

氏名(本籍)	田 辺 敦 (神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第 64 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	RNA ヘリカーゼ YTHDC2 の転写制御機構と癌転移における YTHDC2 の役割についての解析
論文審査委員	(主査) 佐 原 弘 益 (副査) 村 上 賢 滝 沢 達 也 代 田 欣 二

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

近年、筆者らは C 型肝炎ウイルスのゲノム複製に寄与する新規の RNA ヘリカーゼ遺伝子として、YTH domain containing 2 (YTHDC2)を同定した。ヒトの正常組織および様々な癌細胞株を用いて *YTHDC2* 遺伝子の発現を調べた結果、正常組織では発現が低い、一方で多くの癌細胞株では発現が高いことが明らかになった[参考論文(B), 3 ; Morohashi, Tanabe (9th author) et al., PLoS one, 6, e18285, 2011]。また、これまでの研究で、様々な RNA ヘリカーゼが癌遺伝子の翻訳を促進することで癌細胞の悪性化に寄与していることが報告されている。そこで本研究では、癌化に伴って発現が亢進する YTHDC2 の転写制御機構および癌細胞の主要な悪性形質の一つである癌転移における YTHDC2 の役割について解析した。

第 1 章 : YTHDC2 の転写制御機構解析

はじめに、YTHDC2 の転写開始に重要なプロモーター領域を同定するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ヒト肝癌細胞株 Huh-7 を用いて実験した結果、転写開始点より-261 から+159 塩基の領域が重要であることが示唆された。データベースによる解析により、その領域内には cAMP Response Element(CRE)、GATA、AP-1 の 3 種類の転写因子結合サイトが含まれていることがわかった。そこで、それぞれの結合サイトに変異を導入して、再度ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、CRE サイトに変異を導入したときのみプロモーターの活性が低下したため、この CRE サイトが *YTHDC2* 遺伝子の転写に重要であることが示唆された。次にこの CRE サイトに結合する転写因子を同定するためにクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った。Huh-7 細胞を用いて実験した

結果、この CRE サイトには転写因子 c-Jun, ATF2 が結合することが明らかになった。また、これらの転写因子は炎症性サイトカイン TNF α で刺激したヒト正常肝細胞でも活性化し、YTHDC2 の転写に寄与していることが示唆された（参考論文(A), 1; Tanabe et al., Gene, 535, 24-32, 2014）。

第 2 章：YTHDC2 の転移促進効果についての解析

YTHDC2 における癌化形質、特に癌細胞転移への役割を調べるために、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 において RNA 干渉法による *YTHDC2* 遺伝子発現が持続的抑制された細胞株の作出を試みた。まずは既知のヒト遺伝子を標的としていない shRNA (non-target shRNA) と YTHDC2 を標的とする shRNA (YTHDC2-shRNA) をそれぞれ形質導入した。その結果、*YTHDC2* の mRNA 発現量が野生型の HCT116 細胞とほとんど変わらないコントロール HCT116 細胞株(sh-cont 細胞)と *YTHDC2* の mRNA 発現量が野生型の HCT116 細胞に比べて約 80%低下した YTHDC2 ノックダウン細胞株(Y2-KD 細胞)を樹立した。樹立した細胞株の運動能力を Wound Healing アッセイと Transwell アッセイによって解析した。Wound Healing アッセイは、高密度で培養されている細胞が人工的に作った新しいスペース(Wound)に移動する量を調べることで二次元的な細胞運動能力を測定する方法である。Transwell アッセイは、細胞が Transwell のメンブレンに開いている 8 μ m の穴を通り抜けて反対側に移動した量を調べることで三次元的な運動能力を測定する方法である。*in vitro* における 2 種類の運動能力測定法により、Y2-KD 細胞の運動能力が sh-cont 細胞に比べて大きく低下していることがわかった。また、Y2-KD 細胞に YTHDC2 遺伝子を再発現させることで細胞の運動能力が回復するか否かを Transwell アッセイによって解析した。その結果、*YTHDC2* 遺伝子を再発現させた Y2-KD 細胞の運動能力は、sh-cont 細胞と同程度まで回復した。

