

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	高橋 慶太郎
学位論文題目			
<p>Heterogenous nuclear ribonucleoprotein H1 promotes colorectal cancer progression through the stabilization of mRNA of sphingosine-1-phosphate Lyase 1</p> <p>(Heterogenous nuclear ribonucleoprotein H1はsphingosine-1-phosphate lyase 1 mRNAの安定化を介して大腸癌の発育を促進する。)</p>			
共著者名			
<p>藤谷 幹浩、小西 弘晃、村上 雄紀、岩間 琢哉、佐々木 貴弘、 久野木 健仁、坂谷 慧、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><i>Int J Mol Sci.</i> 2020;21(12):4514. Published 2020 Jun 25. doi:10.3390/ijms21124514</p>			
研究目的			
<p>近年、大腸癌に対する薬物治療は進歩してきたが、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ている。heterogenous nuclear ribonucleoprotein H1 (hnRNP H1) はRNA結合蛋白の一種であり、大腸癌、膵癌、肝細胞癌などで過剰発現しているが、その役割や標的RNAは不明である。本研究ではhnRNP H1と結合するmRNAの網羅的解析によって、hnRNP H1との直接結合を介して腫瘍増殖効果に関与するmRNAを同定し、その作用メカニズムを解明することを目的とした。</p>			
材料・方法			
1. 細胞培養			
<p>10%(vol/vol) ウシ胎児血清、2 mM 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度で培養した。</p>			
2. Western blotting			
<p>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℃で16時間反応させた後、特異的二次抗体と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部コントロールとして蛋白発現量を標準化した。</p>			

3. 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、テン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ケ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。

4. Real-time PCR

ランダムプライマーを用いてRNAを逆転写し、hnRNP H1とSGPL1特異的プライマーを用いてPCRを行った。18S rRNAの発現量を内部コントロールとして標準化した。

5. 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。

成 績

1. 大腸癌細胞株におけるhnRNP H1の細胞増殖能の評価

hnRNP H1発現抑制細胞でSRBアッセイを行った結果、大腸癌由来のHCT116細胞、SW480細胞およびHCEC-1CT細胞で細胞増殖抑制作用を確認した (n=5)。一方、大腸癌由来のSK-CO-1細胞では細胞増殖能に影響を及ぼさなかった。hnRNP H1発現抑制HCT116細胞でTUNEL染色を行った結果、TUNEL陽性細胞が有意に増加しており、hnRNP H1の抗アポトーシス作用を確認した。

2. hnRNP H1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 H1抗体による免疫沈降を行い、免疫沈降沈殿物からRNAを回収した。回収物とhnRNP H1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 H1と直接結合し、発現調整が行われている591mRNAを同定した。そのうち、アポトーシス関連の54mRNA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、SGPL1発現抑制HCT116細胞で細胞増殖抑制効果が最も高くみられた。一方で、非腫瘍由来HCEC-1CT細胞ではhnRNP H1発現抑制によるSGPL1 mRNAおよび蛋白の発現低下はみられず、hnRNP H1は正常細胞でSGPL1の発現量に影響を与えなかった。

3. hnRNP H1-SGPL1 mRNAの腫瘍増殖促進メカニズムの検討

SGPL1発現抑制HCT116細胞でcDNA arrayを行った結果、CDKN1Aとcyclin G2のmRNA発現が増加していた。Western blottingでは hnRNP H1およびSGPL1発現抑制細胞でp53のリン酸化を認めた。また、hnRNP H1およびSGPL1発現抑制細胞にp53阻害剤であるpifithrin- μ を投与した場合や HCT116 p53^{-/-}細胞でhnRNP H1およびSGPL1の発現抑制をした場合、細胞増殖抑制効果が減弱した。

考 案

hnRNP H1はSGPL1 mRNAと直接結合し、安定化させることで大腸癌細胞のアポトーシスを阻害することを初めて証明した。また、SGPL1発現抑制細胞において、アポトーシス誘導関連分子であるCDKN1Aとcyclin G2のmRNA発現が増加することを明らかにした。CDKN1Aとcyclin G2はp53のリン酸化によって発現量が調整されていることから¹⁻²⁾、p53の活性化について検討した結果、hnRNP H1またはSGPL1発現抑制細胞ではp53のリン酸化が有意に増加していた。一方で、p53非依存性の増殖調節が主体のSK-CO-1細胞ではhnRNP H1の発現抑制による増殖変化が見られなかった。以上から、hnRNP H1はSGPL1 mRNAの安定化を介してp53-CDKN1A、cyclin G2経路を抑制し、アポトーシスを回避していることが明らかになった。さらに、非腫瘍細胞においてはhnRNP H1の発現を抑制してもSGPL1 mRNAの発現には変化が無かったことから、この作用はがん特異的なものであると考えられ、hnRNP H1は新規がん治療標的の有力な候補となる可能性が示された。

結 論

hnRNP H1によってSGPL1 mRNAの安定化が誘導され、p53リン酸化の阻害によって大腸癌の細胞増殖能を亢進させることを証明した。hnRNP H1-SGPL1 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. Liu Y, Bodmer WF. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 976-981.
2. Zimmermann M, Arachchige-Don AS, Donaldson MS, et al. Elevated cyclin G2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent G2/M checkpoint arrest response to doxorubicin. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 22838-22853.

参 考 论 文

1. Konishi H, Fujiya M, Ueno N, 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;467(4):847-852.
2. Fujiya M, Konishi H, Mohamed Kamel MK, et al. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Oncogene.* 2014;33(40):4847-4856.