

博士論文

論文題目 肺腺癌におけるTGF- β 標的遺伝子RBM47の
発現と機能の解析

氏 名 櫻井 翼

目次

要旨	3
序論	4 - 16
1. TGF- β の機能とそのシグナル伝達機構	
2. 肺癌における TTF-1 の役割と TGF- β シグナルの制御	
3. Nrf2 の機能とその作用機構	
4. 癌における RNA 結合タンパク質の多能性	
5. 本研究の目的	
実験材料と方法	17 - 31
実験結果	32 - 63
1. 新規 TGF- β 標的因子としての RBM47 の同定	
2. TGF- β と TTF-1 による RBM47 の発現制御	
3. RBM47 発現恒常欠損株の作製と RBM47 の機能の解析	
4. RBM47 の細胞酸素消費量と side population 比率に対する影響	

5. RBM47 の腫瘍増大速度の制御

考察	64 – 71
結論	72 – 73
引用文献	74 – 84
謝辞	85

要旨

新規の TGF- β 標的 RNA 結合タンパク質として RBM47 を同定し、肺腺癌における機能を解析した。次世代シーケンサーによる遺伝子の網羅的解析から、腫瘍の増大に関わる転写因子 Nrf2 を制御する因子 KEAP1 と CUL3 の mRNA に RBM47 が結合することが分かった。また、RBM47 の knockdown により KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現が減少し、Nrf2 の標的遺伝子の発現が増加した。更に、RBM47 の knockdown により細胞の酸素消費量と side population 分画の割合が増加し、腫瘍が増大した。以上から、RBM47 は Nrf2 の活性を抑制し、腫瘍を抑制したことが示唆される。

序論

1. TGF- β の機能とそのシグナル伝達機構

TGF- β (transforming growth factor- β) は、分子量約 25 kDa の二量体構造を持つサイトカインタンパク質であり、様々な組織において細胞間コミュニケーションに関与している。TGF- β は、もともと軟寒天培地中で、正常繊維芽細胞の増殖を促進させる因子として同定され、細胞の形質を悪性化する因子の 1 つであると考えられた。しかし、その後、上皮細胞に対する TGF- β の増殖抑制作用が見出され、腫瘍抑制因子として注目を集めた。¹ 現在では、TGF- β は腫瘍の発生初期の段階は抑制するが、後期の悪性化の段階は促進する二面性を持つことが判明している。² TGF- β が上皮細胞に対して誘起する現象の一つとして **epithelial to mesenchymal transition (EMT)** が知られており、癌細胞の運動能や浸潤能の増加、細胞外マトリックスタンパク質の産生能の増加、血管新生、免疫機能障害などにより癌の悪性化に関与すると考えられている。³ また、TGF- β は腫瘍幹細胞の **sphere** 形成能にも影響を与え、腫瘍幹細胞の未分化性維持に重要な役割を担うことが分かっている。⁴ 更に、多くの腫瘍細胞は TGF- β を分泌しており、オートクラインによって腫瘍細胞そのものの生存に寄与することが示唆されている。⁵

哺乳類の TGF- β には、70-80%の相同性を持つ TGF- β 1~3 の 3 つのアイソフォーム

が存在する。TGF- β 1~3 は生体内での発現・活性・生理機構において、それぞれ細かい差異があるが、ほとんど同じ構造・性質を有することが分かっている。TGF- β のシグナル伝達経路は、TGF- β が標的細胞の細胞膜上の type I receptor (T β RI) と type II receptor (T β RII) というセリン／スレオニンキナーゼ型受容体で構成されるヘテロ四量体の形成を誘導することから始まる。TGF- β が結合すると、ヘテロ四量体の中で T β RII の恒常活性型キナーゼにより T β RI の細胞内ドメインにある GS ドメインがリン酸化を受ける。その後、リン酸化を受けた T β RI から Smad と呼ばれるシグナル分子を介して細胞内へとシグナルが伝達される。Smad は哺乳類において 8 種類が知られており、R-Smad (receptor-regulated Smad)、Co-Smad (common-mediator Smad)、I-Smad (inhibitory Smad) の 3 つに分類される。活性化された T β RI によって、はじめに R-Smad である Smad2/3 の C 末端部位がリン酸化を受ける。リン酸化された Smad2/3 は Co-Smad である Smad4 と結合して核内へと移行し、様々な転写因子や転写共役因子と複合体を形成して標的遺伝子の転写調節を行う (図 1 左)。^{6,7} 転写共役因子には、p300 や CBP などのヒストンアセチル化酵素があり、Smad 複合体と結合して転写を活性化する。また、I-Smad である Smad7 は、TGF- β 刺激に依存して発現が誘導され、T β RI と結合して R-Smad のリン酸化を競合阻害することで、ネガティブフィードバックを形成する。^{8,9} TGF- β のシグナル伝達に関わる因子としては、c-Ski や SnoN があり、

R-Smad と複合体を形成することで Smad による転写を抑制する。⁷ また、E3 リガーゼの Smurf1, Smurf2 は R-Smad や T β RI をプロテアソーム依存的に分解して TGF- β -Smad シグナルを抑制する一方で、¹⁰ E3 リガーゼの Arkadia は I-Smad や c-Ski, や SnoN の分解を促進することで TGF- β のシグナル伝達を促進することが知られており、様々な増殖因子とクロストークすることが示唆されている。¹¹ このように様々なシグナル分子から制御を受ける Smad 経路は複雑な TGF- β シグナルの中心的な役割を担う一方で、Smad を介さずに MAPK, S6K, RhoAなどを活性化もしくは不活性化する non-Smad 経路も存在する(図 1 右)。¹²

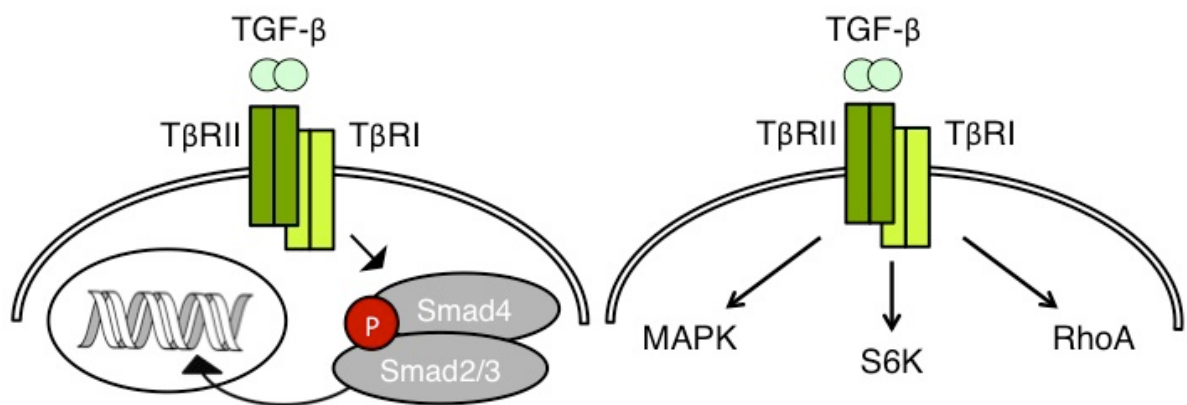


図 1. TGF- β の細胞内シグナル伝達機構

TGF- β は type I receptor (T β RI) と type II receptor (T β RII) で構成されるヘテロ四量体を誘導し、T β RI の GS ドメインをリン酸化させる。その後、Smad を介する Smad 経路と Smad を介さない non-Smad 経路に分かれる。Smad を介した経路では、Smad2/3 がリン酸化され、Smad4 と結合し、核内移行して遺伝子の発現を制御する (左図)。

Smad を介さない経路では、MAPK, S6K, RhoA などの経路を介して遺伝子の発現を制御する (右図)。

2. 肺癌における TTF-1 の役割と TGF- β シグナルの制御

甲状腺転写因子 thyroid transcription factor 1 (TTF-1) は、ホメオドメインを有する核内タンパク質で、肺や甲状腺や脳の一部において特異的に発現し、その機能や発達において重要な役割を果たすことが知られている。¹³ 癌における TTF-1 の発現もまた、肺癌や甲状腺癌といった TTF-1 が発現する正常組織に形成される癌に分布している。肺癌に着目すると、TTF-1 は肺線癌の約 72%、小細胞肺癌の約 89%で観察され、他の肺癌においては、ほとんど観察されないことが分かっている。特に肺腺癌においては、肺癌の進行の各段階において TTF-1 の発現が残り、肺線癌の予後に関わる因子として着目されている。¹⁴

近年の肺腺癌における TTF-1 の研究では、TTF-1 には癌細胞の生存や EGF 受容体を介したシグナルを促す癌促進因子としての働きと、^{15,16} TGF- β シグナルを阻害することにより EMT を介した癌の浸潤・転移を抑える癌抑制因子としての働きの両方があることがわかった。¹⁷ 従って、癌における TTF-1 の役割を理解するためには、その作用機構の更なる解析が必要である。

3. Nrf2 の機能とその作用機構

転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は、塩基性領域／ロイシンジッパー(BZIP) 構造を持つ転写因子の一つであり、生体内のレドックス反応に対するセンサーの役割を果たしている。正常細胞の非酸化ストレス下では、Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) とユビキチンリガーゼ複合体である Cullin3 (CUL3) - RING-box protein 1 (RBX1) により、速やかに分解されることが分かっている。¹⁸ 正常細胞に酸化ストレスが加わると Nrf2 の発現が安定化し、転写因子 small musculoaponeurotic fibrosarcoma (sMaf) ファミリーのタンパク質 (MafF, MafG, MafK) と複合体を形成し、antioxidant/electrophile response element (ARE/EpRE) 部位に結合し、標的遺伝子の発現の調整を行い、抗酸化作用を示すことで生体防御の機構を担っている (図 2A)。Nrf2 を欠損したマウスでは、酸化ストレスに対する解毒酵素や抗酸化分子の発現が行われないことから、Nrf2 は生体異物や酸化ストレスに対する細胞の防御機構として、重要な役割を担うことが分かっている。¹⁹

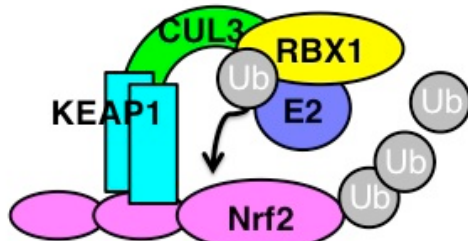
Nrf2 には7つの機能ドメインが存在し、Nrf2-ECH homology (Neh) ドメインと名付けられている (図 2B)。N 末端にある Neh2 ドメインは、CUL3 や RBX1 とユビキチンリガーゼ複合体を形成して Nrf2 の分解を行う KEAP1 の二量体と結合する。C 末端側にある Neh1 ドメインは sMaf と複合体を形成し、DNA の ARE 部位に結合することで、転写を制御する。²⁰

Nrf2 の Neh2 ドメインと結合し、Nrf2 の発現を制御するヒト KEAP1 は、624 個のアミノ酸で構成されている (図 2B)。KEAP1 は、N 末端側に二量体を形成し CUL3 と結合する Bric-à-brac (BTB) ドメイン、C 末端側に Nrf2 と結合する 6 つの Kelch ドメインを有しており、BACK (IVR) ドメインを介して結合する。ヒトの KEAP1 のタンパク質には 27 個の Cys 残基があり、その半分は正常な生理条件下で、チオール基がチオラートアニオンを形成することができ、非常に反応性が高いことが分かっている。そのため、求電子剤により付加体を形成したり、急激に酸化させられたりするため、細胞内の酸化還元反応のセンサーとしての役割を担うことが考えられる。²¹

ヒトで発現する 6 つの CUL タンパク質は、C 末端側にある CUL homology (CH) ドメインによって、CUL1, 2, 3, 4A, 4B, 5 の 6 つに分類することができ、他にも DOC1 (destruction of cyclin B) ドメインや IBR (in-between-ring) ドメインを含む CUL7 や CUL9 がヒトでは発現する (図 2B)。これらの CUL タンパク質は、RBX1 や RBX2 と結合して、CUL-RBX ユビキチンリガーゼ複合体を形成する。²² その中で、CUL3 は、BTB 配列を持つタンパク質と結合することが報告されている。これらのユビキチンリガーゼ複合体は、何千もの基質をユビキチン化によって分解し、細胞周期の制御、遺伝子転写、アポトーシス、DNA ダメージや修復、クロマチンのリモデリング、酸化ストレス応答、シグナル伝達といった細胞応答を制御する。²³

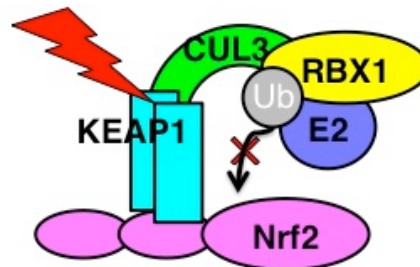
A

<非ストレス下>

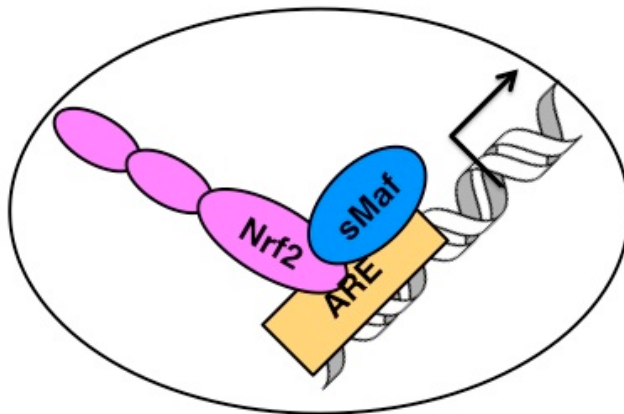


Nrf2が分解される

<酸化ストレス>



Nrf2のユビキチン化が抑制され、
Nrf2の分解が抑制される



抗酸化作用を促進



生体内の細胞を防御

B

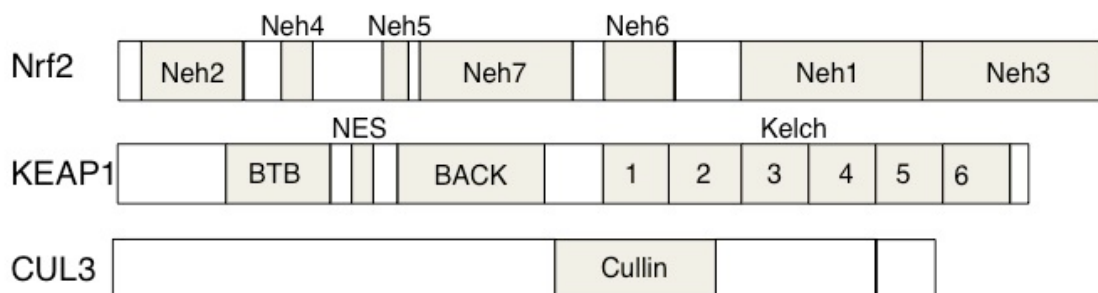


図 2. Nrf2、KEAP1、CUL3 のアミノ酸配列と Nrf2 の主な作用機構

(A) 正常細胞の Nrf2 のシグナルの反応を示す。非酸化ストレス下では、Nrf2 は KEAP1、CUL3、RBX1 の E3 リガーゼ複合体によって分解されるが、酸化ストレス下では分解されない。分解されなかった Nrf2 は、転写因子 sMaf と共に標的遺伝子の ARE 部位に結合し、遺伝子の発現の調整を行う。

