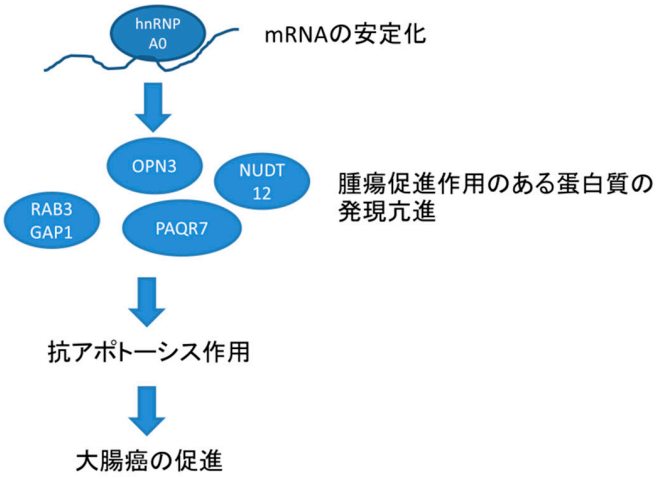
172　miRNA-hnRNPs複合体と大腸癌の関与の解明	小西　弘晃

【目的】RNA 結合蛋白（RBPs）、特に heterogeneous ribonucleoproteins（hnRNPs）は RNA の安定化やスプライシングの制御、分解、核内外の輸送、翻訳など発生や分化、組織の形成において極めて重要な機能を持っていることが知られている。一方で hnRNP A1 や A2B1 など複数の hnRNPs は細胞増殖やアポトーシスを制御することで癌細胞の進展に関与していること、また hnRNP A1 や E2 はマイクロ RNA（miRNA）の結合標的となりその蛋白機能が障害を受けることが報告されている。しかしながらどの hnRNPs が癌の発育に関連深いのか、またその hnRNP の結合パートナーとなる miRs や mRNAs は明らかではなかった。本研究では、腫瘍促進的に働きかける hnRNPs を網羅的に明らかにし、その hnRNPs を介した miRNAs や mRNAs などの RNA Regulation と癌促進の関連を検討することを目的とした。

【方法】ヒト大腸癌細胞株である HCT116 に siRNA を導入し、細胞増殖能への影響を評価した。また、蛋白質量の変化は Western blotting 法、mRNA の発現量変化は RT-PCR 法により定量化した。hnRNP A0 と結合する miRNA および mRNA は RNA 免疫沈降法とマイクロアレイ解析およびトランスクリプトーム解析を組み合わせて行うことにより網羅的に同定した。死細胞は TUNEL 染色により染色した。データは ANOVA および Student-t 検定により検定し、p 値が 0.05 未満を有意な差と判定した。

【結果】癌の発育に深く寄与する hnRNPs として hnRNP A0 を新たに同定し、hnRNP A0 が大腸癌細胞株や大腸癌検体の癌組織において過剰に発現していることを明らかにした。また、hnRNP A0 が癌細胞のアポトーシスを強く抑制していることで腫瘍促進的に働きかけていること、さらに、hnRNPs に結合する miRNAs や mRNA を網羅的に明らかにし、PAQR7、OPN3、RAB3GAP1、NUDT12 mRNA の安定化を介して大腸癌細胞にアポトーシスを抑制することを初めて証明した。

hnRNP A0 によるがん促進機構



172. miRNA-hnRNPs 複合体と大腸癌の関与の解明

小西　弘晃

*旭川医科大学 内科学講座 消化器血液腫瘍制御内科学分野

Key words：hnRNP，RNA regulation，gastrointestinal cancer

緒　言

癌の発生、進展、転移、薬剤耐性にはRNAの安定化やスプライシングの制御、分解などのRNA regulationの破綻が関与しており、このようなRNAの機能はRNA結合蛋白（RNA bindig protein, RBP）の関与が不可欠である。なかでも、RBPの一種であるheterogeneous ribonucleoproteinファミリー分子（hnRNPs）はmicroRNAs（miRs）と結合してmiRsの輸送や安定化に寄与すること、これらのhnRNPsの発現は癌の発育・浸潤と関連していることが報告されている。しかしながらどのhnRNPsが癌の発育に関連深いのか、またそのhnRNPの結合パートナーとなるmiRsやmRNAは明らかではなかった。本研究では、癌の発育に深く寄与するhnRNPsとしてhnRNP A0を新たに同定し、このhnRNP A0が癌細胞のアポトーシスを抑制して腫瘍促進的に働きかけていること、また、大腸癌細胞株や大腸癌検体の癌組織におけるhnRNP A0の発現異常を明らかにした。さらに、hnRNP A0に結合するmiRNAsやmRNAを網羅的に明らかにした。

