

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	村上雄紀
<p>学位論文題目</p> <p>Testis-specific hnRNP is expressed in colorectal cancer cells and accelerates cell growth mediating ZDHHC11 mRNA stabilization (精巣特異的hnRNPは大腸癌で過剰発現しZDHHC11 mRNAの安定化を介して腫瘍増殖を促進する)</p> <p>共著者名</p> <p>小西 弘晃、藤谷 幹浩、高橋 慶太郎、安藤 勝祥、上野 伸展 嘉島 伸、盛一 健太郎、田邊 裕貴、奥村 利勝</p> <p>Cancer Medicine, in press.</p> <p>研究目的</p> <p>近年、大腸癌に対する薬物療法は進歩してきたが、その死亡率は依然として高く、新たな治療標的の開発が望まれる。RNA結合蛋白の1つのグループであるheterogeneous ribonucleoproteins (hnRNPs)は様々な癌との関連が報告されている。我々の研究室では大腸癌細胞において20種類のhnRNPsをノックダウンし、腫瘍促進作用を持つhnRNPを複数同定した。その中で癌の発育・進展との関連性が未解明であるhnRNP G-Tに注目した。本研究では大腸癌におけるhnRNP G-Tの発現、標的となるmRNAおよびその作用メカニズムを明らかにすることを目的とする。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 細胞培養 10% (vol/vol) ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、50 U/ml ペニシリン、50 μg/ml ストレプトマイシンを含有する培養液で5% CO₂、37°Cで培養した。</p> <p>2. スルフォローダミンB (SRB) アッセイ 細胞を96 wellマイクロプレートに1.0×10^4 cells/wellで播種し、遺伝子導入を行った。細胞を4°Cの5%トリクロロ酢酸中で固定し、蒸留水で洗浄した。マイクロプレートを室温で乾燥させ、0.057%SRB液で染色し、0.1%酢酸で洗浄したのち、室温で再び乾燥させた。染色した細胞を10mM Tris液で溶解し、OD_{510nm}を測定した。</p> <p>3. Xenograftモデル BALB/cヌードマウス(6~8週齢)の背部に2×10^6 cellsを移植した。移植した腫瘍にhnRNP G-T siRNAとscramble siRNAをGENOMONE-Si transfection kitを用いて毎日局所注射した。</p>			

4. Real-time PCR (RT-PCR)

ランダムプライマーを用いてRNAを逆転写し、hnRNP G-TとZDHHC11特異的プライマーを用いてPCRを行った。18S rRNAの発現量を内因性コントロールとして標準化した。

5. Western blotting

回収した蛋白を12.5% SDS-PAGEで泳動しニトロセルロース膜に転写した。各種一次抗体と4°Cで一晩反応させた後、特異的に二次抗体と1時間反応させ、Super-Signal West Picoを用いて発色させた。アクチンの発現量を内因性コントロールとして蛋白発現量を標準化した。

6. トランスクリプトーム解析

RNAライブラリーはIon Total RNA-Seq Kit v2を用いて構築した。続いてエマルジョンPCRを行い、プレート陽性エマルジョンをチップにロードし、high-throughput sequencing反応を行った。GRCh37/hg19を参照配列としてシークエンスデータをマッピングして発現量解析を用いて行った。

成 績

1. 大腸癌細胞株におけるhnRNP G-Tの細胞増殖能の評価

大腸癌由来のHCT116細胞、SW480細胞に対しhnRNP G-T siRNAを導入した結果、細胞増殖は抑制された。一方、正常大腸上皮細胞由来のHCEC-1CT細胞の細胞増殖能には影響を及ぼさなかった(n=5)。HCT116細胞移植XenograftモデルにおいてもhnRNP G-Tの発現抑制による腫瘍増殖抑制作用を確認した(n=5)。