(B) Nrf2、KEAP1、CUL3 のアミノ酸配列を示す (Neh : Nrf2-ECH homology、BTB : Bric-à-brac)。

一方、癌細胞では、KEAP1 や Nrf2 の変異や発現異常により、Nrf2 の発現が安定化する。これまでに、Nrf2 の変異は、食道癌 (11.4%)、皮膚癌 (6.3%)、肺癌 (8.0%)、喉頭癌 (13.0%) で報告されている。²⁴ また、KEAP1 の変異は、胃癌 (11.1%)、肝臓癌 (8.9%)、大腸癌 (7.8%)、肺癌 (4.6%)、乳癌 (2.0%)、前立腺癌 (1.3%) で報告されている。²⁶ KEAP1 では BACK ドメインと Kelch ドメインを中心に全領域に変異がみられる一方で、Nrf2 は KEAP1 との結合に重要である Neh2 ドメインに変異が集中している。^{24,25} KEAP1 または、Nrf2 のどちらかの遺伝子に変異があると、Nrf2 と KEAP1 の結合が外れやすくなり、Nrf2 の発現が安定化して核内に移行する (図 3 左上)。また、p21/CDKN1A は Nrf2 の Neh2 ドメインに結合することから、KEAP1 の競合タンパク質として Nrf2 と KEAP1 の結合を阻害し、Nrf2 の活性化を促進させることが示唆されている (図 3 中央上)。^{27,28} 更に、肺腺癌細胞において、KEAP1 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドにおいてメチル化の異常があり、KEAP1 の発現量が減少することが報告され、Nrf2 の活性化を促進することが示唆されている (図 3 右上)。²⁹ 癌細胞でも正常細胞と同様に核内に移行した Nrf2 は転写因子 sMaf と複合体を形成して ARE 配列に結合し、抗酸化タンパク質を誘導する (図 3 左下)。これにより、癌細胞は、酸化ストレスや抗癌剤治療に対する抵抗性が促進される。また、代謝関連因子も

増加し、代謝を変化させることで、腫瘍の増殖に対し優位に働くことが分かっている

(図 3 下)。³⁰

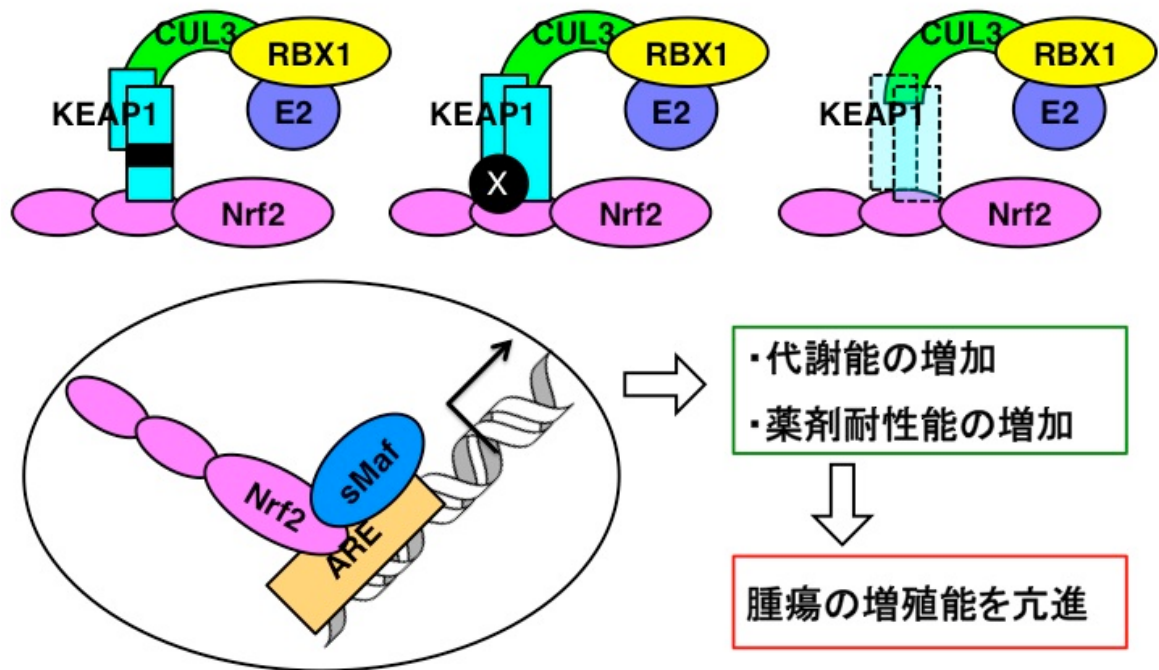


図 3. 癌細胞における Nrf2 シグナル活性化のメカニズム

肺癌の細胞では、Nrf2 や KEAP1 の変異や、Nrf2 と KEAP1 との間に介在する阻害性物質の存在、KEAP1 や CUL3 の発現低下により、Nrf2 が非ストレス下でも分解を受けずに安定的に発現する。その後、Nrf2 は、転写因子 sMaf と共に標的遺伝子の ARE 部位に結合し、遺伝子の発現の調整を行う。

4. 癌における RNA 結合タンパク質の多能性

歴史的に、癌研究においては、転写制御やシグナル伝達の異常に焦点が当てられてきた。近年、DNA が RNA に転写された後の制御も、細胞の増殖、分化、浸潤、転移、アポトーシス、血管新生といった現象に関わることが分かり、癌の浸潤・転移への関

与も示唆されている。^{31,32} 当研究室でも、これまで microRNA (miRNA) を含む non-coding RNA による RNA に転写された後の発現制御が重要であることを示してきた。³³ また、多くの RNA 結合タンパク質が RNA に結合することで、RNA の機能を制御することが報告されている。³⁴

RNA は、RNA 自身だけでは不安定である。多くの RNA 結合タンパク質や他のタンパク質と結合したりボヌクレオタンパク質複合体 (RNP: ribonucleoprotein complexes) を形成することで安定化する。従って、RNA に結合する RNA 結合タンパク質もまた RNA の代謝において重要な役割を担っており、RNA のプロセッシング、スプライシング、5'キャッピング、ポリアデニル化、細胞質への移行、局在そして分解に至るまでを制御している (図 4)。³⁵ そのため、癌細胞における RNA 結合タンパク質の発現異常や欠損は、癌特異的な活性制御をもたらし、癌の進行に大きく関わることを示唆されている。³⁶

RNA 結合タンパク質には、RNA 結合ドメインが一つもしくは複数あり、同部位を介して RNA や RNA に結合するタンパク質と結合する。RNA 結合ドメインには、RRM (RNA recognition motif) ドメイン、KH (K-homology) ドメイン、dsRBM (double-stranded RNA binding motif) ドメイン、PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille domain) ドメインなどがあり、RRM ドメインは RNA 結合ドメインの中でも最も一般的なものである。³⁷ RRM ドメ

インは、 α ヘリックスと β シートからなるサンドイッチ構造をとっており、真核細胞の RRM ドメインを有する RNA 結合タンパク質の多くは、RNA の安定化からタンパク質の翻訳までの RNA の代謝に寄与することが知られている。³⁴ 例えば、RRM ドメインを有する RNA 結合タンパク質の一つである HuR は、細胞質と核の両方に局在し、アラニンやウラシルを多く含む mRNA の 3'UTR に結合することで、mRNA の安定化に関与する。加えて、HuR は、Cyclin D1, c-myc, VEGF といった細胞増殖因子や Bcl2, Mcl-1, SIRT1, p21/CDKN1A といったアポトーシス関連因子、さらに MMP-9 や Snail といった浸潤・転移・EMT に関わる因子の mRNA に結合し、乳癌・胃癌・肺癌・大腸癌といった多くの癌で高発現していることから、癌の進行に関与することが示唆されている。³² このことから、RRM の RNA に対する特異性は低く、逆に一つの RNA に対して複数の RNA 結合タンパク質が結合することが分かっている。

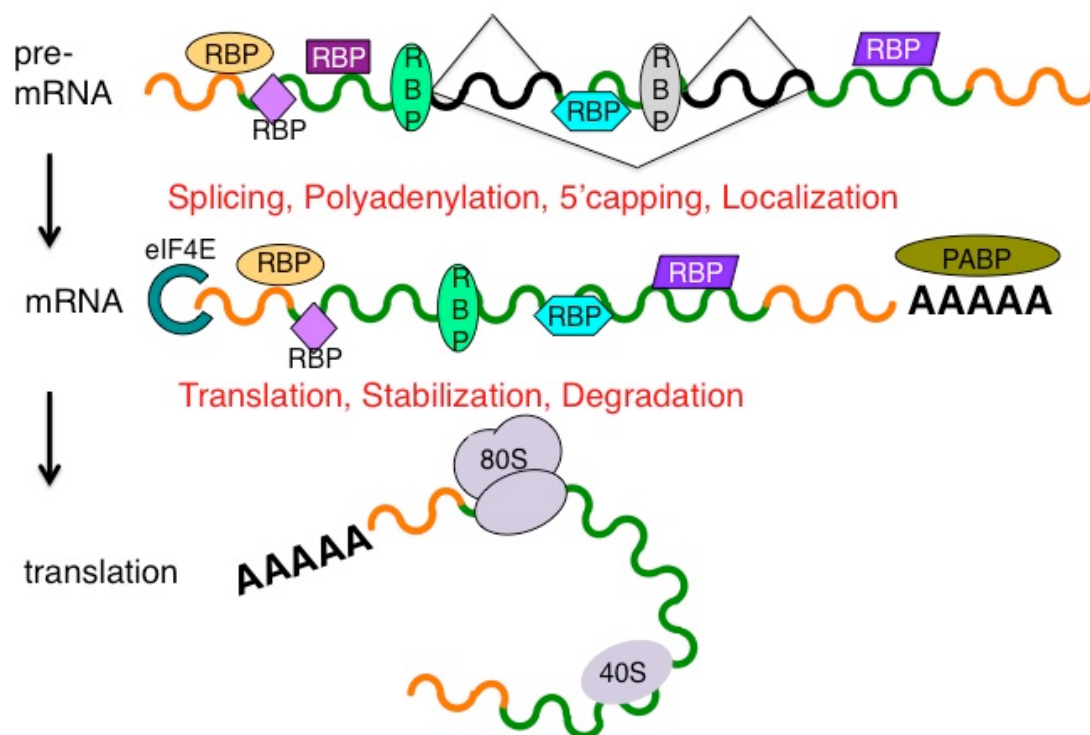


図 4. RNA 結合タンパク質の役割

RNA 結合タンパク質は、DNA から転写された RNA に結合し、選択スプライシング、ポリアダニル化、5'キャッピング、膜外輸送、翻訳制御、安定化、分解に関わり、タンパク質の発現を制御することが分かっている。また、RNA 結合タンパク質は、一つの RNA について複数結合することが知られている。RBP は RNA binding protein を示す。また、5'末端の cap 構造に結合する eIF4E と、3'末端のポリ A 鎖に結合する poly(A)-binding protein (PABP) は、RBP とは別に示す。

5. 本研究の目的

以上の背景から、TGF- β の制御を受ける機能未知の癌関連 RNA 結合タンパク質を同定し、癌の進行における役割について解明することが、本研究の目的である。また、肺癌において TTF-1 との関係性を明らかにすることは、肺癌の研究の中で重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、同定した RNA 結合タンパク質の機能を網羅的

に解析するため、本タンパク質に結合する RNA の同定を試みた。更に、現在まで、Nrf2 の作用機構における RNA 結合タンパク質の役割について知見は少なく、本研究では、癌において RNA 結合タンパク質による Nrf2 の作用機構の解明の契機となることを期待して研究を行った。

実験材料と方法

リガンドと抗体

TGF- β 3 (R&D Systems) は 2.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) を含む 4 mM HCl に溶解して使用した。使用した抗体を以下に示す。

マウスモノクローナル抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich, DM1A)

マウスモノクローナル抗 TTF-1 抗体 (Novus Biologicals, 8G7G3/1)

ラビットポリクローナル抗 RBM47 抗体 (Sigma-Aldrich, HPA006347)

ラビットモノクローナル抗 Nrf2 抗体 (Abcam, EP1808Y)

ラビットポリクローナル抗 KEAP1 抗体 (Proteintech, 10503-2-AP)

ラビットモノクローナル抗 CUL3 抗体 (Abcam, EPR3196Y)

マウスモノクローナル HDAC1 抗体 (Millipore, 2E10)

ラビットポリクローナル抗 ATP5L 抗体 (Abcam, ab126181)

ラビットポリクローナル抗 NDUFS6 抗体 (Abcam, ab156099)

細胞培養

A549 細胞は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから購入したものを使用した。NCI-H441 (H441) 細胞と HEK293T 細胞は、American Type Culture Collection

から購入したものを使用した。A549 細胞と HEK293T 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)と 100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM #11965; Thermo Scientific) で培養した。H441 細胞は、10% FBS と 100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin を加えた RPMI 1640 (#11875; Thermo Scientific) で培養した。全ての細胞株は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

A549 細胞は 10 cm プレート (SARSTEDT) に、H441 細胞は 15 cm プレート (SARSTEDT) に播種し、リポフェクション法により siRNA を遺伝子導入させた。その後、最終濃度が 1%になるようにホルムアルデヒドを添加し、室温で 10 分間インキュベーションすることにより細胞を固定した。その後、最終濃度が 0.125 M となるようにグリシン水溶液を添加し、室温で 5 分間インキュベーションすることで固定反応を停止させた。氷冷した PBS (-) にて細胞を 2 回洗浄した後、氷冷した PBS (-) を 1 ml 添加してスクレーパーで細胞を回収し、4°C、2,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、ペレットに 1 ml の SDS lysis buffer (1% SDS、50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、10 mM EDTA、protease inhibitor (P8340; Sigma-Aldrich)) を添加し、再懸濁した。その後 Bioruptor UCW-201 (コスモ・バイオ) を用いてこの細胞懸濁液にソニケーションを行

った。ソニケーションの条件は、出力”high”で 30 秒を 3 回、インターバルは 30 秒とした。得られたサンプルを 8°C、14,000 rpm で 10 分間遠心し、40 μ l の上清をインプット用サンプルとして取り分けた。残りの上清のうち 800 μ l を ChIP dilution buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% TritonX-100、Complete EDTA-free protease inhibitors (Roche Diagnostics)) で 10 倍希釈して 8 ml のサンプル溶液を作製し、2-methacryloxyethyl phosphorylcholine polymer-treated 15 ml polypropylene tube (アシスト) に入れた。作製したサンプル溶液に、予め 0.5% BSA を含有する PBS (-) で 4°C にて 5 μ g の抗体とインキュベーションした Dynabeads (Invitrogen) を加え、4°C で一晩インキュベーションした。翌日、室温、2,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 7 ml を除去し、残りの溶液で Dynabeads を回収し、1.5 ml のマイクロチューブに移した。Wash buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.0]、0.5 M LiCl (Sigma-Aldrich)、1 mM EDTA、0.7% sodium deoxycholate、1% NP-40) にて 6 回、TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]、1 mM EDTA) にて 1 回洗浄し、Magnetic Particle Concentrator (Dyna) に Dynabeads を吸着させて回収した。回収した Dynabeads に SDS lysis buffer を 200 μ l/tube で添加し、65°C で一晩インキュベートし、脱クロスリンクを行った。翌日、上清を PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、nuclease-free 水で溶出した。ChIP-PCR 解析では、StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Thermo Scientific) にて FastStart Universal SYBR

