

胃癌における RNA 編集によるマイクロ RNA 発現低下メカニズムの解明

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 発生障害学部
リサーチレジデント 飯尾 明生

1. 研究の目的

最近の研究から、癌では遺伝子異常に加えて様々なエピジェネティック異常が蓄積し、癌の発症進展に大きく影響を及ぼしていることが明らかになってきた。RNA 編集異常もその一つであり、microRNA の 20%に編集が生じるなど、その異常が抗癌剤抵抗性や転移能の亢進につながる可能性が示唆されている。我々は多くの癌で発現が低下している miR-143/145 の発現異常について解析を進め、癌では宿主遺伝子であるノンコーディング RNA (NCR143/145) が積極的に分解されて miR-143/145 の低下につながること (Iio et al 2013)、胃癌では ADAR の発現が亢進し、NCR143/145 RNA が編集を受け核に滞留することを見出した。そこで本研究では、NCR143/145 RNA がいつ ADAR により編集され、どのように核内に滞留して miR-143/145 の産生を妨げているのか明らかにし、それを改善することで抗癌効果の高い内源性 miR-143/145 の発現を増加させ、癌を抑制することを目的としている。

2. 研究の方法

(1) 核内 NCR143/145 RNA の検出

Digoxigenin 標識した NCR143/145 RNA プローブを用いて MKN45 細胞株における RNA の局在を in situ hybridization により検出した。

(2) 胃癌における ADAR 遺伝子発現の解析

胃癌細胞株 (MKN-1, MKN-45, KATO-III) 及び胃癌患者検体 16 例 (癌部・非癌部) における ADAR の発現を qPCR により解析した。

(3) ADAR 阻害剤による NCR143/145 RNA 発現変化の解析

KATO-III 細胞を ADAR 阻害剤 (pentostatin, EHNA) で処理した場合の NCR143/145 発現量の変化を qPCR により解析した。

(4) p54nrb (NONO) ノックダウンによる NCR143/145 RNA 発現変化の解析

MKN-45 細胞に p54nrb siRNA を導入後、NCR143/145 の発現量を qPCR により解析した。

(5) PCR direct sequencing による RNA 編集の確認

Alu 様配列をはさんだ NCR143/145 特異的プライマーを用いて MKN-45 細胞核 RNA から RT-PCR を行い、PCR 産物を直接シーケンシングし、A to I 編集の結果みられる A to G 置換を確認した。

3. 研究成果

(1) NCR143/145 RNA の核内への滞留

MKN-45 胃癌細胞株を用いて NCR143/145 RNA の細胞内局在を in situ hybridization により調べたところ、積極的に分解される細胞質に比して、一部、核内に滞留していることが分かった (図 1)。

NCR143/145 RNA には Alu 様配列が多数存在し、核-細胞質リクルートに働く DDX6 とともに AGO2 が結合していることが分かっている

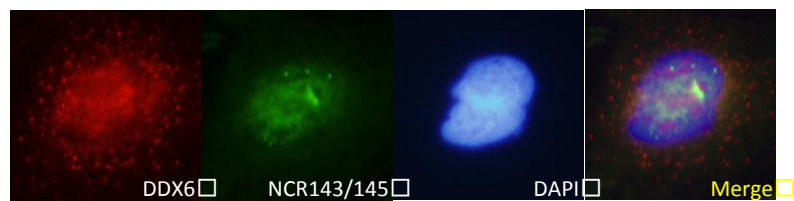


図1 NCR143/145 RNA の核内滞留

(Iio et al 2013)。Alu 配列は ADAR などにより A to I 編集されることで核への滞留や遺伝子サイレンシングに関与することから (Chen & Carmichael 2009)、NCR143/145 RNA が RNA 編集されることにより核へ滞留していることが考えられた。