さらに、*in vivo* における Y2-KD 細胞の転移能力を調べるために、ヌードマウスの脾臓に Y2-KD 細胞を移植し、肝臓に転移するか否かを調べた。その結果、sh-cont 細胞の移植を移植したマウスでは全例で肝臓への転移が見られたが、Y2-KD 細胞を移植したマウスでは、5 例中 2 例だけにしか肝臓への転移が見られなかった。以上の結果から、YTHDC2 は大腸癌細胞の転移に寄与していることが示唆された。

サイクロスポリン A (CsA) には YTHDC2 の分子機能を阻害する効果が認められている[参考論文(B), 3; Morohashi, Tanabe (9th author) et al., PLoS one, 6, e18285, 2011]。そこで、先の野生型 HCT116 細胞を移植した肝転移モデルマウスに CsA を投与すると、やはり転移が抑制された。以上の結果から CsA が YTHDC2 の分子機能を阻害し、大腸癌細胞の転移を抑制したことが示唆された。

次に、YTHDC2 の作用が実際にヒト大腸癌の進行度に関連しているのか否かを外科病理学的に調べた。ヒト大腸癌患者由来の 72 例の病理組織標本(札幌医科大学医学部・消化器外科講座との共同研究)を当研究室で作製した抗 YTHDC2 モノクローナル抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。その結果、YTHDC2 の発現レベルと癌の進行度(Stage) およびリンパ節転移の間に有意な正の相関が認められ、臨床的にも YTHDC2 が転移を伴う大腸癌の進行に重要な役割を持つことが示唆された。

(参考論文(A), 2; Tanabe et al., Cancer Letters, in press)

第 3 章 : YTHDC2 による HIF-1 α の翻訳促進機構の解析

固形癌における癌細胞転移では、固形癌内部の低酸素環境が引き金となって、上皮間葉系転換が誘導されて癌細胞が転移能力を獲得することが知られている。そこで筆者は、低酸素環境下において重要な役割を果たしている低酸素誘導因子 1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α : HIF-1 α)と YTHDC2 との相互作用について解析した。HIF-1 α は正常酸素環境では、ユビキチン-プロテアソーム経路を介してタンパク質分解されるため、タンパク質の発現量が減少しているが、低酸素環境では、ユビキチン化が阻害されるのでタンパク質の発現量が増加する。そこでまず始めに sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞を酸素濃度 1%の低酸素環境で培養し、HIF-1 α の発現量を調べた。その結果、低酸素環境における HIF-1 α の mRNA 発現量には sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞の間で有意な差がなかった。しかしながら、HIF-1 α タンパク質発現量は sh-cont 細胞では大きく増加しているが、Y2-KD 細胞では増加していなかった。これらの結果から、低酸素環境において YTHDC2 は HIF-1 α の翻訳を促進していることが示唆された。

RNA ヘリカーゼは遺伝子 mRNA の 5' 末端非翻訳領域 (5' UTR) の二次構造を解くことで翻訳を促進することが知られている。データベースによる解析により、HIF-1 α mRNA の 5' UTR は平均的な mRNA の 5' UTR に比べて、複雑な二次構造を形成しやすいことが示された。そこで、YTHDC2 が HIF-1 α mRNA の 5' UTR の二次構造を解くことで翻訳を促進しているか否かを解析するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを応用して次の実験を行った。まず、ホタルルシフェラーゼ発現ベクターのプロモーター領域とホタルルシフェラーゼ遺伝子領域の間に HIF-1 α mRNA の 5' UTR を挿入した。このベクターからホタルルシフェラーゼ遺伝子の mRNA が転写されると、HIF-1 α mRNA の 5' UTR と同じ二次構造が形成される。したがって、YTHDC2 が 5' UTR の二次構造を解くことで翻訳を促進するならば、Y2-KD 細胞ではこの二次構造が解けないので、sh-cont 細胞と比べてホタルルシフェラーゼ活性が低下すると予想される。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、Y2-KD 細胞では sh-cont 細胞と比べてホタルルシフェラーゼの活性が有意に低下した。この結果から HIF-1 α の翻訳には YTHDC2 が必要とされていることが示唆された。