Green Master (Roche Applied Science) の蛍光を検出することで定量化を行った。HBB (haemoglobin beta) をネガティブコントロール遺伝子として使用した。すべてのサンプルは最低 2 回ずつ測定し、結果は測定の平均を示した。使用したプライマーを表 1 に示す。

ChIP-seq の解析

RBM47 をコードする遺伝子部位での TTF-1 と Smad3 が結合する場所は、これまでに研究室で報告した ChIP-seq のデータ (GEO accession no: GSE51510) を使用し、解析した。³⁸

siRNAs による RNA 干渉

ヒト TTF-1 に対する small interfering RNA (siRNA) は、以前に研究室で報告した Thermo Scientific より購入したものを使用した。¹⁷ RBM47 の siRNA と control siRNA (Cat. 12935-112, 製品の配列情報非開示) は Thermo Scientific より購入したものを使用した。H441 細胞への siRNA 導入には、Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Scientific) を用いて、推奨プロトコルに従って、リバーストランスフェクション法により行った。培養液中の siRNA の最終濃度は、50 nM にした。RBM47 の siRNA の

配列を以下に示す。

siRBM47#1

CCUUCGUCAUGUACUGCCACAAGCA

UGCUUGUGGCAGUACAUGACGAAGG

siRBM47#2

UAAAUAGUCAAGCGUCCUUCAGUG

CACUGAAGGAACGCUUGACUAUUUA

RNA の抽出と RT-PCR

TriPure (Roche Diagnostics) を使用して、プロトコルに従い RNA を抽出した。0.5～1 µg の total RNA と Oligo (dT)₂₀ プライマーを用いて、Prime Script II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara) により cDNA を合成した。定量的 RT-PCR 解析では、StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Thermo Scientific) にて Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Scientific) の蛍光を検出することで mRNA の定量化を行った。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内因性コントロール遺伝子として使用した。すべてのサンプルは、2 回ずつ測定し、結果は 2 回の測定の平均を示した。使用したプライマーを、表 1 に示す。

表 1. PCR プライマー配列

qRT-PCR		
Gene	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	TCTTTTTCGTCGCCAGCCGAG	TGACCAGGCGCCCAATACGAC
<i>RBM47</i>	CCTCATGATGGACTTTGACG	GCGGATCTCGTAGTTGTTGAG
<i>KEAP1</i>	GTCCCCTACAGCCAAGGTC	GGGGTTCCAGAAGATAAGCA
<i>CUL3</i>	CTTGGAATGATCATCAAACAGC	TGTTGTACATACACACGGTCCA
<i>AKR1C1</i>	GCCTTGGAAGGTCCTGAA	TCTTTTGGGATCACTTCCTCA
<i>ALDH3A1</i>	CGCAGACCTGCACAAGAAT	TGTACTCGATCTCCTCTAGGACGT A
<i>GPX2</i>	CTGGTGGTCCTTGGCTTC	TGTTTCAGGATCTCCTCATTCCTG
<i>SRXN1</i>	GAGCCCAGAAGACACACCTG	AAGAGAATGCACCCCTGCTA
<i>ATP5L</i>	TCAAACAGCTCACAGTTAAGGA A	CTCCGACATAAAACCACATCAA
<i>NDUFS6</i>	AGAAGGTCACGCACACTGG	CTCTTTCTGACGACCTACAAACC
qChIP-PCR		
Gene	Forward	Reverse
<i>GPX2</i>	CATAGATATCAATTGGCCCTTCC	CAGGATGACTTAGCAAAAACAGG T
<i>SRXN1</i>	AATGTTCGGAACGACTCCAG	CAGGGTGAGTCGGCAAAG
<i>HMOX1</i>	CCCTGCTGAGTAATCCTTTCCCG A	ATGTCCCGACTCCAGACTCCA
<i>HBB</i>	GGGCTGAGGGTTTGAAGTCC	CATGGTGTCTGTTTGAGGTTGC

RBM47 の promoter reporter と cDNA の構築

LacZ または TTF-1 を発現するアデノウイルスベクターは、以前研究室で作製したものを用意した。¹⁷ RBM47 の promoter reporter の作製では、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara Bio) と H441 細胞のゲノム DNA を用いて、ヒト RBM47 のプロモーター部位の 5'側に位置する(−1950 to +50 bp)領域を、クローニングした。抽出した 2 セットの PCR 産物と annealing buffer (最終濃度： 10 mM Tris-HCl [pH 7.0]、50 mM NaCl、1 mM EDTA) を混合し、95°Cで変性させ、室温でアニーリングを行い、pGL4.10

(Promega) の HindIII-EcoRI の制限酵素サイトにライゲーションさせた。配列はシーケンシングにより確認した。PCR による増幅に使用したプライマーの組み合わせを以下に示す。

Forward 1: AGCT TACACAGCTAGGAAGTCACCTACAACATCTT

Reverse 1: CATTAAGCATAGCAGATGGGTGATTGCTGGG

Forward 2: TACACAGCTAGGAAGTCACCTACAACATCTT

Reverse 2: AATT CATTAAGCATAGCAGATGGGTGATTGCTGGG

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

H441 細胞を 12-well プレート (Nunc) へ播種し、LacZ と TTF-1 を発現させるアデノウイルスを感染させた。24 時間後、RBM47 のプロモーター領域を含むホタルルシフェラーゼレポーター (RBM47 promoter-Luc)、補正用の CMV プロモーター領域を含むウミシイタケルシフェラーゼレポーター (pGL4.75-SV40-hRluc)、各サンプル間の総 DNA 量を揃えるための pcDNA3 という組み合わせで、FuGENE HD (Promega) を用いて遺伝子導入した。更に 24 時間後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ルシフェラーゼ活性の測定には、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) と Mithras LB-940 (Berthold) を使用して解析した。

SDS-PAGE とウェスタンブロッティング

培養細胞の上清を除去して PBS (-) で洗浄した後、1% NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40、20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、cOmplete™ EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)) により細胞を溶解してタンパク質を回収した。核と細胞質の分画には、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Scientific) を使用し、プロトコルに従い分画を行った。回収したタンパク質は BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) で定量し、SDS sample buffer (170 mM Tris-HCl [pH 8.8]、44% glycerol、8.7% SDS、22 mM 1,4-dithiothreitol、0.05% Bromophenol Blue) にて溶解後、98°Cで 3 分間煮沸して調製した。タンパク質量をそろえたサンプルを SDS-PAGE で分離後、セミドライ法にて Fluoro Trans W Membrane (Pall) に転写した。メンブレンを blocking buffer (5% skim milk (森永)) にて 30 分間室温でインキュベーションした後、一次抗体を加えて室温で 1 時間あるいは 4°Cで一晩インキュベーションした。その後 HRP-標識された二次抗体にて室温で 1 時間のインキュベーションを行った。タンパク質の検出には、LAS-4000 lumino-image analyzer (GE Healthcare) を使用した。

レンチウイルスの作製

A549 細胞に、EF プロモーターにより luciferase と、H1 プロモーターにより shRNA を発現するレンチウイルスを感染させ、luciferase と遺伝子特異的に作用する shRNA の両方を恒常発現する A549-Luc 細胞を樹立した。感染させる luciferase および shRNA を発現させるレンチウイルスは、75 cm² フラスコ (IWAKI) に 7×10⁶ 個の 293FT 細胞を撒くと同時に、発現ベクターとパッケージングベクターをトランスフェクションすることで作製した。パッケージングベクターである pCAG-HIV-gp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev、および negative control (shCT) として使用したプラスミドは、以前研究室で用いたものを使用した。³⁹ また、トランスフェクション試薬には、Lipofectamine 2000 reagent を用いた。トランスフェクションの翌日に培養液を交換し、その 2 日後にウイルス上清を回収した。RBM47 を標的とする shRNA のベクター (shRBM47#1, shRBM47#2) を作製するために使用したプライマーの組み合わせを以下に示す。

shRBM47#1

Forward: GATCCCCGGGCTCAGTATTCCATGTTTCACGTGTGCTGTCCGTGAAACAT
GGAATACTGAGCCC TTTTGGAAAT

Reverse: CTAGATTTCCAAAAAGGGCTCAGTATTCCATGTTTCACGGACAGCACACG
TGAAACATGGAATACTGAGC CCGGG

shRBM47#2

Forward:GATCCCCGGATCTCTCCTTAAGCCAACAACGTGTGCTGTCCGTTGTTGGC

TTAAGGAGAGATCC TTTTGGAAAT

Reverse:CTAGATTTCCAAAAAGGATCTCTCCTTAAGCCAACAACGGACAGCACAC

GTTGTTGGCTTAAGGAGAGAT CCGGG

RNA-seq とデータの解析

cDNA のライブラリーは、RNeasy Mini Kit with On-Column DNase Digestion Set (QIAGEN) を用いて、プロトコルに従い調製した。また、RNA-seq のライブラリー作成には、Dynabeads mRNA DIRECT Purification Kit と、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Scientific) を、cDNA ライブラリーのハイスループットシーケンシングは、Ion PROTON と Ion PI Template OT2 200 Kit v3 と Ion PI Sequencing 200 Kit v3 を用いて、推奨プロトコルに従い行った。RNA-seq によって得られた結果は、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて解析を行った。⁴⁰ 解析には、mRNA の長さが極端に短いものは、ライブラリー作成プロトコル上定量性を失うため、リボソーマルタンパク質を表す RP が接頭の遺伝子とミトコンドリアリボソーマルタンパク質を表す MRP が接頭の遺伝子、および miRNA を除外し、FPKM 値が 10 以上の遺伝子を用いて解析を行

った。

腫瘍の増大速度の解析とイメージング解析

動物実験は東京大学医学部の定める規則に従い行った。4 週齢のオスの Balb/c nude mice に 1.0×10^7 個の A549-Luc-shCT 細胞、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を皮下移植した。腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍の体積を直方体の体積 $= (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ の半分として、腫瘍の体積 $= ((\text{長径}) \times (\text{短径})^2)/2$ を用いて腫瘍の大きさを測定した。肺癌への転移モデルでは、4 週齢のオスの Balb/c nude mice に尾静脈から 3.0×10^7 個の A549-Luc-shCT 細胞と A549-Luc-shRBM47#1 細胞を移植した。マウスのがん細胞の発光イメージングは、D-luciferin potassium salt (Wako Chemicals) を腹腔内に注射後、photon counting (LB983, Berthold Technologies) により行った。

統計解析

t -検定は、*in vitro* の実験での解析に使用した。Mann-Whitney-Wilcoxon test (Mann-Whitney U test) を *in vivo* の実験での解析に使用した (<http://www.r-project.org/>)。いずれも、プログラミング言語 R を使用した。

RIP-seq とデータ解析

A549 細胞を 10 cm プレートに播種し、RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit (Millipore) を用いて、推奨プロトコルに従い RIP assay を行った。キットに付属していた Rabbit control IgG 抗体とラビットポリクローナル抗 SNRNP70 抗体は、コントロールとして使用した。ライブラリーは Ion Total RNA-Seq Kit v2 を用いて、推奨プロトコルに従い RIP サンプルから作製した。cDNA ライブラリーのハイスループットシーケンシングは、Ion PROTON と Ion PI Template OT2 200 Kit v3 と Ion PI Sequencing 200 Kit v3 を用いて、推奨プロトコルに従い行った。シーケンスのリードは、TopHat2 を用いて human reference transcriptome (NCBI Build 37, hg19) に配列させた。免疫沈降された RNA の量は、Cufflinks の cuffdiff を用いて計算した。

フローサイトメトリー

培養細胞にトリプシン処理を行い、培養液で懸濁後、氷上で以下の操作を行った。培養液で懸濁した細胞を PBS (-) で洗浄した後、2% FBS と 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) を含む Hank's balanced salt

solution (HBSS) で懸濁し、細胞濃度が 1.0×10^6 個になるように調製した。これらの細胞に、1–12 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst33342 (Invitrogen) を添加し、37°Cで 60 分間インキュベーションを行った。Fumitremorgin C (FTC) (最終濃度 10 μM) を使用したサンプルでは、Hoechst33342 と共に添加した。その後、氷上で PBS (-) で洗浄し、Propidium iodide (PI) を加えた後、MoFlo Astrios cell sorter (Beckman Coulter) を用いて、細胞分画の解析を行った。作製した細胞の懸濁液は、Forward Scatter (FSC) と Side Scatter (SSC) を用いて分画し、その中で PI 陰性であった細胞分画を抽出した。その後、350 nm の励起波長として UV レーザーを用いて抽出した細胞を励起させ、405/BP30 (Hoechst blue) と 570/BP20 (Hoechst red) の光学フィルターを用いて細胞から 450 nm と 675 nm の蛍光波長を測定した。FTC 存在下で消失する細胞分画を side population (SP) 分画、FTC 存在下で消失しなかった細胞分画を non-side population (non-SP) 分画として定めた。フローサイトメトリーの解析には、Flow Jo software (Treestar, Ashland, OR, USA) を使用した。

フラックスアナライザー

OCR (oxygen consumption ratio)は XF cell mitochondrial stress kit を用いて、Seahorse Biosciences extracellular flux analyzer (XF24) で測定した。A549-Luc-CT 細胞、

A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を 24-well プレート (XFe24 モデル) に 1 ウェルにつき 1.0×10^5 個ずつ播種し、10% FBS を含有した DMEM 培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で 12 時間培養した。また、TGF- β 刺激を加える場合は、A549 細胞を 6-well プレートに 1 ウェルにつき 1.0×10^5 個ずつ播種し、24 時間後 TGF- β を 2.5 ng/ml を加え、24 時間培養した。その後、24-well プレート (XFe24 モデル) に 1 ウェルにつき 1.0×10^5 個ずつ播種し、TGF- β 2.5 ng/ml と 10% FBS を含有した DMEM 培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で 12 時間培養した。培養後、アッセイ培養液 (DMEM (Sigma D5030), 1.85 g/L NaCl, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 mM glucose) に培地を交換し、37°C の CO₂ の管理していない条件下で、30 分間培養した。細胞の基礎呼吸量は、37°C の CO₂ の管理していない条件下で定期的に測定を行った。ATP の産生量は、Oligomycin (最終濃度 1 μ M) を添加した後、基礎呼吸量からの酸素消費量の減少量から測定を行った。最大呼吸量は、Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazine (FCCP) (最終濃度 12 μ M) を添加した後、Antimycin A (最終濃度 1 μ M) を添加することにより減少した酸素消費量から測定を行った。また、Antimycin A を添加した後の酸素消費量を、ミトコンドリアを介さない呼吸により消費された酸素量として測定した。