方　法

ヒト大腸癌細胞株であるHCT116にBioneer社より購入したsiRNAをLipofectamine RNAiMAX（Invitrogen社）を用いて導入した。細胞増殖能への影響はスルフォローダミンB（SRB）アッセイにより評価した。また、蛋白質量の変化はウェスタンブロッティング法、mRNAの発現量変化はRT-PCR法により定量化した。hnRNP A0と結合するmiRNAおよびmRNAは抗hnRNP A0抗体（Novus社）を用いたRNA免疫沈降により回収したRNAを用いてマイクロアレイ解析（Toray Industry社）、およびトランスクリプトーム解析（Life Technologies社）を行うことにより網羅的に同定した。死細胞はIn Situ Cell Death Detection Kit and TMR red（Roche Diagnostic社）を用いて染色した。データはANOVAおよびStudent-t検定により検定し、p値が0.05未満を有意な差と判定した。

結　果

1. hnRNPs発現抑制による細胞増殖能への影響

大腸癌の進展におけるhnRNPsの作用を明らかにする目的で、hnRNPsを発現抑制した大腸癌細胞株HCT116細胞を作製した。SRB assayで細胞増殖能の変化を調べた結果、hnRNP A0を発現抑制した細胞では最も強力に細胞増殖能が低下していた（図1A）。続いてhnRNP A0の生体における増殖促進効果を評価するため腫瘍細胞移植モデルを構築し、腫瘍内でhnRNP A0を抑制したところコントロールの腫瘍に比較して有意な腫瘍面積の低下が確認された（図1B）。そこで、アポトーシス関連分子であるCaspase-3およびPARPの断片化をWestern blotting法で検討した結果、コントロールRNAを導入したHCT116細胞に比較して、hnRNP A0発現抑制細胞では断片化caspase-3およびPARPの発現が有意に増加していた（図1C）。また、TUNEL染色にても同様に、hnRNP A0発現抑制細胞においてTUNEL陽性細胞が増加していた（図1D）。したがって、hnRNP A0は大腸癌細胞のアポトーシスを阻害し、その進展を促進しているものと考えられた。