HIF-1 α は低酸素環境で、上皮間葉系転換形質に関わる遺伝子群の転写に必要であるとされ、転移に重要な働きを持つ遺伝子である。YTHDC2 がそれを標的としていることは、YTHDC2 の転移促進作用の結果を強く支持するものであった。これらの結果から、RNA ヘリカーゼ YTHDC2 が HIF-1 α の翻訳を促進することで大腸癌細胞の転移に寄与すること、そして YTHDC2 が癌治療の予後予測因子や治療標的遺伝子になり得ることが示唆された。

(参考論文(A), 2; Tanabe et al., Cancer Letters, in press)

論文審査の結果の要旨

RNA ヘリカーゼ YTH domain containing 2 (YTHDC2) は癌細胞では高発現しているが、正常細胞では炎症状態でないと発現しない分子である[参考論文(B), 3; Morohashi, Tanabe (9th author) et al., PLoS one, 6, e18285, 2011]。また、これまでの研究で、種々の RNA ヘリカーゼが癌遺伝子の翻訳を促進することで癌細胞の悪性化に寄与していることが報告されている。従って、YTHDC2 は正常細胞の炎症に伴う癌化の過程や癌の進行に必要とされる様々なタンパク分子の翻訳において重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで筆者は、本研究の第 1 章で、YTHDC2 の転写制御機構をヒト正常肝細胞およびヒト肝癌細胞を用いて解析した。続く第 2 章では YTHDC2 が癌の悪性形質の一つである転移形質に関与しているかを解析し、さらに第 3 章では、YTHDC2 によって翻訳が促進される標的遺伝子を探索した。各章の実験結果を以下に示す。

第 1 章 : YTHDC2 の転写制御機構解析

はじめに、YTHDC2 のプロモーター領域を同定するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ヒト肝癌細胞株 Huh-7 を用いて実験した結果、転写開始点より-261 から+159 塩基の領域が重要であることが示唆された。データベースによる解析により、その領域内には cAMP Response Element(CRE)、GATA、AP-1 の 3 種類の転写因子結合サイトが含まれていることがわかった。そこで、それぞれの結合サイトに変異を導入した結果、CRE サイトに変異を導入したときのみプロモーターの活性が低下したため、この CRE サイトが転写制御に重要であることが示唆された。次にクロマチン免疫沈降法によって CRE サイトに結合する転写因子を調べた結果、ヒト肝癌細胞では転写因子 c-Jun, ATF2 が結合することが明らかになった。また、これらの転写因子は炎症性サイトカイン TNF α で刺激したヒト正常肝細胞でも活性化し、YTHDC2 の転写に寄与していることが示唆された。(参考論文 (A), 1; Tanabe et al., Gene, 535, 24-32, 2014)。

第 2 章 : YTHDC2 の転移促進効果についての解析

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 における YTHDC2 遺伝子発現を RNA 干渉法を用いて、YTHDC2 ノックダウン細胞株(Y2-KD 細胞)を樹立した。Y2-KD 細胞の運動能力を Wound Healing アッセイと Transwell アッセイによって解析した結果、Y2-KD 細胞の *in vitro* における運動能力がコントロールの細胞株に比べて大きく低下していることがわかった。また、Y2-KD 細胞に YTHDC2 を再発現させることで細胞の運動能力が回復するかを調べた結果、YTHDC2 を再発現させた Y2-KD 細胞の運動能力は、コントロールの細胞株と同程度まで回復した。