2. 大腸癌におけるhnRNP G-Tの発現解析

RT-PCR及びWestern blottingではHCEC-1CT細胞と比較しHCT116細胞とSW480細胞でhnRNP G-Tが過剰発現していた(n=3)。臨床患者検体でもRT-PCR及び免疫組織化学染色により正常大腸粘膜組織と比較して大腸癌組織におけるhnRNP G-Tの過剰発現を確認した(n=18)。

3. hnRNP G-TのmRNA結合パートナーの同定

HCT116細胞の溶解物を用いて抗hnRNP G-T抗体による免疫沈降を行い、免疫沈降物からRNAを回収した。回収物とhnRNP G-T発現抑制細胞のトランスクリプトーム解析を行った結果、hnRNP G-Tと直接結合し、発現が制御される223種類のmRNAを同定した。その中から発現変動率が高い5種類のmRNAを抽出し、それぞれの発現抑制細胞でSRBアッセイを行った。その結果、ZDHHC11mRNA発現を抑制したHCT116細胞において細胞増殖抑制効果が最も高くみられた。また、hnRNP G-T siRNAによる発現抑制にてHCT116細胞におけるZDHHC11のmRNAおよび蛋白発現が抑制された(n=3)。hnRNP G-T発現抑制HCT116細胞にZDHHC11を過剰発現させると細胞増殖能が回復することも併せて確認した(n=5)。

4. hnRNP G-T-ZDHHC11mRNAの腫瘍増殖促進メカニズムの検討

ZDHHC11発現抑制HCT116細胞(n=3)でトランスクリプトーム解析を行い、シグナルパスウェイ解析を行ったところATM/ATRシグナルパスウェイ関連分子が最も変動していた。Western blottingではhnRNP G-T及びZDHHC11発現抑制細胞でATMとATRのリン酸化が抑制された。また、ATM/ATRシグナルパスウェイを相互に調節しているERK1/2のリン酸化も抑制した。

考 案

hnRNP G-Tが大腸癌において過剰発現していること、hnRNP G-TがZDHHC11 mRNAと直接結合し、安定化させることで大腸癌細胞の増殖を促進することを初めて証明した。正常組織では精巣特異的に発現しているhnRNP G-Tが大腸癌で過剰発現しており、非腫瘍細胞においてhnRNP G-Tの発現を抑制しても細胞増殖能に影響を及ぼさなかったことから、この作用はがん特異的なものであると考えられた。また、ZDHHC11発現抑制細胞においてATM/ATR、ERK1/2のリン酸化を抑制したことから、hnRNP G-T-ZDHHC11による癌増殖促進メカニズムの1つに、DNA損傷チェックポイント関連分子であるATM/ATRとERKのシグナル伝達系が関係することを明らかにした。以上から、hnRNP G-Tは新規大腸がん治療標的の有力な候補となる可能性が示唆された。

結 論

大腸癌において過剰発現しているhnRNP G-Tは、ZDHHC11 mRNAの安定化を誘導し、ATM/ATR、ERK1/2のリン酸化を促進することで、大腸癌の細胞増殖能を亢進させることを証明した。hnRNP G-T-ZDHHC11 mRNAの相互作用は大腸癌の新規治療標的となる可能性がある。




引用文献

1. Fujiya M, Konishi H, Mohamed Kamel MK, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, et al. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene*. 2014; 33: 4847-4856
2. Ehrmann I, Crichton JH, Gazzara MR, James K, Liu Y, Grellscheid SN, et al. An ancient germ cell-specific RNA-binding protein protects the germline from cryptic splice site poisoning. *eLife*. 2019; 8: e39304.
3. Konishi H, Fujiya M, Kashima S, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, et al. A tumor-specific modulation of heterogeneous ribonucleoprotein A0 promotes excessive mitosis and growth in colorectal cancer cells. *Cell Death and Dis*. 2020; 11: 245