*現在の所属：旭川医科大学 消化器先端医学講座

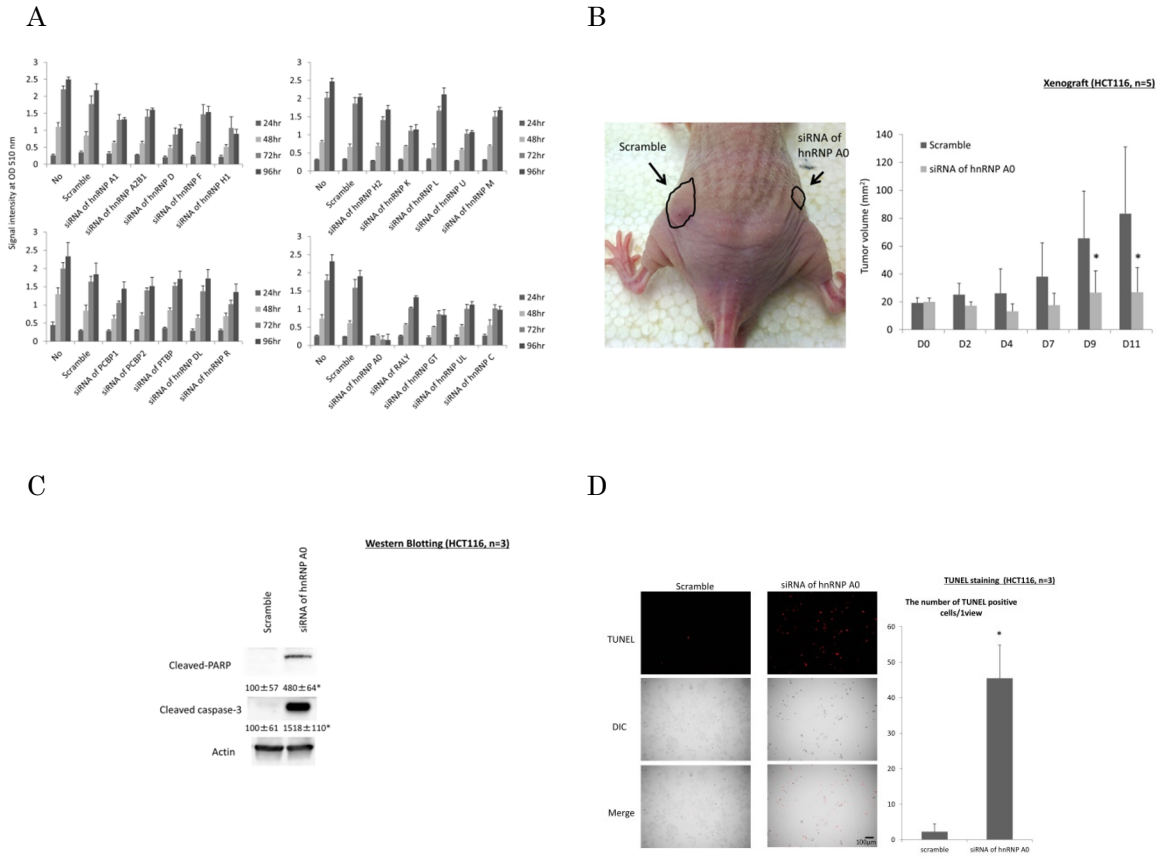


図 1. hnRNP A0 は大腸癌細胞にアポトーシスを誘導する

A）20 種類の hnRNPs の発現を抑制し、HCT116 細胞における細胞増殖能変化について検討した（n = 5）。

B）hnRNPA0 発現抑制による腫瘍抑制効果をヌードマウスを用いた HCT116 移植モデルで検討した（n = 5）。

C）hnRNP A0 発現抑制時のアポトーシスマーカー分子の発現をウェスタンブロッティングにて検討した（n = 3、HCT116 細胞）。

D）hnRNP A0 発現抑制時の DNA 断片化を TUNEL 染色により評価した（n = 3、 HCT116 細胞）。スケールバーは 100 μm を示す。

2. 大腸癌細胞株および大腸癌検体における hnRNP A0 の発現異常

大腸初代培養細胞 CoEpiC 細胞と大腸癌細胞株 HCT116 細胞から RNA を抽出し Real-time PCR にて hnRNP A0 の発現を検討した。その結果、CoEpiC 細胞に比較して、HCT116 細胞では有意に hnRNP A0 の発現が高かった（図 2A）。また、大腸癌手術検体の組織切片から RNA を抽出し Real-time PCR にて hnRNP A0 の発現を検討したところ、大腸癌組織で有意に hnRNP A0 の発現が高かった（図 2B）。

