診断マーカーとしての血清 exosome 中の反復配列由来の RNA の検出法の確立: microRNA は、exosome 中に包含されて細胞外に分泌されることから、血清中の exosome 内の microRNA 量を測定し疾患マーカーとして応用する研究が進められている。しかし exosome 中の microRNA は 必ずしも疾患特異的とは言い難いものが多く、その真の応用にはまだハードルが高い。本研究では microRNA ではなく、正常組織では発現の無い、より疾患特異性が高いと考えられる上記の「遺伝子をコードしない反復配列 RNA」に着目し、それらも microRNA と類似の機構で exosome 中に分泌されるのではと考えて、細胞培養上清および血中 exosome の回収法の確立と その中の反復配列 RNA の定量法を Northern blot および定量 PCR にて樹立し 診断マーカーとしての応用が可能か検討する。

3) 反復配列由来の転写産物の生物学的意義の検討: まず CMV promoter によって恒常的に反復配列 RNA を強制発現する系を樹立する。この際 ゲノムの順方向にも逆方向にも読みとられている可能性が高い (Northern blot で確認済) 生理的な過剰発現状態を再現するために、bidirectional promoter 下に sense 鎖と anti-sense 鎖の両者が等量 発現するようにする。このコンストラクトを in vitro で細胞内に過剰発現し phenotype の変化を観察する。

4) In vivo での反復配列由来の転写産物の生物学的意義の検討： いったばう、in vivo のモデルとして、テトラサイクリン制御下に bidirectional に反復配列が発現するコンストラクトを作製し それをもとに transgenic mouse を作製する。これと膵特異的に発現する Tet-on コンストラクトを持つマウスとを掛け合わせることで、膵臓特異的にテトラサイクリン飼料による反復配列発現の制御を可能とするマウスを作製し正常膵実質細胞において可逆的に発現調節可能な状態を作り、正常細胞における反復配列過剰発現が in vivo でどのような作用をもつのかを検証する。これらの結果によって この反復配列の転写産物が疾患（特に発癌）の driver なのか by-stander なのかを明確にする。

5) 反復配列由来 RNA の細胞間メッセンジャーとしての機能の検討： 次に、exosome 中に含まれる反復配列が周囲の細胞に messenger 的に働く可能性を検討する。前項で樹立した in vitro での過剰発現細胞の上清から反復配列 RNA を含む exosome を回収し、それを維芽細胞・血管内皮細胞・筋細胞・免疫系細胞などの間質・血球系の細胞株に添加することで現れる表現型および細胞内シグナル伝達系を検討する。膵癌組織では癌細胞周囲の組織の線維化が著明に増え、それら間質と腫瘍との相互作用が癌細胞の増殖をさらに促すことが示唆されているが、これらの腫瘍-間質相互作用を、細胞間を移行する exosome の RNA が媒介している可能性を検証する。

6) 膵癌由来 exosome の in vivo での分布： 並行して膵癌が出す exosome が in vivo でどこに分布するかを検討するため、exosome マーカーである CD63 と GFP の融合蛋白を恒常的に発現するコンストラクトを当研究室のマウス膵癌組織から樹立した細胞株に組み込み、この細胞を wild-type のマウス膵に定着させた後 GFP の体内分布を調べることで、放出された exosome の体内分布を把握する。

7) まとめ： 4)~6) の結果から、膵癌細胞が出す反復配列 RNA が細胞周囲の間質にどのような働きかけをしているのかを検討し、細胞間 communication における生物学的意義を検討する。

8) 治療への応用： 最終的にこれらの表現型に対する介入法（exosome を破壊する方法）を開発し、何らかの形で疾病の治療法につなげていきたい。

3. 結果、研究成果

1) 膵癌組織における反復配列 RNA の転写の確認： 最初に、膵腫瘍組織でのメジャーサテライト RNA の発現を Northern blotting 法および RNA *in situ* hybridization 法を用いて検討したところ、膵癌だけでなく前癌病変である PanIN 組織においても発現しており、多様なリピート長を持って転写されていることが示された。これらよりメジャーサテライト RNA は細胞が癌化する前段階から高発現していると考えられた。さらに腫瘍組織ではサテライト領域が一方向性に異常発現していることが示唆された。

2) 反復配列由来の転写産物の生物学的意義の検討： 前癌病変である PanIN 細胞株にメジャーサテライト RNA を強制発現させるコンストラクトを作成し、表現型の検討を行ったところ、分裂中期において中心体数が異常に増加し、分裂軸が多極化している細胞が有意に増加していた。また非分裂期の細胞においても、染色体不安定性や発癌ストレスの指標となる micronuclei や anaphase bridge の出現頻度が増していた。さらにメジャーサテライト RNA を2か月間発現させた細胞は、コントロールと比較して足場非依存性増殖能獲得細胞率が増加していた。

有糸分裂に異常が起きると姉妹染色体が娘細胞に正常に分配されず、染色体の異数性 (aneuploidy)

を引き起こす。多くの癌細胞では aneuploidy を認めることから、癌としての悪性形質の獲得と密接に関わっていると考えられている。メジャーサテライト RNA の異常発現が分裂異常を惹起する機序については今回検討できていないが、染色体の状態が不安定になることは遺伝子の欠失や増幅、転座などの現象をランダムに誘発し、癌関連遺伝子に影響を与え得るため、発癌を促進する重要な原因の一つであると思われた。