Accession Numbers

RNA-seq と RIP-seq の生データ及び FPKM と fold-enrichment の結果は、GEO に登録した (GSE61910)。

人権の保護及び法令等の遵守への対応

ヒトの遺伝子解析は本研究計画には含まれていない。この研究で行う予定の遺伝子組み換え実験は、平成 26 年 9 月 11 日の東京大学医学部組換え DNA 実験安全委員会において承認を受けた医学部分子病理学分野の「TGF- β シグナルの機能解析などを目的としたプラスミド・アデノウィルス・レトロウィルス・レンチウィルス・センダイウィルス・バキュロウィルスの培養細胞および遺伝子改変マウス等への導入およびゲノム編集実験」に含まれており、適切な拡散防止措置をとった。この研究で行う予定の動物を用いた移植実験は、実験に先立って動物実験講習を修了し、東京大学医学部の定める規則に従って行った。実際の実験では、適切な指導者の監督のもとに実験を行った。

実験結果

1. 新規 TGF- β 標的因子としての RBM47 の同定

所属する研究室では以前に、マウス乳腺上皮細胞 (NMuMG 細胞) に 24 時間の TGF- β 刺激を加えて EMT を誘導したのち、RNA-seq を用いて遺伝子の発現を網羅的に解析した。⁴¹ また、NMuMG 細胞 に TGF- β 刺激を加えることにより誘導される EMT には、RNA 結合タンパク質の一つである Rbm35b (Esrp2) の発現の減少が関わっていることを示した。⁴² TGF- β によって制御されている Rbm35A (ESRP1) や ESRP2 は、腫瘍の形成能にも関わっていることが知られている。^{43,44} 一方で、TGF- β によって制御される RNA 結合タンパク質のうち、まだ解明されていない腫瘍の形成能に関わる RNA 結合タンパク質が、存在することは否定できない。

そこで始めに、上述の NMuMG 細胞に TGF- β 刺激を加え 24 時間後の RNA-seq データを用いて RNA 結合タンパク質の検索を行った (表 2)。

表 2. TGF- β により発現が変動した RNA 結合タンパク質

Gene Symbol	(-) (FPKM)	TGF- β (FPKM)	fold
Rbm47	19.9	2.9	0.146
Tst	21.0	7.5	0.356
Wdhd1	25.3	9.7	0.383
Dhfr	17.8	7.3	0.407
Ythdc2	9.1	4.1	0.448
Rad51ap1	12.4	5.7	0.460
Synj2	7.2	14.4	2.017
Rbfox2	11.7	24.3	2.068
Ccrn4l	3.0	6.4	2.104
Pcbp4	13.1	27.7	2.123

Mex3d	8.0	17.2	2.143
Rbms2	9.8	24.9	2.548
Mex3b	2.4	7.2	2.972
Adarb1	0.9	10.6	12.378
Esrp2 (Rbm35b)	17.7	11.0	0.621
GO:0003723 (RNA binding) 653 records			

RNA binding のアノテーションがなされている 653 遺伝子について、RNA-seq データ上 NMuMG 細胞で発現が認められ (FPKM 値がいずれのサンプルで 5 以上)、かつ TGF- β 刺激により発現が 2 倍以上変動した遺伝子は 14 因子あった。このうち、Rbm47 は TGF- β 刺激により最も発現の減少した RNA 結合タンパク質であることが分かった。前述の Esrp2 の発現変動は 0.621 倍であることから、Rbm47 の発現変化の重要性が示唆される。RBM47 は、約 80 アミノ酸からなる RNA recognition motifs (RRM) を 3 つ有する RNA 結合タンパク質である。ヒト RBM47 には、N 末端側に RRM 領域 と、C 末端側に alanine-rich 領域を有しており、ラット、マウス、オラウータン、イヌにおいても、アミノ酸配列は保存されている (図 5A)。RBM47 は、核内に主に存在すると報告されてきた。^{45,46} しかし、本実験で内因性の RBM47 と強制発現させた RBM47 の局在をそれぞれ評価した結果、核と細胞質の両方に RBM47 の発現が観察された。また、主に細胞質内の RBM47 が TGF- β 刺激によって抑制されることが分かった (図 5B, C)。RBM47 が TGF- β 刺激によって細胞質でおもに減少した理由は、本研究では明らかにできなかったため、今後の検討が必要である。

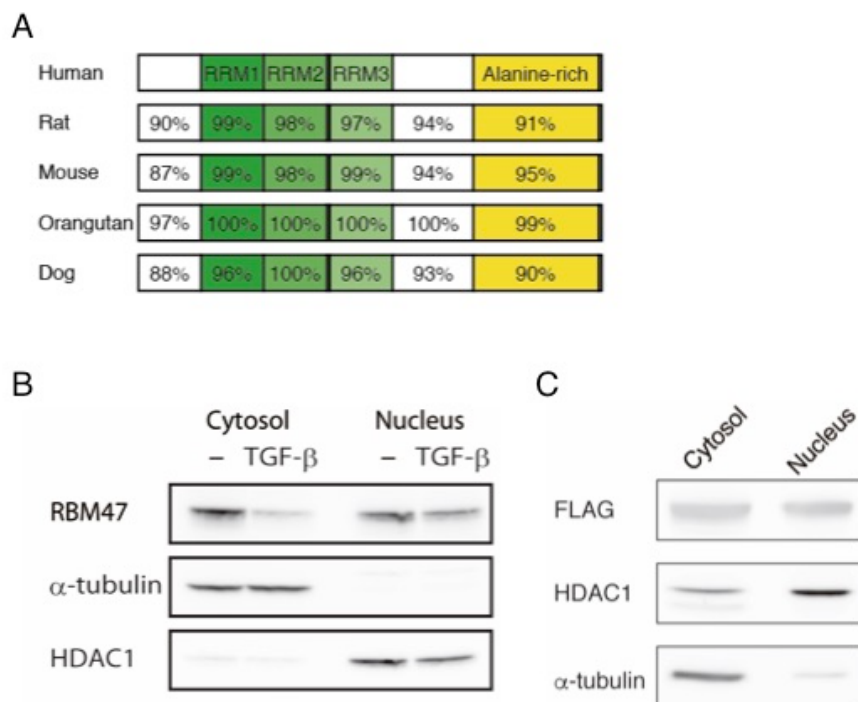


図 5. RBM47 のアミノ酸配列の相同性と RBM47 の局在

- (A) RBM47 は N 末端側に、RNA Recognition Motif (RRM) を 3 つ有しており、C 末端側に alanine-rich の配列を有する。
- (B) H441 細胞からタンパク質を回収し、細胞質に含まれるタンパク質と核に含まれるタンパク質に分画した。ウェスタンブロッティングにより、細胞質と核の分画に含まれる RBM47 の発現量を調べた。 α -tubulin は細胞質のコントロールとして、HDAC1 は核のコントロールとして使用した。
- (C) FLAG-RBM47 を挿入した pcDNA3 ベクターを遺伝子導入した HEK293T 細胞からタンパク質を回収し、細胞質に含まれるタンパク質と核に含まれるタンパク質に分画した。ウェスタンブロッティングにより、細胞質と核の分画に含まれる RBM47 の発現量を調べた。 α -tubulin は細胞質のコントロールとして、HDAC1 は核のコントロールとして使用した。

次に、22 個の正常細胞、癌細胞を含む細胞株の 1st strand cDNA パネルを用いて、

RBM47 の発現の違いについて評価した。定量的 RT-PCR により RBM47 の mRNA の

発現量を測定した結果、RBM47 は肺腺癌細胞 (A549 細胞, H441 細胞)、乳癌細胞 (MCF7 細胞, MDA-MB-231 細胞)、胃癌細胞 (MKN 細胞, OCUM 細胞)で比較的高く発現することが分かった (図 6A)。そこで、オンライン上の発現マイクロアレイのメタアナリシス解析ツールを用いて、肺癌 (肺腺癌)、乳癌、胃癌の症例で、RBM47 の発現と予後との関係について評価した結果、RBM47 の高発現が患者の予後良好に有意に相関することが分かった (図 6B)。^{47,48} また、多変量解析の結果、RBM47 の発現は独立した患者の予後規定因子であった (表 3)。

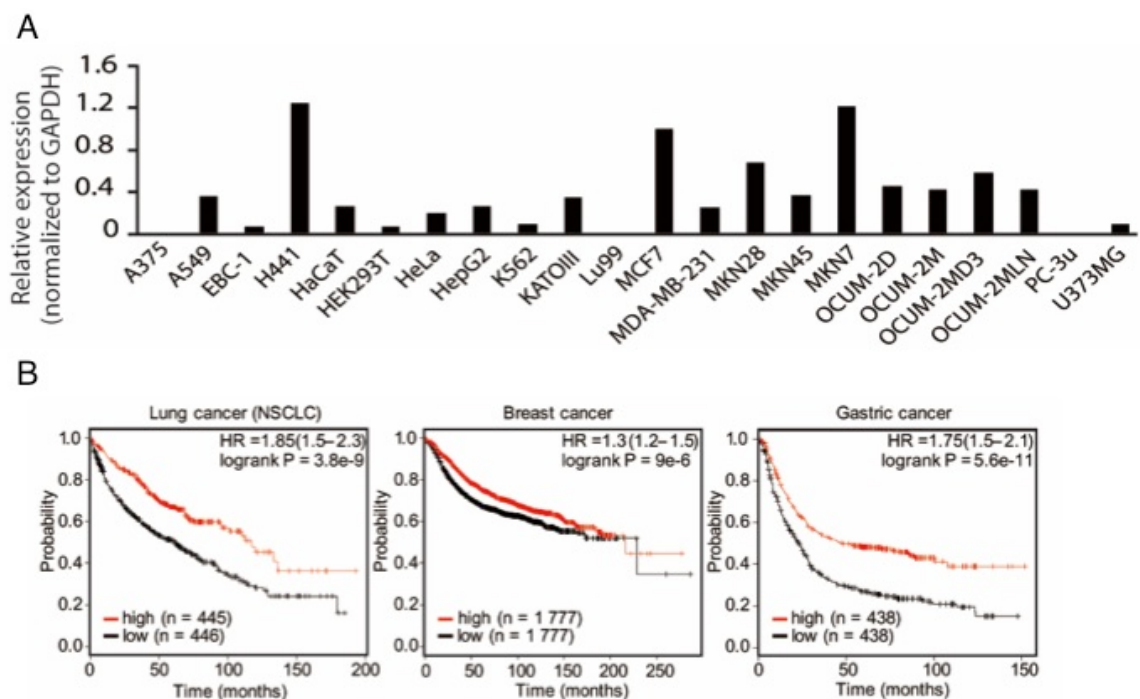


図 6. 癌細胞株・正常細胞株における RBM47 の発現および予後との関係

(A) 22 種類の癌細胞株・正常細胞株から mRNA を回収し、定量的 PCR により RBM47 の mRNA の発現量を調べた。A549 細胞、H441 細胞は肺腺癌細胞株、MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞は乳癌細胞、MKN 細胞、OCUM 細胞は胃癌細胞株であ

る。

(B) RBM47 の発現量に基づいた肺腺癌患者 (左図)、乳癌患者 (中央図)、胃癌患者 (右図) の生存率を Kaplan-Meier 法にて解析した。2 群間の差は Log-rank test により検定した。

表 3. 肺癌及び乳癌における多変量解析の結果

Gene Symbol		P value	Hazard Ratio
Lung cancer	Histology	0.0077	1.31 (1.07 - 1.59)
	Stage	0	1.5 (1.31 - 1.71)
	RBM47	0.0127	0.73 (0.57 - 0.93)
Breast cancer	ESR1	0	0.64 (0.56 - 0.74)
	HER2 (ERBB2)	0.0001	1.32 (1.15 - 1.52)
	RBM47	0.0813	0.9 (0.79 - 1.01)

2. TGF- β と TTF-1 による RBM47 の発現制御

A549 細胞や H441 細胞に TGF- β 刺激を加え24時間後、RBM47 の発現変化を評価した。定量的 RT-PCR とウェスタンブロッティングにより RBM47 の発現量を測定した結果、A549 細胞や H441 細胞に TGF- β 刺激を加えると、RBM47 の発現が減少することが観察された (図 7A, B)。このことから、NMuMG 細胞と同様に、A549 細胞、H441 細胞においても RBM47 の発現が TGF- β によって抑制されることが分かった。次に、Isogaya らによって発表された、H441 細胞における抗 Smad3 抗体を用いた ChIP-seq のデータを解析した。³⁸ Control siRNA を導入した H441 細胞と TTF-1 を標的とする siRNA (siTTF-1) を導入した H441 細胞における Smad3 の結合部位を網羅的に解析した結果、どちらの細胞においても RBM47 の転写開始点において、有意なシグナルピ

ークが観察された (図 7C)。Isogaya らの報告により、TTF-1 を標的とする siRNA (siTTF-1) を導入することで、Smad の結合が増強する領域があることが明らかになったが、RBM47 の転写開始点付近においては、Smad の結合能は亢進されなかった。

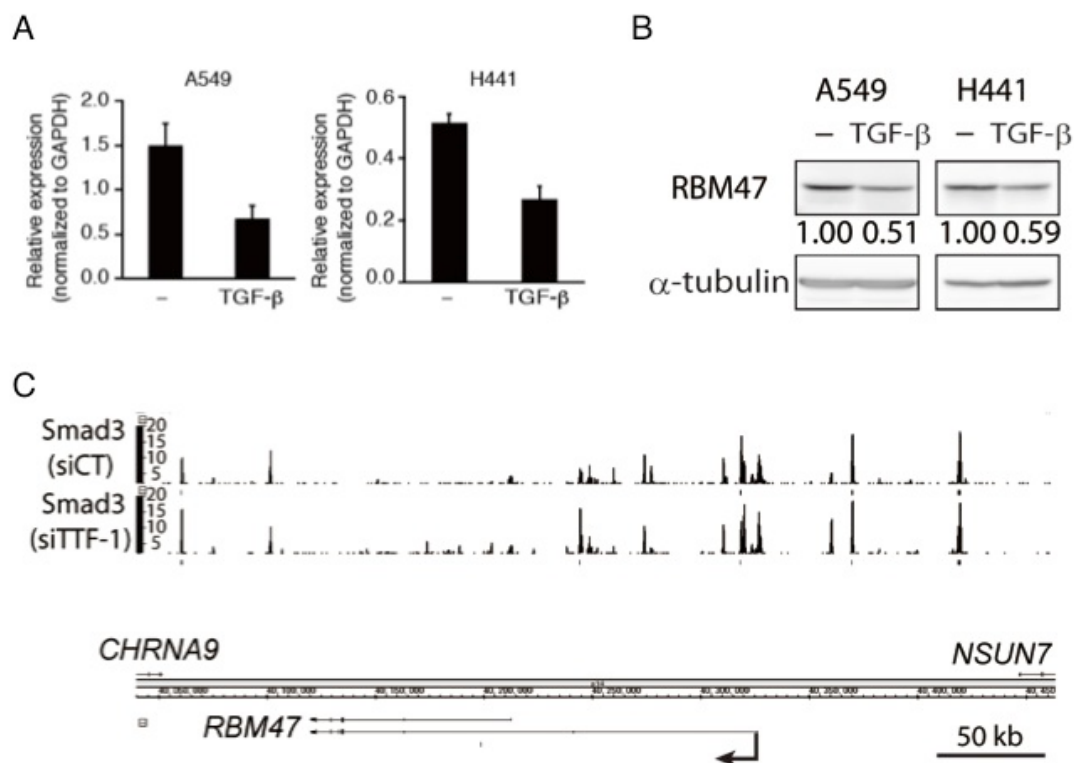


図 7. 肺腺癌細胞株での TGF-β による RBM47 の発現変化と Smad3 の結合部位

- (A) A549 細胞と H441 細胞に 2.5 ng/ml の TGF-β 刺激を加え 24 時間後、定量的 PCR により RBM47 の mRNA の発現量を解析した。補正は GAPDH を使用した。エラーバーは標準偏差を示す。
- (B) A549 細胞と H441 細胞に 2.5 ng/ml の TGF-β 刺激を加え 24 時間後、ウェスタンブロッティングにより RBM47 のタンパク質の発現量を解析した。α-tubulin はコントロールとして使用した。ImageJ を用いて定量し、無刺激のサンプルの値を 1.00 と定めたときの相対値を下に示す。
- (C) TTF-1 を標的とする siRNA (siTTF-1) またはコントロール siRNA (siCT) を導入した H441 細胞に 1.0 ng/ml の TGF-β 刺激を加え 24 時間後、細胞を固定し、抗 Smad3 抗体により ChIP-seq を行った。RBM47 遺伝子座近傍のシグナルピークを示す。