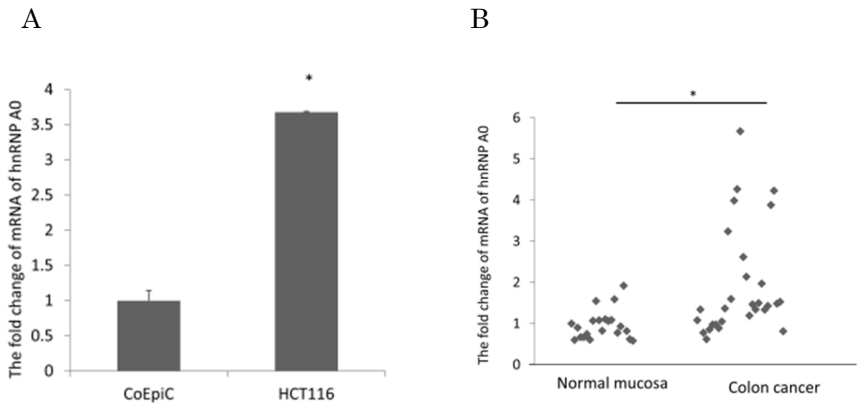


図 2. hnRNPA0 は大腸癌において発現が亢進している

A）非腫瘍性細胞（CoEpiC）および大腸癌細胞 HCT116 における hnRNP A0 の mRNA の発現量変化を RT-PCR にて評価した（n = 3）。B）大腸癌手術検体の腫瘍部位及び正常粘膜部位よりにおける hnRNP A0 の mRNA の発現量変化を RT-PCR にて評価した。

3. hnRNP A0 と結合する miRNA および mRNA の網羅的探索

大腸癌細胞において hnRNP A0 と結合する miRNA および mRNA を網羅的に探索するため RNA－免疫沈降法により hnRNP A0 と結合する RNA を回収した。続いて回収した RNA を対象にマイクロアレイ解析およびトランスクリプトーム解析を行い、hnRNP A0 と結合する miRNAs および mRNA を同定した（表 1，2）。

結合が確認された miRNA を合成して HCT116 細胞にトランスフェクションし、細胞増殖能への影響を SRB アッセイにより評価した。しかしながらこれらの miRNAs を過剰に発現させても増殖能に大きな影響はなかった（図 3C）。一方、hnRNP A0 と結合が確認された PAQR7、OPN3、RAB3GAP1、NUDT12 mRNA の発現を抑制したところ細胞増殖能の抑制が認められた（図 3A）。また、これらの mRNA を抑制した HCT116 細胞では hnRNP A0 発現抑制時と同様に断片化 caspase-3 および PARP の発現が有意に増加していた（図 3B）。以上から、hnRNP A0 は miRNA による干渉はほとんど受けずに、PAQR7、OPN3、RAB3GAP1、NUDT12 mRNA を介して大腸癌細胞のアポトーシスを抑制することで癌細胞の増殖を亢進しているものと考えられた。

表 1. hnRNPA0 と相互作用する miRNAs

Name	IP: hnRNP A0/IP: IgG	Name	IP: hnRNP A0/IP: IgG	Name	IP: hnRNP A0/IP: IgG
hsa-miR-200b-3p	4.33	hsa-miR-8052	2.41	hsa-miR-3177-3p	2.11
hsa-miR-26b-5p	4.24	hsa-miR-6858-3p	2.37	hsa-miR-4700-3p	2.11
hsa-let-7c-5p	3.63	hsa-miR-4771	2.37	hsa-miR-151a-3p	2.10
hsa-miR-29c-3p	3.60	hsa-miR-6131	2.37	hsa-miR-6816-3p	2.10
hsa-miR-18a-5p	3.48	hsa-miR-574-5p	2.36	hsa-miR-3189-3p	2.09
hsa-miR-200a-3p	3.37	hsa-miR-4324	2.36	hsa-miR-100-5p	2.09
hsa-let-7g-5p	3.26	hsa-miR-8063	2.33	hsa-miR-23a-3p	2.07
hsa-miR-885-3p	3.20	hsa-miR-4419b	2.29	hsa-miR-1193	2.06
hsa-let-7f-5p	3.02	hsa-miR-6859-3p	2.29	hsa-miR-3922-5p	2.06
hsa-let-7e-5p	2.92	hsa-miR-151b	2.28	hsa-miR-619-5p	2.05
hsa-miR-6516-3p	2.76	hsa-miR-6746-5p	2.27	hsa-miR-4293	2.04
hsa-miR-7-5p	2.75	hsa-miR-214-3p	2.24	hsa-miR-26a-5p	2.03
hsa-let-7d-5p	2.71	hsa-miR-3679-5p	2.24	hsa-miR-3678-3p	2.02
hsa-let-7i-5p	2.65	hsa-miR-25-3p	2.21	hsa-miR-16-5p	2.01
hsa-let-7b-5p	2.58	hsa-miR-4663	2.17	hsa-miR-200c-3p	2.01
hsa-miR-513a-5p	2.56	hsa-miR-361-3p	2.16	hsa-miR-6721-5p	2.01
hsa-let-7a-5p	2.54	hsa-miR-944	2.14	hsa-miR-423-5p	2.00
hsa-miR-4684-3p	2.52	hsa-miR-6865-5p	2.14		
hsa-miR-874-3p	2.44	hsa-miR-595	2.13		
hsa-miR-8078	2.44	hsa-miR-6124	2.12		