さらに細胞内での分子生物学的機能について検索を行った。まず、メジャーサテライト RNA が核内ではなく細胞質に局在することを示し、さらに免疫沈降法を用いて、メジャーサテライト RNA に結合するタンパク質 YBX-1 を見出した。YBX-1 の特徴的な機能として、定常時は細胞質に局在するが、DNA 障害を来すような放射線や紫外線、抗癌剤などの刺激を受けると核内に移行し、DNA 修復過程に関与することが分かっている。このため、メジャーサテライト RNA 発現による DNA 障害後の YBX-1 の局在の変化について検討を行ったところ、定常状態ではいずれの細胞でも YBX-1 は主に細胞質に局在していたが、UV 照射後 6 時間ではコントロール細胞では YBX-1 が核内へ移行しているのに対して、メジャーサテライト RNA 発現細胞では YBX-1 の核内移行が抑制されていた。

既報では YBX-1 は転写因子として修復関連遺伝子発現を制御したり、修復酵素の活性調節を行うことで DNA 修復に関与するとされているため、スクリーニング目的に DNA 修復遺伝子についての PCR アレイを行ったが、有意な発現差を認めなかった。また、メジャーサテライト RNA 導入、非導入 K512 細胞株について全遺伝子マイクロアレイ解析も行ったが、DNA 修復に関わる遺伝子に有意な変化は見られなかった。しかし、メジャーサテライト RNA 発現系では、移行阻害により DNA 障害誘発後の核内 YBX-1 量が相対的に減少することが考えられるため、UV によって細胞に DNA 障害を与えた後、すなわち本来ならば YBX-1 が核内移行している状態での遺伝子発現に変化が現れないか、再度 PCR アレイを用いて検討した。UV 刺激前に対する刺激後のシグナル強度の比をそれぞれプロットしたところ、特に NEIL-2 遺伝子の刺激後発現増加率がメジャーサテライトを導入することで 18.7 倍から 2.7 倍へと低下していることが示された。すなわち、DNA 障害の反応として本来であれば転写が増強される遺伝子が、メジャーサテライト RNA による転写因子の捕捉により十分に行われな可能性が考えられた。

これを確認するため、shRNA による YBX-1 ノックダウン細胞を作成し DNA 障害の増悪の有無を検討したところ、DNA 二重鎖切断のマーカーとして利用される γ H2AX 陽性細胞率が有意に増加していた。同様に、メジャーサテライト RNA 発現細胞においても γ H2AX 陽性細胞率が有意に増加しており、活性酸素種により発生する 8-ヒドロキシデオキシグアニン (8-OHdG) の割合や、UV 照射により発生するピリミジンダイマーも非刺激状態での増加を認めた。以上から、メジャーサテライト RNA による YBX-1 機能の阻害作用が DNA 障害の増加に寄与している可能性が示唆された。

3) In vivo での反復配列由来の転写産物の生物学的意義の検討: in vitro で見られた反復配列の生物学的機能を in vivo で解析するために、上記のコンストラクトを transgene とした transgenic mouse を作製した。現時点ではまだ 4 カ月齢で、表現型は現れていないが、今後 組織学的な検索を行なうとともに、さらに週齢を重ねて発癌が見られるか検討する予定である。

4. 考察・まとめ

今回のメジャーサテライト RNA 導入細胞における遺伝子発現検討では、定常状態では遺伝子修復因子の転写物の量的な変化は検出できなかったが、DNA 障害を誘発し、YBX-1 の核内移行を促した後の

アレイの結果ではNEIL-2という遺伝子修復因子の発現がメジャーサテライト RNA 導入細胞で有意に低下していた。NEIL-2 は塩基除去修復 (BER) の初期段階である修飾塩基の認識とその除去に関わる DNA グリコシラーゼの一種である。また YBX-1 はこの BER 修復経路に関与するそのほかの因子とも結合しその活性を高めることが知られていることから YBX-1 は種々の修復経路の中でも BER と特に深い関わりを持っており、その機能を増強している可能性がある。

修飾塩基は軽微な損傷でありながら、通常環境でも高頻度に発生することから、YBX-1 の機能低下により BER 活性が低下することで、日常的に修飾塩基の残存という遺伝子ストレスが加わり、DNA 複製時に複製エラーが起きる確率が高まり、点突然変異率を上昇させ、発癌への経過を促進させる可能性があると考えられる。本研究において長期にメジャーサテライト RNA を発現させることで足場非依存性獲得細胞の割合が有意に増加したことは、変異原性リスクが高まったことにより、悪性形質転換を来すような変異が誘発されやすくなったことが原因とも考えられる。この発癌へと至る経路の詳細な解明については、トランスジェニックマウスによる *in vivo* での表現型の検討や、長期発現細胞のゲノムシークエンスによる実際の突然変異発生頻度の検討などにより、さらに多角的にデータを構築していくことが必要であろう。

上述してきたようにメジャーサテライト RNA は染色体分裂異常、DNA 修復機能の低下を惹起することを示した。メジャーサテライト RNA がどのような機序によって発現増加するのかは今後明らかにしていく必要があるが、このノンコーディング RNA の異常発現が前癌病変から癌への変化を加速させる重要な因子となっている可能性が示唆された。

5. 発表論文、参考文献

1. Yoshikawa T*, Takata A*, Otsuka M*, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K (*; equal contribution). Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep.* 2012;2:637.
2. Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang Y, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* in press.
3. Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2011; 2: 338.
4. Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2011;43(5):455-8.