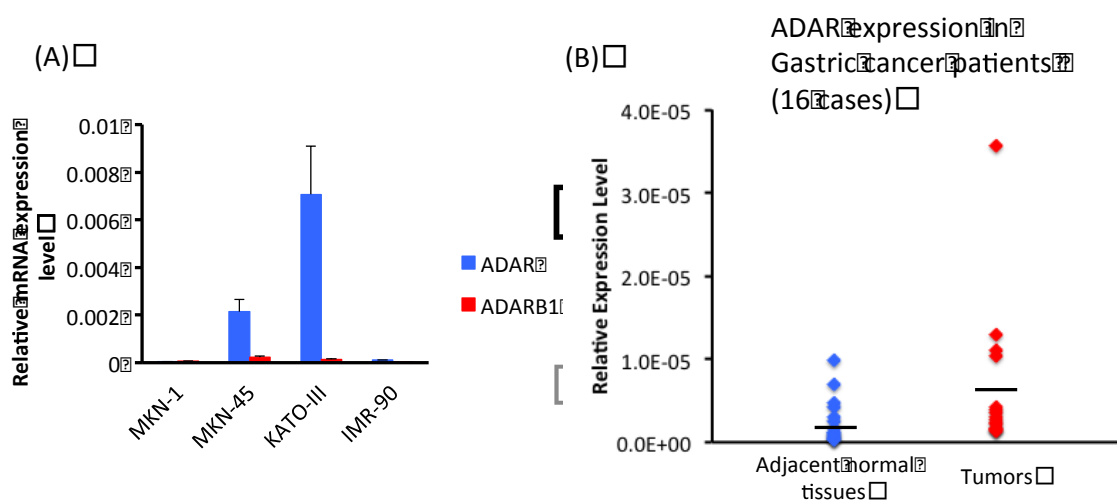


図2 胃癌細胞株及び胃癌検体におけるADARの発現

(2) 胃癌における ADAR 遺伝子発現の亢進

分解をまぬがれた NCR143/145 RNA の miR-143/145 へのプロセッシングと増加の妨げに、ADAR による編集が関与していることが考えられたことから、胃癌細胞株及び胃癌患者の検体（16例）を用いて ADAR 及び ADARB1 の発現を qPCR により解析した。繊維芽細胞株 IMR-90 及び分化型胃癌細胞株 MKN-1 に比べ、未分化型胃癌細胞株 MKN-45 及び KATO-III で ADAR の発現が顕著に亢進していること、胃癌患者検体の癌部でも亢進していることが分かった（図2）。

(3) ADAR 阻害剤による NCR143/145 RNA 量の亢進

KATO-III 細胞を ADAR 阻害剤 (EHNA, Pentostatin) 60 μM で 12hr 処理したところ、細胞質中の NCR143/145 RNA 量が顕著に増加した（図3）。核内の非スプライシング型 NCR143/145 RNA (Iio et al 2013) が ADAR による編集をうけずに、また分解をうけずに細胞質中にリクルートされたと考えられた。

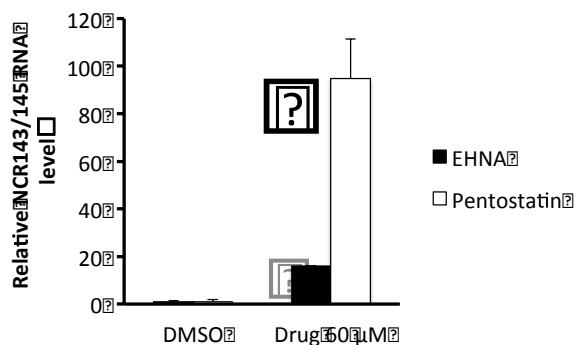


図3 ADAR阻害剤によるNCR143/145 RNA量の亢進

(4) p54nrb (NONO) ノックダウンによる NCR143/145 RNA 量の亢進

p54nrb (NONO) は、回文配列によって2本鎖を形成する RNA と特異的に結合することにより RNA の核内滞留に関与している。RNA 編集を受けた Alu 様配列が p54nrb (NONO) によって認識され、核内滞留していることが考えられることから、p54nrb (NONO) のノックダウンにより NCR143/145 RNA の変化を調べたところ、核内滞留が緩和されたことで、細胞質へのリクルート及び分解の抑制がおり、NCR143/145 RNA が増加していることが分かった（図4）。