表 2. hnRNP A0 と結合し、発現が制御される mRNAs

Feature ID	siRNA of hnRNP A0/Scramble	IP:hnRNP A0/IP:IgG	Feature ID	siRNA of hnRNP A0/Scramble	IP:hnRNP A0/IP:IgG
ANKRD26	-2.06486	2.779725	OPN3	-2.654	2.86222
BAHCC1	-2.06329	2.393074	PAQR7	-2.23732	2.141982
BSN	-2.22368	2.762088	PCLO	-2.62162	2.88895
COL4A4	-2.56631	2.69592	PIK3R1	-2.23819	2.419041
DIP2C	-2.24063	2.190972	POLL	-2.8813	3.269682
DOC2A	-2.45903	3.262494	RAB3GAP1	-2.05283	2.22861
H6PD	-3.74957	2.121529	TARBP1	-2.01178	3.583181
HIP1	-2.14214	2.012576	TRIM66	-2.22824	2.733248
KIAA0040	-2.0499	2.274774	VIPR1	-3.76711	3.654848
KIAA0232	-2.00696	2.203779	ZFP30	-2.47847	2.391496
KLF12	-2.68777	3.399552	ZNF385B	-2.10226	2.002033
MTR	-2.05266	2.148714	ZNF566	-2.44487	2.045562
NUDT12	-2.15098	2.319042	ZNF827	-2.07667	2.060455

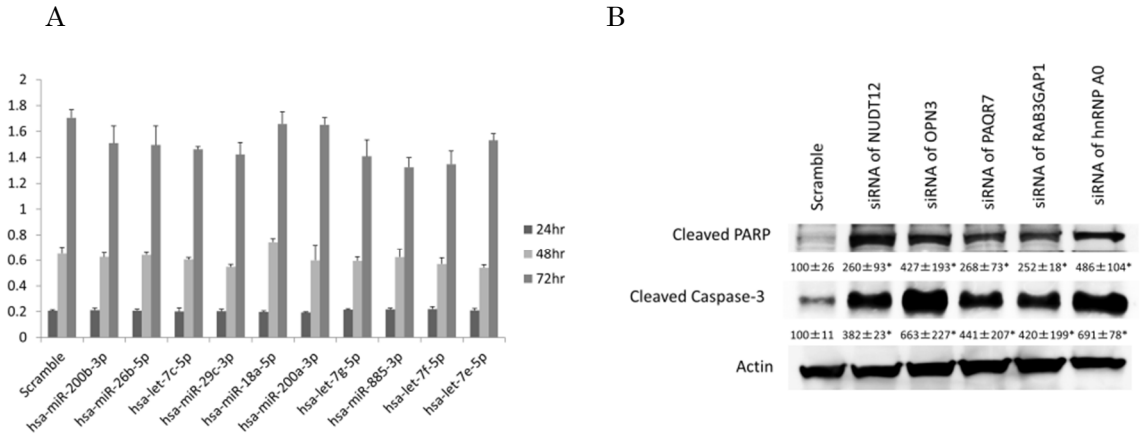


図 3. hnRNP A0 は NUDT12、OPN3、PAQR7、RAB3GAP1 の発現制御を介してアポトーシスを制御する
A）hnRNP A0 と結合する miRNAs を HCT116 細胞内で過剰発現させ細胞増殖能への変化を SRB アッセイにより検討した（n = 5）。B）hnRNP A0 と結合する mRNAs の発現を制御したときのアポトーシスマーカー分子の発現変化を Western blotting により検討した（n = 3）。

