

論文の内容の要旨

論文題目 非コード反復配列 RNA の膵発癌における生物学的意義の検討

氏名 岸川 孝弘

膵癌は悪性腫瘍の中でも根治の難しい疾患とされており、化学療法を含めた集学的治療の発展が目覚ましい現在においても、非切除膵癌の 5 年生存率は依然数パーセントにとどまる。ヒトの膵癌では大腸癌の adenoma-carcinoma シークエンスのように、正常細胞から前癌病変である Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) を経て膵癌へと至る過程で、K-ras や Smad4、p53、p16/INK4a などの癌関連遺伝子の変異が蓄積されていく発癌モデルが提唱されているが、多様な変異がどのように蓄積されて発癌へと向かうのか、その明確な機序は分かっていない。このような発癌の分子生物学的メカニズムについての理解を深めることは、新規の早期スクリーニング法や治療ターゲットを開拓する重要な足がかりとなるはずである。

近年の次世代ゲノムシークエンス技術の発展により、ゲノム上のタンパク質をコードしない領域から転写される RNA、すなわちノンコーディング RNA が、遺伝子機能維持や分化など、生体機能の複雑な制御に重要な役割を果たしていることが分かってきた。最新の知見では、ヒトにおいて約 21,000 種類のタンパク質をコードする遺伝子に対して、約 19,000 種類ものノンコーディング RNA が転写されていることが報告されている。しかし、そのほとんどは細胞内でどのような役割を果たしているか分かっていないのが現状である。

本研究の主題である非コード反復配列は、染色体のセントロメアと呼ばれる領域に集中して存在するタンパク質をコードしない数百塩基単位の基本配列から成る繰り返し配列であり、サテライト配列と呼

ばれている。これらは非分裂期には高度に凝集してヘテロクロマチンと呼ばれる構造を取っているため転写活性は強く抑制されていると考えられていた。しかし、最近サテライト RNA の一種であるメジャーサテライト RNA が膀胱癌を含む腺癌組織において、高度に異常発現していることが報告された。このことからサテライト RNA は他のノンコーディング RNA と同様に何らかの生物学的機能、特に発癌過程に対する機能を有していることが推察されるが、その詳細な検討はなされていない。本研究において、我々は膀胱癌および前癌病変である PanIN 組織でのメジャーサテライト RNA の発現様式を明らかにするとともに、強制発現系を利用して *in vitro* で発癌と関連の深い表現型の変化について観察し、メジャーサテライト RNA がもたらす分子生物学的意義について検討を行った。

最初に、膀胱癌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、膀胱癌だけでなく前癌病変である PanIN 組織においても発現を認め、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。

既報ではマウス胎児線維芽細胞や胎芽細胞などの正常細胞においてサテライト RNA が両方向性に発現し抑制性 RNA として機能する可能性が指摘されている。しかし腫瘍組織でのメジャーサテライト RNA は一方向性に高発現しており、脱分化の過程でその抑制機構が破綻し、正常細胞とは異なる作用を細胞に及ぼしているという可能性が推察された。

次に、前癌病変である PanIN 細胞株(K512)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、体細胞分裂中期において中心体の数が異常に増加し、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 を長期に発現させた細胞は、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。

最後に細胞内での分子生物学的機能について検討を行った。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 を同定した。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 損傷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 発現がもたらす DNA 損傷後の 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 損傷誘発後の核内 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 損傷を与えた後、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の変化について、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、複数の遺伝子がメジャーサテライト RNA 発現細胞において相対的に低下していた。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 RNA 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 損傷の反応として本来であれば転写が増強される修復遺伝子が、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かった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 損傷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修飾塩基である 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 機能の阻害作用が損傷塩基の増加に寄与している可能性が示唆された。

本研究で DNA 損傷誘発因子として使用した UV 光は、同じ DNA 鎖にある隣接するピリミジンどうしをクロスリンクしてシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)や 6-4 型光産物(6-4pp)を生成し、正常な DNA 複製を阻害する。また、活性酸素種(ROS)により塩基が傷害されて産生される 8-ヒドロキシデオキシグアニン(8-OHdG)や 5-ヒドロキシウラシル(5-OHU)などの修飾塩基は 1 日に約 50,000 回発生するとも言われている。これらの比較的頻度の高い DNA 損傷に対しては塩基除去修復(BER)やヌクレオチド除去修復(NER)と呼ばれる修復経路が定常的に働いている。

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産物の量的な変化は検出できなかったが、DNA 損傷を誘発し、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他の因子とも結

合して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、その機能を補助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、通常的环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、日常的に損傷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、突然変異の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ケ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 損傷の増加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悪性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。