近年の研究から、肺腺癌において転写因子 TTF-1 が癌促進因子としての働きと、^{15,16} 癌抑制因子としての働きの両方があることがわかり、¹⁷ 癌の予後に関わる転写因子として着目されている。そこで、TTF-1 と RBM47 との関係について評価した。RBM47 のプロモーターへの TTF-1 の結合を評価するため、Isogaya らによって発表された H441 細胞における抗 TTF-1 抗体を用いた ChIP-seq のデータを解析した。³⁸ TTF-1 の結合部位を網羅的に解析した結果、RBM47 の転写開始点において、有意なシグナルピークが観察された (図 8A)。また、RBM47 の転写開始点付近 (+700 bp ~ +704 bp、+1110 bp ~ +1114 bp) において、TTF-1 の結合モチーフ AAGTG が存在した。³⁸ そこで、H441 細胞において TTF-1 を knockdown し、RBM47 の発現変化を評価した。ウェスタンブロッティングにより TTF-1 と RBM47 の発現量を測定した結果、TTF-1 の発現量が減少することで RBM47 の発現量が減少することが観察された (図 8B)。また、定量的 RT-PCR により測定した結果、TGF- β 刺激による TTF-1 の発現量の顕著な変化は観察されなかった。次に、TTF-1 の有意なシグナルピークを含む RBM47 の転写開始点付近 -1950 bp ~ +50 bp をクローニングし、pGL4.10 ベクターに導入した (RBM47 promoter-Luc)。そして、LacZ または TTF-1 を強制発現するアデノウイルスを感染させた A549 細胞に遺伝子導入し、luciferase の活性を評価した結果、TTF-1 を強制発現

するアデノウイルスを感染させた A549 細胞では、RBM47 のプロモーター活性の増加が観察された (図 8C)。以上のことから、TTF-1 が RBM47 の promoter 付近に結合し、RBM47 の発現を促進させることが示唆された。

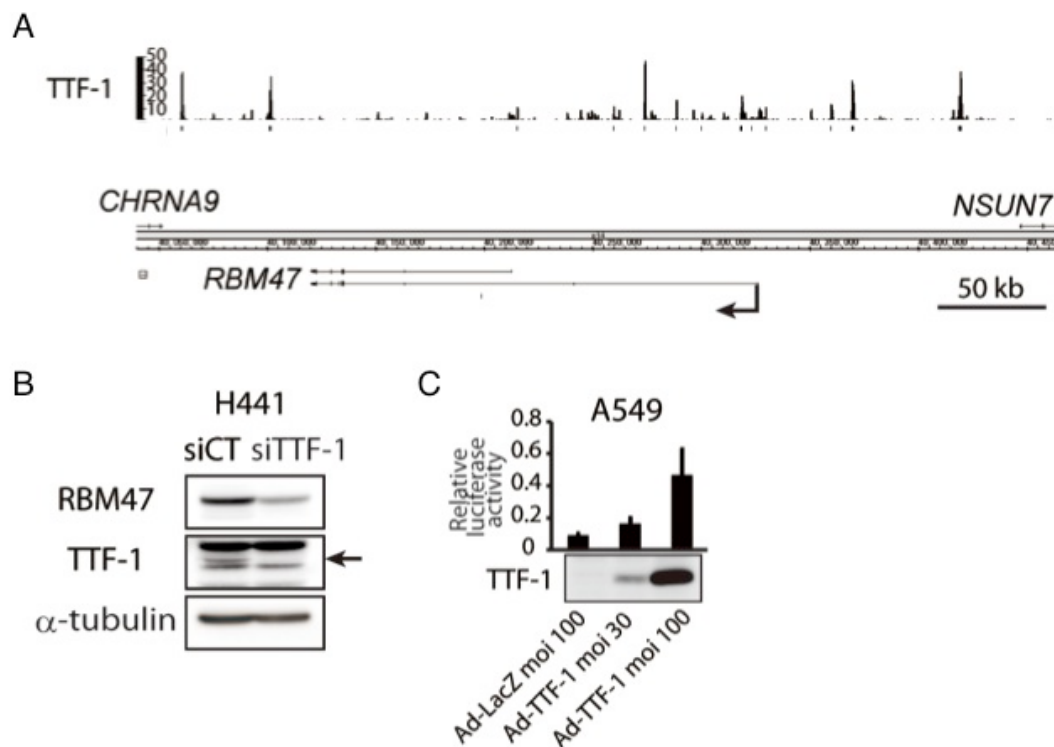


図 8. 肺腺癌細胞株での TTF-1 による RBM47 の発現変化と TTF-1 の結合部位
 (A) H441 細胞を固定し、抗 TTF-1 抗体により ChIP-seq を行った。RBM47 遺伝子座でのシグナルピークを示す。
 (B) TTF-1 を標的とする siRNA (siTTF-1) またはコントロール siRNA (siCT) を導入した H441 細胞からタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングにより RBM47 の発現量を調べた。 α -tubulin はコントロールとして使用した。
 (C) FLAG-LacZ または FLAG-TTF-1 を強制発現するアデノウイルスを感染させた A549 細胞に RBM47 promoter-Luc を遺伝子導入し、48 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。エラーバーは、標準偏差を示す。また、ウェスタンブロッティングにより、FLAG-LacZ (Ad-LacZ) または FLAG-TTF-1 (Ad-TTF-1) を強制発現するアデノウイルスを感染させた

A549 細胞での、TTF-1 の発現量を評価した。

3. RBM47 発現恒常欠損株の作製と RBM47 の機能の解析

RBM47 の機能を調べるため、RBM47 を恒常的に knockdown させた細胞株の樹立を試みた。最初に、luciferase を発現するレンチウイルスを作製し、A549 細胞に感染させ、luciferase を恒常的に発現する A549 細胞 (A549-Luc 細胞) を作製した。次に、2 種類の異なる RBM47 の配列を標的とする shRNA (shRBM47#1, shRBM47#2) およびコントロールを発現するレンチウイルスを作製し、A549-Luc 細胞に感染させ、RBM47 を恒常的に knockdown させた A549 細胞 (A549-Luc-shCT 細胞、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞) を作製した。ウェスタンブロッティングにより RBM47 の発現量を測定した結果、A549-Luc-shCT 細胞に比べ A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞における RBM47 の発現量の減少が観察された (図 9A)。従って、shRNA により高い knockdown 効率で、RBM47 の発現が抑制されたことが分かった。次に、RNA-seq により、A549-Luc-shCT 細胞に比べ A549-Luc-shRBM47#1 細胞において変化した遺伝子を網羅的に解析した。解析に使用した遺伝子発現データは、A549-Luc-shCT 細胞と A549-Luc-shRBM47#1 細胞のサンプル比較において fragments per kilobases of exon per million sequence read (FPKM) 値が 10 以上のものを使用した。TGF- β 非存在下のデータを用いて、GSEA によりオントロ

ジー解析を行った結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞で増加した遺伝子のうち、Nrf2 の直接の標的遺伝子群が、GSEA の Molecular Signatures Database (MSigDB) に C6: oncogenic signatures として登録されている遺伝子セット中で 2 番目に normalized enrichment score (NES) の高い癌関連の遺伝子群であることが分かった (図 9B, 表 4)。

⁴⁹ これらの Nrf2 の標的遺伝子には、aldo-keto reductase family 1, member C1 (AKR1C1)、aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1 (ALDH3A1)、glutathione peroxidase 2 (GPX2)、sulfiredoxin 1 (SRXN1) が含まれている。定量的 RT-PCR によりこれらの因子の mRNA の発現量を測定した結果、TGF- β 非存在下の A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞で、mRNA が増加することが観察された (図 9C)。

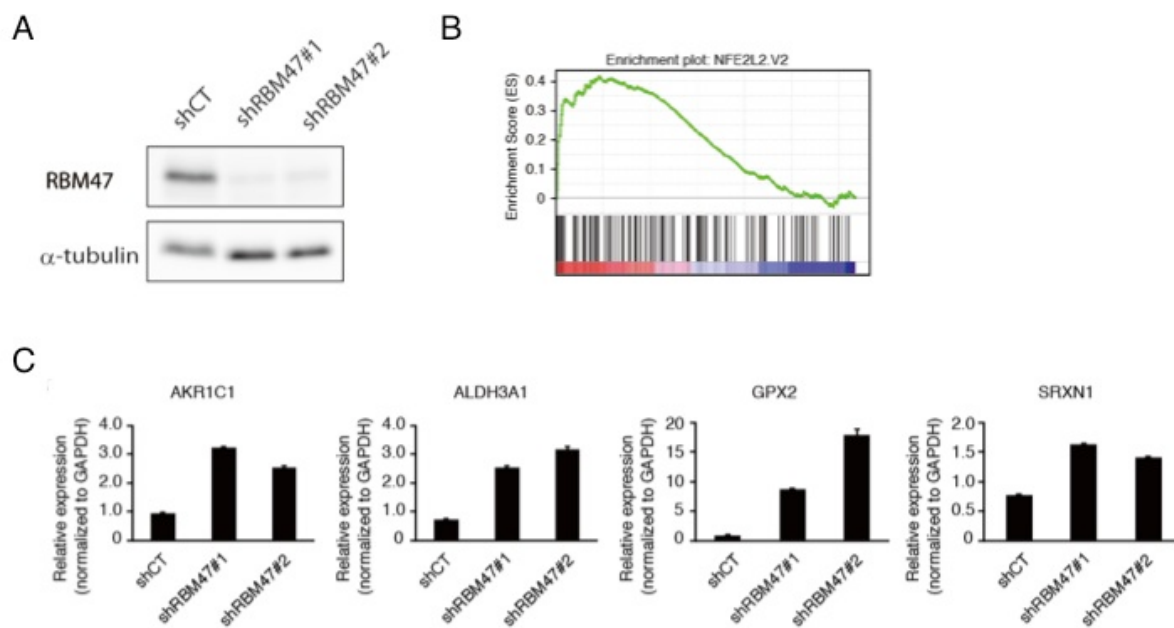


図 9. RBM47 の knockdown による Nrf2 の標的遺伝子の発現変化

(A) Negative Control を導入した A549 細胞 (shCT : A549-Luc-shCT 細胞)、RBM47

を標的とする shRNA を導入した A549 細胞 (shRBM47#1 : A549-Luc-shRBM47#1 細胞、shRBM47#2 : A549-Luc-shRBM47#2 細胞) からタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングにより、RBM47 のタンパク質の発現量を調べた。 α -tubulin はコントロールとして使用した。

(B) RNA-seq で得られた結果を GSEA によりオントロジー解析を行った結果を示す。NFE2L2 (Nrf2) の標的遺伝子の enrichment plot を示す。

(C) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) から RNA を回収し、定量的 PCR により Nrf2 の標的遺伝子である AKR1C1、ALDH3A1、GPX2、SRXN1 の mRNA の発現量を調べた。補正は GAPDH を使用した。エラーバーは標準偏差を示す。

表 4. RBM47 を knockdown した細胞で発現が増加した遺伝子群

Name	size	NES	FDR q-val
CSR_LATE_UP.V1_DN	52	2.02	0.0053
NFE2L2.V2	142	1.85	0.0360
MEK_UP.V1_UP	99	1.83	0.0358
MEL18_DN.V1_UP	60	1.72	0.0735
AKT_UP.V1_UP	66	1.72	0.0646
RB_P130_DN.V1_UP	59	1.69	0.0705
STK33_SKM_UP	73	1.59	0.0955
ESC_V6.5_UP_LATE.V1_UP	64	1.59	0.0918
ERB2_UP.V1_UP	84	1.56	0.0870
ATF2_UP.V1_DN	50	1.56	0.0834
P53_DN.V1_DN	69	1.54	0.0965
ESC_J1_UP_EARLY.V1_DN	75	1.52	0.1044
PRC2_EDD_UP.V1_UP	101	1.52	0.1045
EGFR_UP.V1_UP	92	1.51	0.1053
BMI1_DN.V1_UP	64	1.50	0.1082
ESC_J1_UP_LATE.V1_DN	76	1.50	0.1054

次に、RNA-seq の結果から A549-Luc-shCT 細胞に比べ、A549-Luc-shRBM47#1 細胞において 2 倍以上変化した遺伝子と、TGF- β 刺激を加えた A549-Luc-shCT 細胞において 2 倍以上変化した遺伝子の相関性について検討を行った (図 10A)。まず、RBM47 の knockdown により 2 倍以上減少し、TGF- β 刺激で 2 倍以上減少した遺伝子が 146

因子あり、RBM47 の knockdown により 2 倍以上増加し、TGF- β 刺激で 2 倍以上増加した遺伝子が 215 因子あった。また、RBM47 の knockdown により 2 倍以上減少し、TGF- β 刺激で 2 倍以上増加した遺伝子が 48 因子あり、RBM47 の knockdown により 2 倍以上増加し、TGF- β 刺激で 2 倍以上減少した遺伝子が 68 因子あった。更に、RBM47 の knockdown により 2 倍以上増加し、TGF- β 刺激で 2 倍以上増加した遺伝子 215 因子の中には、Nrf2 を制御する Maf family の因子も含まれていた。GSEA によりオンロジー解析を行った遺伝子のうち、2 番目に高い癌の遺伝子群である Nrf2 の標的遺伝子は、RBM47 の knockdown により 2 倍以上増加し、TGF- β 刺激で 2 倍以上増加した遺伝子 215 因子のうち 3 因子が含まれていた一方で、RBM47 の knockdown により 2 倍以上増加し、TGF- β 刺激で 2 倍以上減少した遺伝子である 68 因子のうち、9 因子が含まれることが分かった。更に、EMT を制御する因子として知られている Snail や Slug の発現量を定量的 RT-PCR により測定した結果、TGF- β 刺激により Snail と Slug の mRNA の発現量は増加したが、RBM47 の knockdown により、TGF- β 刺激による Snail と Slug の mRNA の発現量の増加がむしろ抑えられることが分かった (図 10B)。