さらに、*in vivo* における Y2-KD 細胞の転移能力を調べるために、ヌードマウスの脾臓に Y2-KD 細胞を移植し、肝臓に転移するかを調べた。その結果、コントロールの細胞株を移植したマウスでは全例で肝転移が見られたが、Y2-KD 細胞を移植したマウスでは、5 例中 2 例だけにしか肝転移が見られなかった。さらに、YTHDC2 の分子機能を阻害することが認められている薬剤 (サイクロスポリン A ;

CsA) を、野生型 HCT116 細胞を移植した肝転移モデルマウスに投与すると、それでも肝転移が抑制された。以上の結果から、YTHDC2 は大腸癌細胞の *in vivo* における転移能力に寄与していることが示唆された。

次に、YTHDC2 の作用が実際にヒト大腸癌の進行度に関連しているのかを外科病理学的に調べるために、ヒト大腸癌患者由来の 72 例の病理組織標本を抗 YTHDC2 モノクローナル抗体で免疫組織化学染色した。その結果、YTHDC2 の発現レベルと癌の進行度およびリンパ節転移の間に有意な正の相関が認められ、臨床的にも YTHDC2 が転移を伴う大腸癌の進行に重要な役割を持つことが示唆された。(参考論文(A), 2; Tanabe et al., Cancer Letters, in press)。

第 3 章 : YTHDC2 による HIF-1 α の翻訳促進機構の解析

固形癌における癌細胞転移では、固形癌内部の低酸素環境が引き金となって、上皮間葉系転換が誘導されて癌細胞が転移能力を獲得することが知られている。そこで筆者は、低酸素環境下において重要な役割を果たしている低酸素誘導因子 1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α : HIF-1 α) と YTHDC2 との相互作用について解析した。HIF-1 α は正常酸素環境では、ユビキチン-プロテアソーム経路を介してタンパク質分解されるため、タンパク質の発現量が減少しているが、低酸素環境では、ユビキチン化が阻害されるのでタンパク質の発現量が増加する。そこでまず始めに sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞を酸素濃度 1% の低酸素環境で培養し、HIF-1 α の発現量を調べた。その結果、低酸素環境における HIF-1 α の mRNA 発現量には sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞の間に有意な差がなかった。しかしながら、HIF-1 α タンパク質発現量を調べた結果、低酸素環境における HIF-1 α のタンパク質発現量はコントロールの細胞株では大きく増加しているが、Y2-KD 細胞ではあまり増加していないことが示された。これらの結果から、低酸素環境において YTHDC2 は HIF-1 α の翻訳を促進していることが示唆された。

種々の RNA ヘリカーゼが遺伝子 mRNA の 5' 末端非翻訳領域 (5' UTR) の二次構造を解くことで翻訳を促進することが知られている。そこで、YTHDC2 が HIF-1 α mRNA の 5' UTR の二次構造を解くことで翻訳を促進しているかを解析するため、プロモーター領域の直後に HIF-1 α mRNA の 5' UTR を挿入したホタルルシフェラーゼ発現ベクターを作製した。このベクターからホタルルシフェラーゼ遺伝子の mRNA が転写されると、HIF-1 α mRNA の 5' UTR と同じ二次構造が形成される。このベクターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、Y2-KD 細胞におけるルシフェラーゼ活性がコントロールの細胞株と比べて有意に低下した。即ち、YTHDC2 が HIF-1 α mRNA の 5' UTR 二次構造を解くことで翻訳を促進していることが強く示唆された。HIF-1 α は低酸素環境で、上皮間葉系転換形質に関わる遺伝子群の転写に必要であるとされ、転移に重要な働きを持つ遺伝子である。YTHDC2 がそれを標的としていることは、YTHDC2 の転移促進作用の結果を強く支持するものであった。(参考論文(A), 2; Tanabe et al., Cancer Letters, in press)

本研究から得られた YTHDC2 遺伝子の転写制御機構や癌転移における役割に関する知見は、YTHDC2 が癌治療の予後予測因子や治療標的遺伝子になり得ることを強く示唆するものであった。

従って、学術的価値がある研究成果として十分に評価できることから、博士（学術）の学位を授与するのにふさわしい研究と判定した。