考　察

本研究により hnRNP A0 と結合する miRNA を 57 種類、hnRNP A0 により制御される mRNA を 26 種類同定した。また、hnRNP A0 は PAQR7、OPN3、RAB3GAP1、NUDT12 mRNA を介して大腸癌細胞にアポトーシスを抑制することを初めて証明した。さらに、これらの細胞増殖への作用は hnRNP A0 と結合する miRNAs に干渉を受けることなく生じていた。

hnRNP ファミリーは hnRNP A0 を含むおよそ 20 種類の RNA 結合蛋白から構成されており、様々な臓器の細胞核内で RNA の成熟に関係すると同時に、細胞質で mRNA と結合しその翻訳を調節している［1, 2］。種々の癌細胞において、hnRNP ファミリーの発現異常が認められ、主に細胞質で増加していることから［3］、癌関連遺伝子の mRNA の翻訳を制御することで、癌の発生・進展を促進していると考えられている［4, 5］。本研究の成果から、hnRNP A0 がこれらファミリー分子の中でも最も強力に癌細胞の増殖を促進する作用を持つこと、およびその作用メカニズムとして PAQR7、OPN3、RAB3GAP1、NUDT12 mRNA の発現制御を介したアポトーシスの制御機構が存在することが明らかになった。

一方で、これまで癌細胞における miRNA-蛋白相互作用としては、miR-328 による hnRNP E2 の機能障害［6］、miR-18a による hnRNP A1 のオートファジー経路を介した分解［7］、miR-26a、584 による hnRNP A1-CDK6 mRNA との競合拮抗［8］などが報告されている。今回、miRNA による癌細胞の増殖や細胞死の制御においても同様の機序が存在するものと考え、癌細胞の生存に必須の hnRNP A0 にも生じうるのかを評価したが、今回の検討では miRNA による hnRNP A0 を介した細胞増殖能への干渉作用は確認できなかった。しかしながら、hnRNP A0 が結合している miRNA の中には、miR-200b-3p や let7 ファミリーなど細胞の分化や組織の発生と関与が報告されている miRNA も含まれており［9, 10］、miRNA が hnRNP A0 が持つ抗アポトーシス作用以外の機能を制御している可能性も否定できない。今後、これらを明らかにすることで、種々の細胞活動や癌の発生・進展における、hnRNPs の作用の意義がより鮮明になり、RNA 結合蛋白を標的とした新規の大腸癌治療の開発につながるものと期待される。

共同研究者・謝辞

投稿を終えるにあたり、実験に関する御助言を頂きました旭川医科大学医学部内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野の藤谷幹浩准教授に感謝します。

文　献

1) Dreyfuss G, et al, hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. Annu Rev Biochem, 1993. 62: p. 289-321. DOI: 10.1146/annurev.bi.62.070/93.00/445.
2) Fiset S, et al, hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. Nucleic Acids Res, 2001. 29(11): p. 2268-75. PMID:11376145.
3) Zhang L, et al, Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science, 1997. 276(5316): p. 1268-72. PMID:9157888.
4) Patry C, et al, Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7679-88. PMID:14633690.
5) Hope NR, et al, Murray, The expression profile of RNA-binding proteins in primary and metastatic colorectal cancer: relationship of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins with prognosis. Hum Pathol, 2011. 42(3): p. 393-402. DOI: 10.1016/j.humpath.2010.08.006.
6) Eiring AM, et al, miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. Cell. 2010 Mar 5;140(5):652-65. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.007.
7) Fujiya M, et al, microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. Oncogene. 2014 Oct 2;33(40):4847-56. DOI: 10.1038/onc.2013.429.
8) Konishi H, et al, microRNA-26a and -584 inhibit the colorectal cancer progression through inhibition of the binding of hnRNP A1-CDK6 mRNA. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 27;467(4):847-52. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.055.
9) Yu X, et al, A novel miR-200b-3p/p38IP pair regulates monocyte/macrophage differentiation. Cell Discov. 2016 Jan 26;2:15043. DOI: 10.1038/celldisc.2015.43.
10) Melton C, et al, Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. Nature. 2010 Feb 4;463(7281):621-6. DOI:10.1038/nature08725.