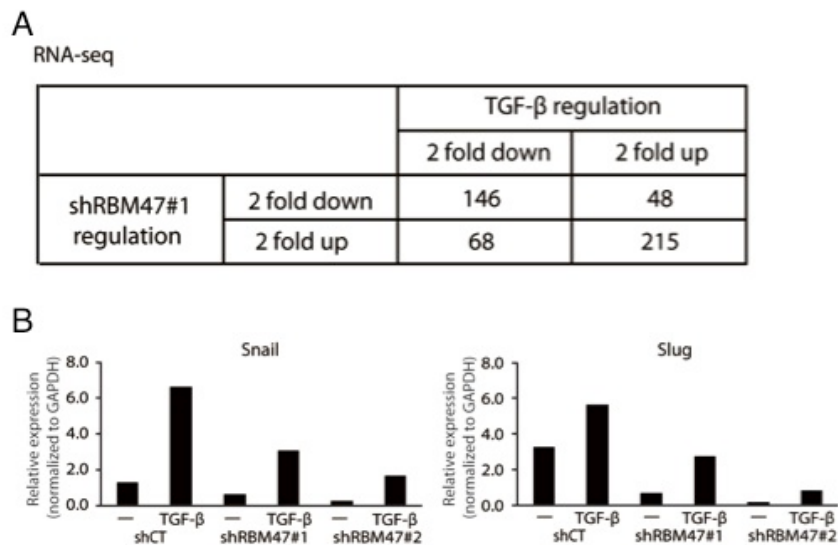


図 10. RBM47 を knockdown した細胞の遺伝子の変動と TGF- β 刺激を加えた細胞の遺伝子の変動の関係の評価

- (A) A549-Luc-shCT 細胞と A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1) にそれぞれに TGF- β 刺激を加え、24 時間後に RNA を回収し、RNA-seq により mRNA の発現量の変化を網羅的に解析した。A549-Luc-shCT 細胞に比べ、A549-Luc-shRBM47#1 細胞で発現が 2 倍以上変動した遺伝子数と、A549-Luc-shCT 細胞に TGF- β 刺激を加えたとき、発現が 2 倍以上変動した遺伝子数の関係を表で示した。
- (B) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) それぞれに TGF- β 刺激を加え、24 時間後に mRNA を回収し、RT-PCR により Snail と Slug の mRNA の発現量を測定した。補正は GAPDH を使用した。

本研究では、オントロジー解析で上位に位置した RBM47 の Nrf2 を制御する因子に対する作用機構について検討した。RNA immunoprecipitation (RIP) により、A549 細胞の全 RNA から RBM47 に結合する内因性の RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、RIP で抽出した RNA を定量した (RIP-seq)。RNA-seq の解析から、TGF- β 刺激

を加えていない A549-Luc-shCT 細胞で FPKM 値が 10 以上の遺伝子は 5730 因子あり、このうち、rabbit IgG に対し RBM47 抗体を用いた RIP サンプルで 4 倍以上の fold enrichment を示した遺伝子は 165 因子あった。既知の Nrf2 を制御する因子である Nrf2、KEAP1、CUL3、RBX1、p21/CDKN1A、small Mafs について着目して RIP-seq のデータを解析した結果、RBM47 は KEAP1 と CUL3 mRNA への結合は観察されたが、その他の因子の mRNA への結合は観察されなかった (図 11)。

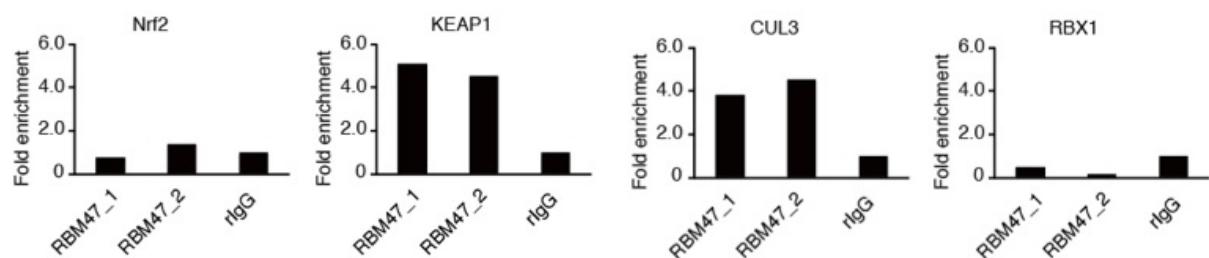


図 11. RBM47 に結合した Nrf2、KEAP1、CUL3、RBX1 の mRNA の結合量の評価

A549 細胞から RNA を回収し、抗 RBM47 抗体を用いて RBM47 に対する RIP を行った。RIP により抽出した RNA を、deep sequencing により同定・定量した。RBM47 に結合した Nrf2、KEAP1、CUL3、RBX1 の mRNA 量を示す。RBM47 の抗体を用いた RIP は、biological replicates として 2 サンプル用意した (RBM47_1, RBM47_2)。コントロールとして、ラビット IgG 抗体を使用した。

以上から、本研究では、RBM47 が KEAP1 と CUL3 の mRNA に結合することに着目した。定量的 RT-PCR により KEAP1 と CUL3 の mRNA の発現量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞では KEAP1 の mRNA の発現量の増加が観察され、

A549-Luc-shRBM47#2 細胞では KEAP1 の mRNA の発現量に変化は観察されなかった (図 12A)。また、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞において、CUL3 の mRNA の発現量に変化は観察されなかった (図 12A)。次に、Actinomycin D により mRNA の合成を阻害し、KEAP1 と CUL3 の mRNA の半減期について、定量的 RT-PCR により評価を行った。A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞に Actinomycin D を加えてから 3 時間後と 6 時間後では KEAP1 の mRNA の検出量は減少し、Actinomycin D を加えて 12 時間後では KEAP1 の mRNA の検出量に変化は観察されなかった (図 12B)。また、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞に Actinomycin D を加えて 3 時間後では CUL3 の mRNA の検出量に変化は観察されず、Actinomycin D を加えて 6 時間後と 12 時間後では CUL3 の mRNA の検出量は僅かに減少した (図 12B)。次に、ウェスタンブロッティングにより KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞において、KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現量が減少することが観察された (図 12C)。また、ウェスタンブロッティングにより同じ条件のサンプルで Nrf2 のタンパク質の発現量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞において、Nrf2 のタンパク質の発現量に変化は観察されなかった (図 12D)。これまで、A549 細胞は、KEAP1 に変異があり、Nrf2 タンパク質が

安定化することが分かっている。²⁴ しかし、KEAP1 に変異があっても、Nrf2 への結合が維持され、通常のプロテアソームの分解とは独立して、Nrf2 の活性を抑制するということが報告されている。⁵⁰ 従って、RBM47 は KEAP1 と CUL3 の mRNA に結合し、KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現を促進することで、Nrf2 の活性を抑制した可能性が示唆された。

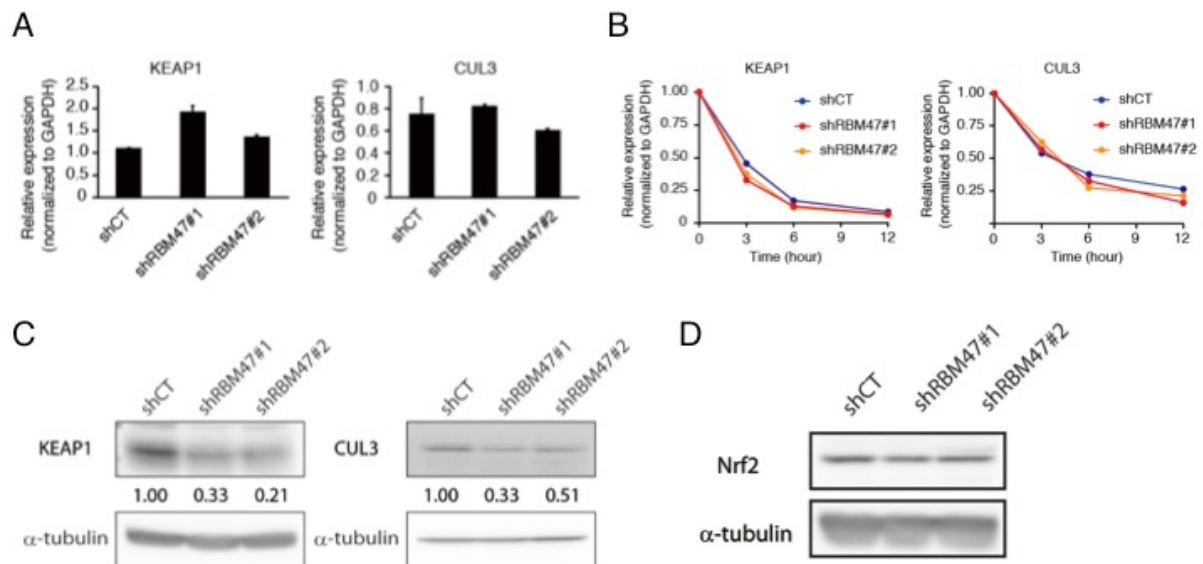


図 12. RBM47 の knockdown による KEAP1、CUL3 の発現変化

- (A) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) から RNA を回収し、定量的 PCR により KEAP1, CUL3 の mRNA の発現量を調べた。補正は GAPDH を使用した。エラーバーは標準偏差を示す。
- (B) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) に Actinomycin D を添加し、添加する前と添加してから 3、6、12 時間後の細胞から RNA を回収し、定量的 PCR により KEAP1, CUL3 の mRNA の発現量の変化を調べた。
- (C) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) からタンパク質を回収し、ウェスタン

ブロッキングにより KEAP1, CUL3 のタンパク質の発現量を調べた。α-tubulin はコントロールとして使用した。ImageJ を用いてバンドの大きさを定量し、shCT の値を 1.00 と定めたときの相対値を下に示す。

(D) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) からタンパク質を回収し、ウェスタンブロッキングにより Nrf2 のタンパク質の発現量を調べた。α-tubulin はコントロールとして使用した。

そこで、Nrf2 の標的遺伝子転写調節領域に存在する ARE 部位に対する結合能を測定した。まず、RNA-seq により RBM47 shRNA による標的遺伝子の発現量の変化を解析した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞において、Nrf2 の既知の直接の標的遺伝子である GPX2、SRXN1、HMOX1 の mRNA が増加することが観察された。^{51,52} 次に、抗 Nrf2 抗体を用いて ChIP-qPCR により GPX2 と SRXN1 の 5'プロモーターの ARE 部位に対する結合能を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞において、Nrf2 の結合能が増加することが観察された。しかし、HMOX1 の 5'プロモーターの ARE 部位に対する結合能を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞において、Nrf2 の結合能に変化は観察されなかった (図 13A)。次に、RBM47 の siRNA を遺伝子導入した H441 細胞でも A549 細胞と同様の実験を行った。抗 Nrf2 抗体を用いて ChIP-qPCR により、GPX2 と HMOX1 の 5'プロモーターの ARE 部位に対する結合能を測定した結果、RBM47 の siRNA を遺伝子導入した H441 細胞において、Nrf2 の結合能が増加することが観察された (図 13B)。

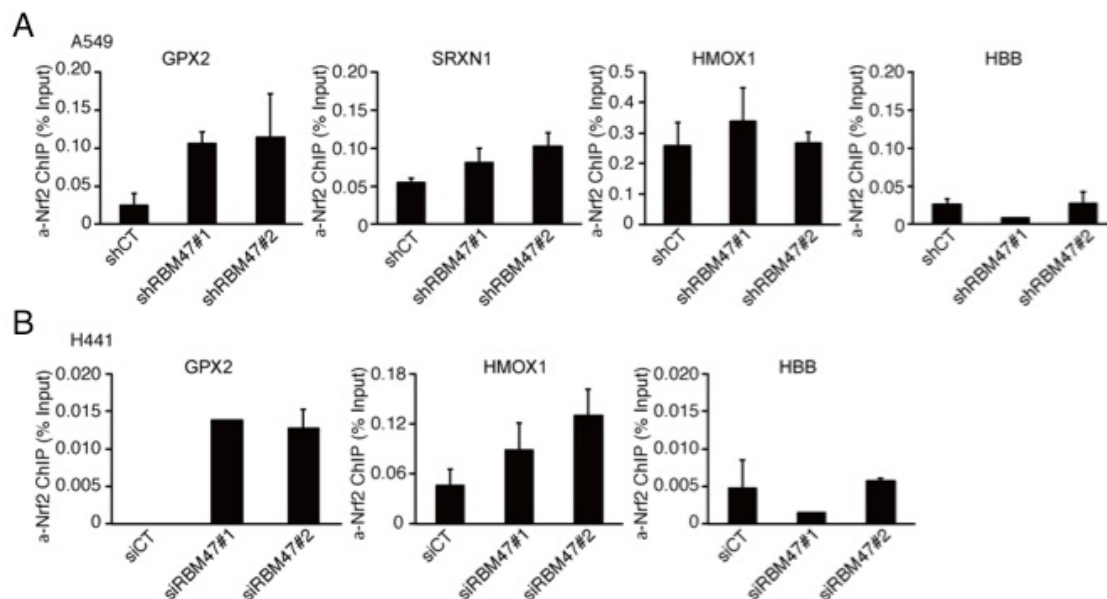


図 13. RBM47 の knockdown による Nrf2 のゲノムに対する結合能の変化

- (A) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) を固定し、抗 Nrf2 抗体により ChIP を行い、GPX2, HMOX1, HBB の転写開始点付近のゲノム遺伝子の増幅を行うプライマーを用いて PCR を行なった。HBB はコントロールとして使用した。
- (B) コントロール (siCT) あるいは RBM47 (siRBM47#1, #2) を標的とする siRNA を導入した H441 細胞を固定し、抗 Nrf2 抗体により ChIP を行い、GPX2, HMOX1, HBB の転写開始点付近のゲノム遺伝子の増幅を行うプライマーを用いて PCR を行なった。HBB はコントロールとして使用した。

以上の結果、RBM47 は Nrf2 の制御因子である KEAP1, CUL3 の mRNA に結合することが分かった。また、RBM47 の knockdown により、KEAP1, CUL3 のタンパク質の発現量が減少し、Nrf2 の標的遺伝子の ARE 部位への結合能が増加することが分かった。このことから、RBM47 は KEAP1 や CUL3 の mRNA に直接結合し、KEAP1 と CUL3 の発現を促進することで、Nrf2 の標的遺伝子への結合を抑制し、Nrf2 の活性を抑制したことが示唆される。

次に、Nrf2, KEAP1, CUL3, RBX1 以外の Nrf2 の制御因子である p21/CDKN1A と MafK の発現に対する RBM47 の作用機構について評価を行った。RIP-seq の解析から RBM47 は p21/CDKN1A と MafK の mRNA には結合していなかった。一方、RNA-seq のデータから p21/CDKN1A と MafK の mRNA の発現量を解析した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞において、p21/CDKN1A と MafK の mRNA の発現量の増加が観察された。TGF- β は、p21/CDKN1A と MafK の発現を増加させることが知られており、^{28,53} 本研究においても、RBM47 の非存在下で、A549-Luc 細胞に TGF- β 刺激を加えることにより、p21/CDKN1A と MafK の mRNA の発現量が増加することが観察された (図 14)。従って、RBM47 は p21/CDKN1A や MafK の mRNA には結合しないものの、間接的に p21/CDKN1A や MafK の発現量を抑制することが考えられる。以上から、RBM47 は KEAP1、CUL3 のタンパク質の発現を促進させ、p21/CDKN1A、MafK の発現を抑制することで、Nrf2 の活性を複合的に阻害する可能性が示唆された。