参考文献

1. Takahashi K, Fujiya M, Konishi H, Murakami Y, Iwama T, Sasaki T, Kunogi T, Sakatani A, Ando K, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Tanabe H, Okumura T. Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein H1 Promotes Colorectal Cancer Progression through the Stabilization of mRNA of Sphingosine-1-Phosphate Lyase 1. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(12): 4514.
2. Murakami Y, Fujiya M, Konishi H, Isozaki S, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Sasaki T, Kunogi T, Takahashi K, Ando K, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Tanabe H, Okumura T. The Optimal Dose of Tacrolimus in Combination Therapy with an Anti-TNF α Antibody in a Mouse Colitis Model. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(4):564-570.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	村上 雄紀
		審査委員長	谷野 美智枝 
		審査委員	入部 玄太郎 
		審査委員	中山 恒 
学位論文題目			
<p style="text-align: center;">Testis-specific hnRNP is expressed in colorectal cancer cells and accelerates cell growth mediating ZDHHC11 mRNA stabilization (精巣特異的 hnRNP は大腸癌で過剰発現し ZDHHC11 mRNA の安定化を介して腫瘍増殖を促進する) Cancer Medicine. 2022. Apr 5. Epub ahead of print.</p>			
<p>本論文は様々な癌との関連が報告されている hnRNP のうち、精巣特異的に発現し、癌関連の既報がない hnRNP G-T の大腸癌における発現、標的 mRNA、腫瘍増殖促進機構について検討したものである。</p> <p>まず、癌細胞と正常上皮細胞に対して siRNA を用いて hnRNP G-T の発現を抑制し、細胞増殖アッセイを行ったところ、hnRNP G-T の発現抑制により癌細胞の増殖が抑制された。Xenografts モデルでも同様の結果が得られた。上記細胞株、患者内視鏡生検検体で hnRNP G-T の発現量を解析したところ、いずれも癌で hnRNP G-T の高発現を認めた。さらに患者手術検体の免疫組織化学染色でも、癌、特に異型度の高い部分での高発現を確認した。</p> <p>次に標的 mRNA を同定するためトランスクリプトーム解析を行った。hnRNP G-T と直接結合し、かつ発現が制御された mRNA は 174 であった。発現減少度が上位 5 mRNA に着目し、siRNA を用いて発現を抑制し細胞増殖アッセイを行ったところ、ZDHHC11 が最も強く増殖を阻害した。hnRNP G-T 発現抑制により、ZDHHC11 の発現が抑制されること、アクチノマイシン D 法で hnRNP G-T の ZDHHC11 安定化作用を確認した。細胞株、患者検体いずれも癌で ZDHHC11 が高発現していた。</p> <p>ZDHHC11 の腫瘍増殖促進機序を解明するため ZDHHC11 発現抑制細胞のトランスクリプトーム解析に加えてシグナルパスイ解析を行ったところ、大腸癌の重要な治療標的である ERK1/2 と相互活性化作用のある ATM/ATR 経路との関連強く示唆された。それらのリン酸化について検討したところ、hnRNP G-T と ZDHHC11 は ATM/ATR、ERK1/2 のリン酸化を促進していた。</p> <p>本研究により、大腸がんで異常発現した hnRNP G-T が ZDHHC11 を介したアポトーシス阻害により大腸がんの腫瘍成長を促進することを明らかにし、さらに、hnRNP G-T の減少によって誘導される成長抑制効果は癌細胞でのみ認められ、正常組織には影響しないことも明らかにした。これらの研究結果は hnRNP G-T が大腸がん治療において副作用の少ない魅力的な治療ターゲットとなり得ることを意味し、今後の大腸がん治療の発展に貢献する研究であると言える。</p> <p>本論文の内容は新規性があり、データ解析も十分なされていた。論文提出者は、各審査委員の諮問において当該論文および関連領域に関する質問に的確に答え、十分な知識を有することが確認された。また本論文は国際的学術雑誌である Cancer Medicine 誌に印刷公表済みである。以上より本審査委員会は、本論文が博士(医学)の学位に値するものと判断した。</p>			