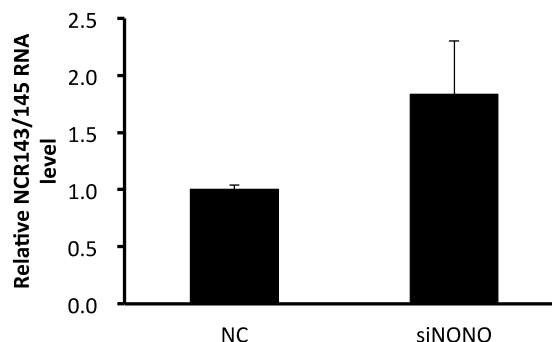


図4 p54nrb(NONO)ノックダウンによるNCR143/145 RNAの増加

(5) Alu 様配列における RNA 編集

MKN-45 細胞の核 RNA を用いて Alu 様配列を含む断片を増幅し、直接シーケンスしたところ、高度に A to I 編集がみられる領域を確認した (図 5)。この配列内には T to C 編集も高頻度でみられた。

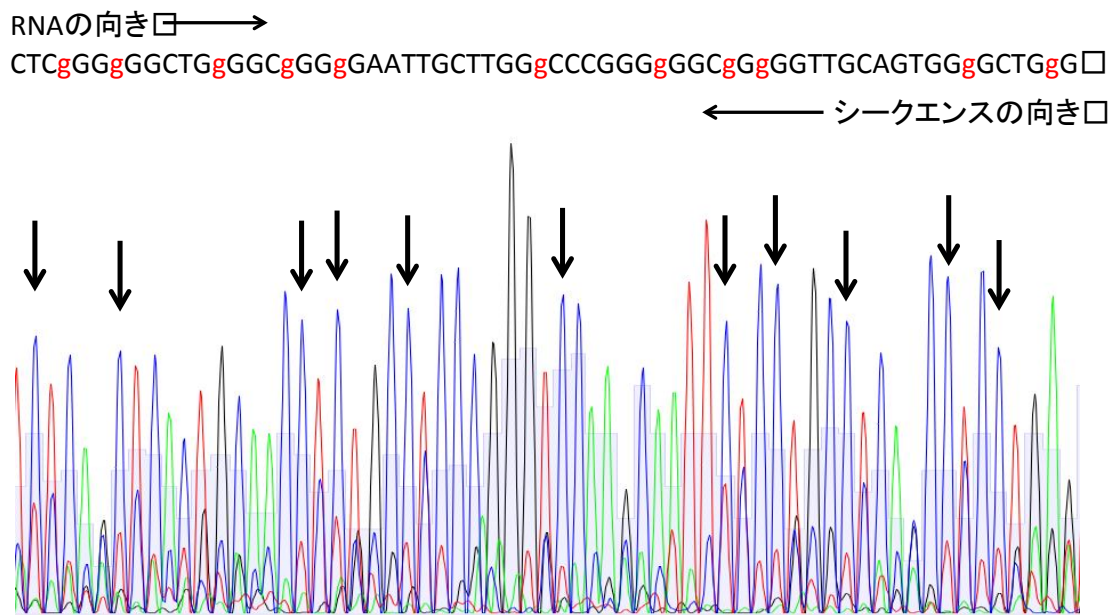


図5 Alu様配列内のRNA編集部位 □

参考文献

1) Akio Iio, Takeshi Takagi, Kohei Miki, Tomoki Naoe, Atsuo Nakayama, Yukihiro Akao. DDX6 post-transcriptionally down-regulates miR-143/145 expression through host gene NCR143/145 in cancer cells.

Biochimica et Biophysica Acta 1829, 1102-1110 (2013)

2) Ling-Ling Chen, Gordon G. Carmichael.

Altered Nuclear Retention of mRNAs Containing Inverted Repeats in Human Embryonic Stem Cells: Functional Role of a Nuclear Noncoding RNA.

Molecular Cell 35, 467-478 (2009)