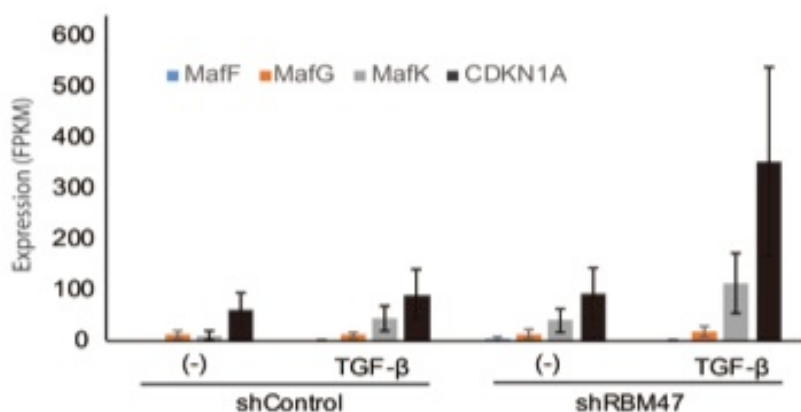


図 14. RBM47 の knockdown と TGF- β 刺激による Maf family 因子と p21/CDKN1A

の mRNA の発現量の変化

RNA-seq のデータから、RBM47 の knockdown による Maf family 因子 (MafF, MafG, MafK) と p21/CDKN1A の mRNA の発現量の変化を評価した。エラーバーは標準偏差を示す。

次に、RBM47 が結合した Nrf2 の活性制御因子以外の因子の mRNA について着目した。RIP-seq の解析から、RBM47 は ATP5L や NDUFS6 といった細胞内代謝に関わる因子の mRNA に結合することが分かった (図 15A)。定量的 RT-PCR により ATP5L と NDUFS6 の mRNA 量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞では ATP5L の mRNA の発現量が増加し、A549-Luc-shRBM47#2 細胞では ATP5L の mRNA の発現量に変化は観察されなかった。また、A549-Luc-shRBM47#1 細胞では NDUFS6 の mRNA の発現量は増加し、A549-Luc-shRBM47#2 細胞では NDUFS6 の mRNA の発現量に変化は観察されなかった (図 15B)。次に、ウェスタンブロッティングにより ATP5L と NDUFS6 のタンパク質の発現量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞において、ATP5L と NDUFS6 のタンパク質の発現量の僅かな増加が観察された (図 15C)。

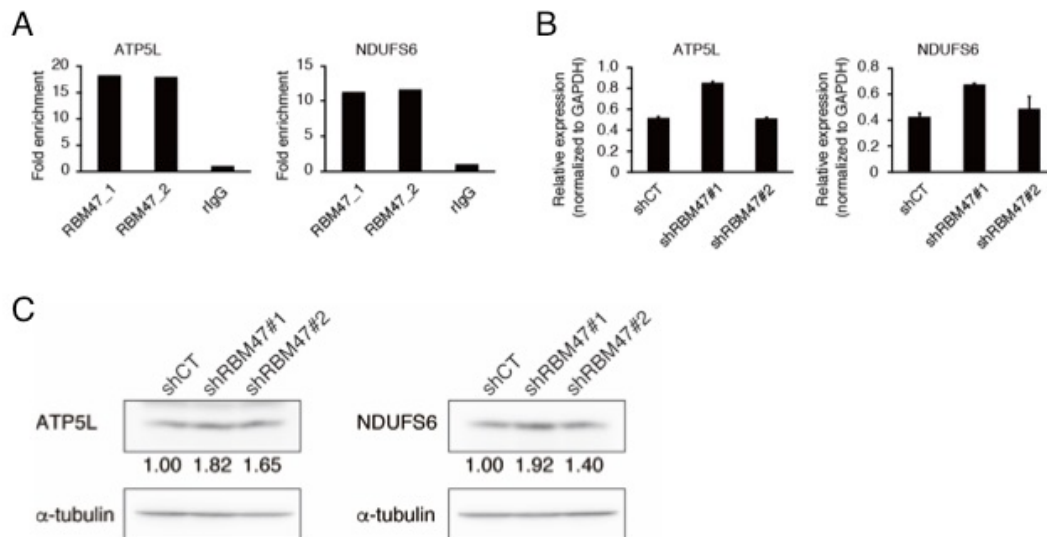


図 15. RBM47 に結合した ATP5L、NDUFS6 の mRNA の結合量 と RBM47 の knockdown による ATP5L、NDUFS6 の発現変化

- (A) A549 細胞から RNA を回収し、抗 RBM47 抗体を用いて RBM47 に対する RIP を行った。RIP により抽出した RNA を、deep sequencing を用いて定量した。RBM47 に結合した ATP5L、NDUFS6 の mRNA 量を示す。RBM47 の抗体を用いた RIP は、2 サンプル用意した (RBM47_1, RBM47_2)。コントロールとして、ラビット IgG 抗体を使用した。
- (B) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) から mRNA を回収し、RT-PCR により ATP5L と NDUFS6 の mRNA の発現量を測定した。補正は GAPDH を使用した。
- (C) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) からタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングにより ATP5L と NDUFS6 のタンパク質の発現量を測定した。 α -tubulin はコントロールとして使用した。ImageJ を用いて定量し、shCT の値を 1.00 と定めたときの相対値を下に示す。

次に、RNA-seq により、RBM47 の knockdown により発現が変化した Nrf2 の標的遺伝子

以外の因子を網羅的に解析した結果、RBM47 の knockdown により EGF の下流因子の発

現が亢進することが分かった。Nrf2 と EGF の下流因子には類似する因子が多くあり、シグナ

ルが互いにクロストークすることが考えられている。また、RBM47 は Wnt シグナルに関わる
ことが報告されている。⁴⁶ 以上の報告から、本研究の結果と合わせ、RBM47 は複数の経路に
渡って作用することが示唆される。

4. RBM47 の細胞酸素消費量と side population 比率に対する影響

RBM47 の knockdown によって増加した Nrf2 の標的遺伝子には、細胞の呼吸代謝に
対して重要な因子が含まれていることが知られている。⁵⁴ そこで、細胞の培養液中に
含まれる酸素の消費量 (OCR) を測定することにより、RBM47 の細胞の代謝に対する
影響を検討した。Mito stress test のプロトコルに従って、A549-Luc-shCT 細胞と
A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞の酸素消費量を測定した (図
16A)。Oligomycin を添加する前の酸素消費量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1
細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞では、酸素消費量が顕著に増加することが観察され
た (図 16B)。従って、RBM47 の knockdown により、A549 細胞の基礎呼吸が促進する
ことが分かった。また、Oligomycin を添加し、次の測定点までの酸素消費量の減少量
を比較した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞では、酸素
消費量の減少量が増加することが観察された。従って、RBM47 の knockdown により、
A549 細胞の ATP 産生が促進することが分かった。また、FCCP を添加した後の酸素

消費量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞では、酸素消費量が増加することが観察された。従って、RBM47 の knockdown により、A549 細胞の最大呼吸も促進することが分かった。A549 細胞の基礎呼吸と最大呼吸がほとんど変わらなかったため、A549 細胞では予備呼吸能が少ないことが考えられる。更に、Antimycin A を添加した後の酸素消費量を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞では、酸素消費量が僅かに増加することが観察された。従って、RBM47 の knockdown により、ミトコンドリアによらない呼吸も促進することが分かった。以上の結果から、RBM47 は A549 細胞の酸素消費量を抑制することが示唆された。

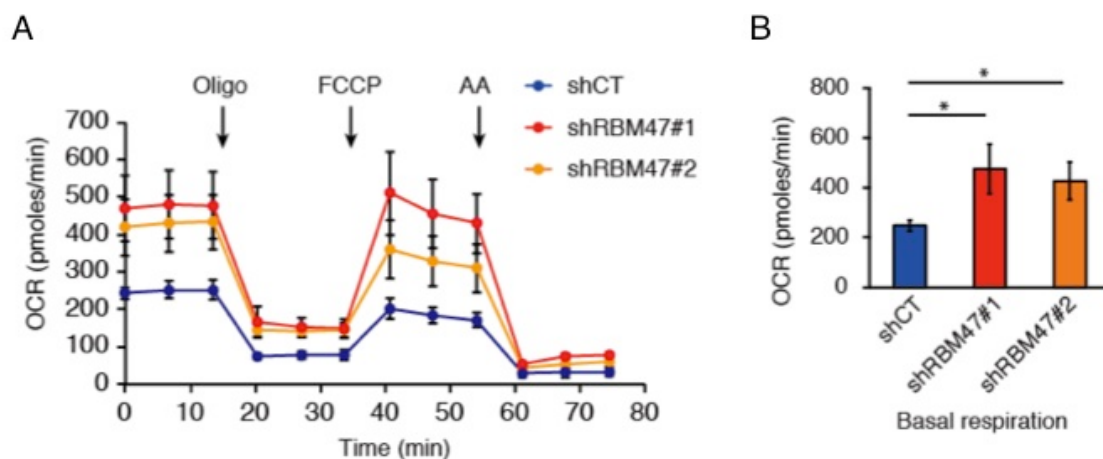


図 16. RBM47 の knockdown による細胞の酸素消費量の変化

(A) 細胞外フラックスアナライザーを用いて、A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) の酸素消費量 (OCR) を測定した。OCR の測定には、ミトコンドリアストレステストの指示に従って行った。Oligomycin (Oligo) と

Antimycin A (AA) は最終濃度 1 $\mu\text{mol/L}$ 、carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazine (FCCP) の最終濃度は 16 $\mu\text{mol/L}$ で使用した。エラーバーは標準誤差を示す。

(B) Oligomycin を添加するまでに測定した A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) の OCR の積算値を細胞の基礎呼吸量として、棒グラフで表した。A549-Luc-shCT 細胞の基礎呼吸量に対して A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞のそれぞれの基礎呼吸量について、t-検定を行った。エラーバーは標準誤差を示す。*は $p < 0.05$ を示す。

TGF- β 刺激を加えた A549 細胞についても同様に、酸素消費量を測定した (図 17A)。

Oligomycin を添加する前の酸素消費量を測定した結果、TGF- β 刺激を加えた A549 細胞では、酸素消費量が顕著に増加することが観察された (図 17B)。従って、TGF- β 刺激により、A549 細胞の基礎呼吸が促進することが分かった。また、Oligomycin を添加し、次の測定点までの酸素消費量の減少量を比較した結果、TGF- β 刺激を加えた A549 細胞では、酸素消費量の減少量が増加することが観察された。従って、TGF- β 刺激により、A549 細胞の ATP 産生が促進することが分かった。また、FCCP を添加した後の酸素消費量を測定した結果、TGF- β 刺激を加えた A549 細胞では、酸素消費量が増加することが観察された。従って、TGF- β 刺激により、A549 細胞の最大呼吸も促進することが分かった。更に、Antimycin A を添加した後の酸素消費量を測定した結果、TGF- β 刺激を加えた A549 細胞では、酸素消費量が増加することが観察された。従って、TGF- β 刺激により、ミトコンドリアによらない呼吸も促進することが分

かった。以上の結果から、RBM47 による酸素消費量の抑制については、上流の TGF- β の作用と一致する作用を示した。

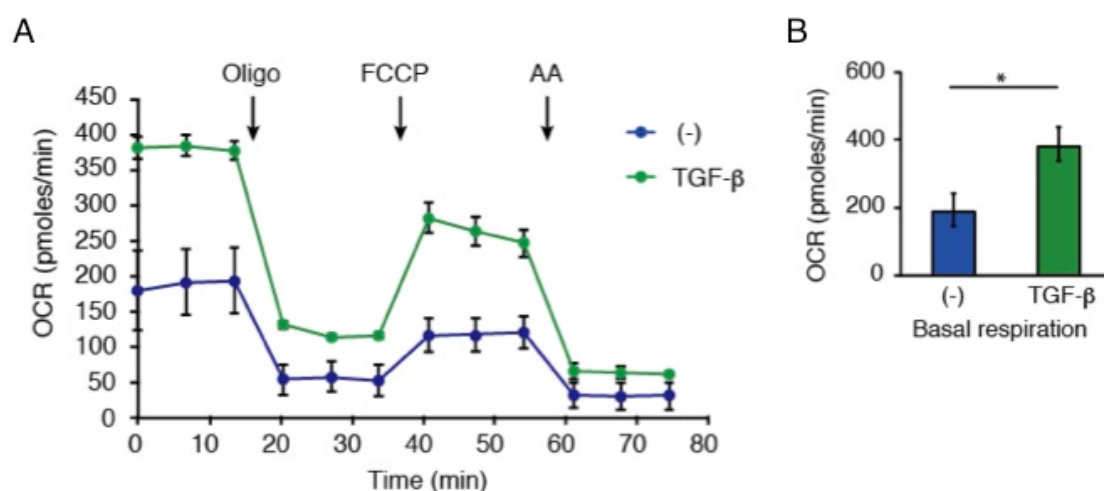


図 17. TGF- β 刺激を加えた細胞の酸素消費量の変化

- (A) 細胞外フラックスアナライザーを用いて、A549 細胞と TGF- β 刺激を加えてから 24 時間後の A549 細胞の OCR を測定した。OCR の測定には、ミトコンドリアストレステストの指示に従って行った。Oligomycin (Oligo) と Antimycin A (AA) は最終濃度 1 $\mu\text{mol/L}$ 、carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl hydrazine (FCCP) の最終濃度は 16 $\mu\text{mol/L}$ で使用した。エラーバーは標準誤差を示す。
- (B) Oligomycin を添加するまでに測定した A549 細胞と TGF- β 刺激を加えてから 24 時間後の A549 細胞の OCR の積算値を細胞の基礎呼吸量として、棒グラフで表した。A549 細胞の基礎呼吸量に対する TGF- β 刺激を加えた細胞の基礎呼吸量について、t-検定を行った。エラーバーは標準誤差を示す。*は $p < 0.05$ を示す。

RBM47 の knockdown によって増加した Nrf2 の標的遺伝子には、細胞の side population に対しても重要な因子が含まれることが知られている。⁵⁵ そこで、A549 細

胞の side population の細胞数変化についての検討を行った。A549 細胞の side population に含まれる細胞は、癌幹細胞と薬剤耐性の性質を示しており、腫瘍の悪性化に関わることが分かっている。^{56,57} 最初に、Hoechst33342 を用いて A549 細胞を染色し、フローサイトメトリーにより 450 nm (Hoechst Blue) と 675 nm (Hoechst Red) の蛍光波長を検出した。全細胞数に対する side population の割合は、ABC トランスポーターの一つ ABCG2 の活性を完全に阻害することで side population の割合を抑えることが知られている Fumitremorgin C (FTC) の添加により消失した細胞分画の割合を測定することで決定した。^{58,59} フローサイトメトリーの測定の結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞は、A549-Luc-shCT 細胞に比べて、side population の細胞分画の割合が顕著に増加することが分かった (図 18A)。対照的に、TGF- β 刺激を加えた A549 細胞では、side population の細胞分画の割合が減少することが分かった (図 18B)。これらの結果から、RBM47 は酸素消費量と side population の割合を抑制することが示唆された。従って、RBM47 は side population の抑制については、上流の TGF- β とは反対の作用を示した。

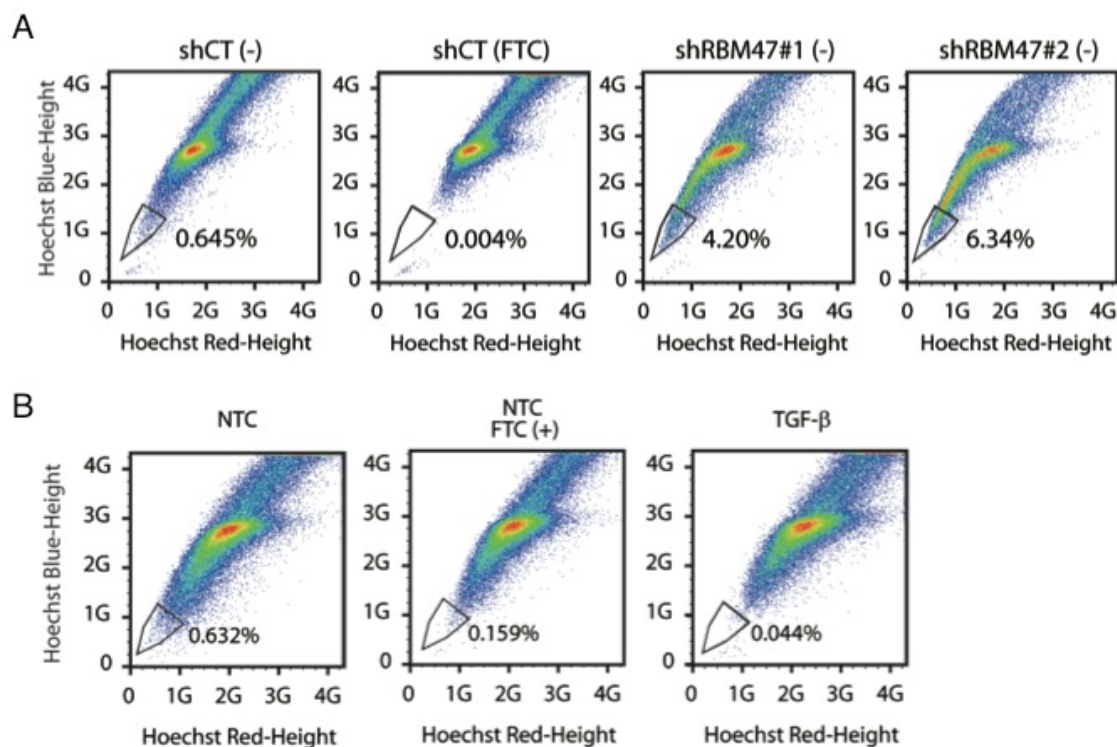


図 18. RBM47 の knockdown による A549 細胞の side population の割合の変化と TGF- β 刺激を加えた A549 細胞の side population の割合の変化

- (A) Hoechst33342 で A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) を染色し、フローサイトメトリーを用いて、450 nm (Hoechst Blue) と 675 nm (Hoechst Red) の蛍光波長を検出した。A549-Luc-shCT 細胞に Fumitremorgin C (FTC) を添加し、消失した分画を side population として、A549-Luc-shCT 細胞、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞の side population の割合の変化を測定した。
- (B) Hoechst33342 で A549 細胞 (NTC) と TGF- β 刺激を加えてから 24 時間後の A549 細胞 (TGF- β) を染色し、フローサイトメトリーを用いて、450 nm (Hoechst Blue) と 675 nm (Hoechst Red) の蛍光波長を検出した。A549 細胞に Fumitremorgin C (FTC) を添加し、消失した分画を side population として、A549 細胞と TGF- β 刺激を加えた A549 細胞の side population の割合の変化を測定した。

5. RBM47 の腫瘍増大速度の制御

がん細胞の増殖速度に対する RBM47 の作用について検討を行った。最初に、

A549-Luc-shCT 細胞、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を 6 cm dish に播種した。2 日後と 4 日後の細胞数を測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞と A549-Luc-shRBM47#2 細胞の細胞数は、A549-Luc-shCT 細胞に比べ減少することが観察された (図 19)。

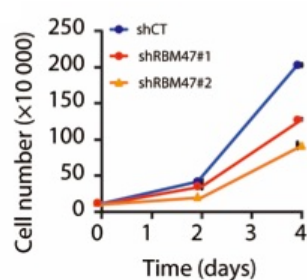


図 19. RBM47 の knockdown による A549 細胞の増殖速度の変化

A549-Luc-shCT 細胞 (shCT)、A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1)、A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) を 2 枚の 6 cm dish に 100,000 個ずつ播種し (0 日目)、2 日目と 4 日目に cell count により細胞数を測定した。プロットは、2 枚の 6 cm dish の細胞数の平均値を示す。

次に、ヌードマウスに、A549-Luc-shCT 細胞、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を皮下移植し、腫瘍の大きさを測定した。皮下移植を行ってから、4 週間後の腫瘍の大きさを測定した結果、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を皮下移植したヌードマウスの腫瘍の大きさは、A549-Luc-shCT 細胞を移植したヌードマウスの腫瘍の大きさよりも有意に増加することが観察された (図 20A, B, C, D)。従って、A549 細胞の皮下移植の結果は、in vitro

での細胞増殖の結果 (図 19) とは、異なる結果を示した。この理由の一つとして RBM47 の knockdown により side population が増加し癌幹細胞分画が増加したことが寄与する可能性が考えられる (図 18)。また、RNA-seq の解析結果から、RBM47 の knockdown により、fibrinogen alpha chain、fibrinogen beta chain、matrix metalloproteinase-7、vitronectin といった細胞外マトリックスを構成するタンパク質の発現が増加しており、腫瘍を囲む微小環境の変化も一因として考えられる。

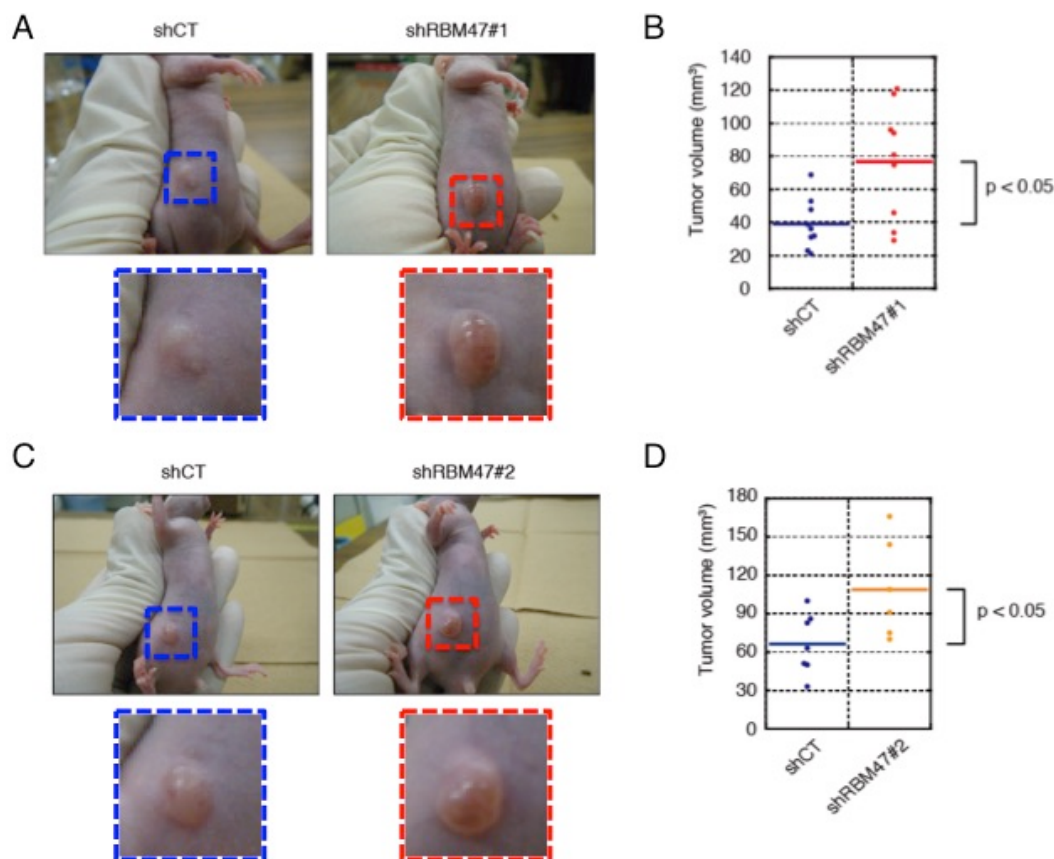


図 20. RBM47 の knockdown による A549 細胞をヌードマウスに皮下移植したときの腫瘍の増大能の変化

(A) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT) と A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1) をヌードマウスに皮下移植し、24 日後の代表的なマウスの写真を示す (上

- 図)。枠で囲ってある所は、同じ倍率で腫瘍を拡大した写真を示す（下図）。
- (B) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT) と A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1) をヌードマウス（各 9 匹）に皮下移植し、24 日後、ヌードマウスの腫瘍の長径と短径を測り、ドットプロットにより腫瘍の大きさを示した。横線は平均値を示す。
- (C) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT) と A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#2) をヌードマウスに皮下移植し、24 日後の代表的なマウスの写真を示す（上図）。枠で囲ってある所は、同じ倍率で腫瘍を拡大した写真を示す（下図）。
- (D) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT) と A549-Luc-shRBM47#2 細胞 (shRBM47#1) をヌードマウス（各 6 匹）に皮下移植し、25 日後、ヌードマウスの腫瘍の長径と短径を測り、ドットプロットにより腫瘍の大きさを示した。横線は平均値を示す。

次に、ヌードマウスに、A549-Luc-shCT 細胞、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を尾静脈注により移植し、7 週間後の腫瘍量を比較した。

photon count により腫瘍の大きさを測定した結果、皮下に移植した実験と同様に、A549-Luc-shRBM47#1 細胞、A549-Luc-shRBM47#2 細胞を移植したマウスにおいて、腫瘍の増大が観察された（図 21A, B）。RBM47 の knockdown によるヌードマウスの腫瘍の増大促進傾向は、Kaplan-Meier による RBM47 の発現量に基づいた肺腺癌患者の生存率の解析の結果と傾向が一致する（図 6B）。

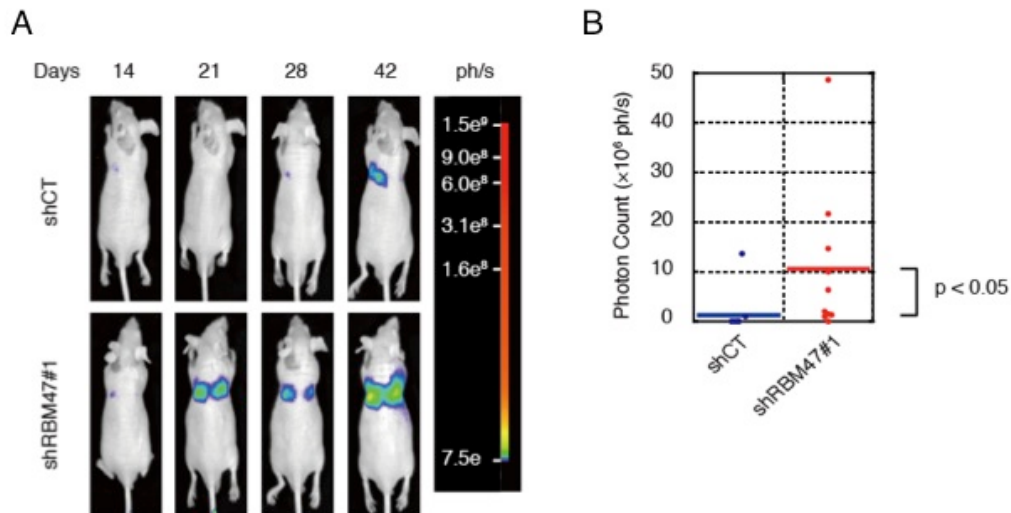


図 21. RBM47 の knockdown による A549 細胞をヌードマウスに経尾静脈的に移植したときの腫瘍の増大能の変化

- (A) A549-Luc-shCT 細胞 (shCT) と A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1) をヌードマウスに尾静脈移植し、6 週間後、ルシフェラーゼアッセイを行い、photon count により肺への転移をモニタリングした。ph/s は photon counts/sec を示す。
- (B) ドットプロットにより、A549-Luc-shCT 細胞 (shCT) を尾静脈注により移植したヌードマウス (6 匹) と A549-Luc-shRBM47#1 細胞 (shRBM47#1) を尾静脈移植したヌードマウス (10 匹) のフォトンカウントを示す。横線は平均値を示す。

以上より、RBM47 は KEAP1 や CUL3 の mRNA に結合し、直接、KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現を促進する、あるいは間接的に p21/CDKN1A や MafK の mRNA の発現を抑制することで Nrf2 の活性化を抑制することが示唆された (図 9, 11 12, 13, 14)。その結果、RBM47 は酸素消費量と side population の割合を抑制し、肺腺癌の腫瘍増大速度を抑制したと考えられる (図 20A, B, C, D、図 21A, B)。その一方で、RIP-seq の解析から、Nrf2 の制御因子以外にも、ATP5L や NDUFS6 などの因子の mRNA に RBM47 が結合し、Nrf2 経路

を介さずに、酸素消費量や腫瘍の増大能に関わる因子を制御した可能性も考えられる。また、RBM47 の knockdown により、side population の割合の増加が観察された (図 18)。これまでに、A549 細胞の side population の細胞をマウスに尾静脈移植すると、non-side population の細胞を尾静脈移植したマウスに比べて、腫瘍の増大速度が亢進することが報告されている。⁵⁷ 以上から、RBM47 の knockdown により、A549 細胞の side population の割合が増加したことで、尾静脈移植による腫瘍が増大した可能性が考えられた。

考察

本研究では、TGF- β によって発現が顕著に抑制される RNA 結合タンパク質として、RBM47 を同定した。RBM47 は、肺腺癌・乳癌・胃癌において発現しており、オンラインのデータベースを用いて解析した結果、特に肺腺癌患者において、RBM47 の発現の減少が予後不良に関与することが示唆された。一方、乳癌においては、RBM47 は、癌の進行や転移を抑制する働きがあることが報告されている。⁶⁰ データベースの結果からも、乳癌患者において、RBM47 の発現の減少が予後不良に関与することが示唆されている。⁴⁷ しかし、乳癌と肺腺癌の患者の予後について比較を行った際、肺腺癌患者の方が顕著に変化したことから、肺腺癌は RBM47 の発現変化の影響を受けやすいことが考えられ、本研究では、特に肺腺癌における RBM47 の機能に着目して解析を行った。

本研究では、RBM47 が KEAP1 や CUL3 の mRNA に結合することを示した。また、RBM47 の knockdown により、KEAP1 や CUL3 のタンパク質の発現量の減少が観察された。このことから、RBM47 は KEAP1 や CUL3 の mRNA に結合し、KEAP1 や CUL3 の翻訳を促進し、Nrf2 の活性を抑制することが考えられる。今後、KEAP1 や CUL3 のタンパク質の安定性に対する研究や、放射性同位体を用いた研究を行うことが必要である。また、RBM47 は p21/CDKN1A や MafK の mRNA には結合していなかったが、RBM47 の knockdown により p21/CDKN1A や MafK の mRNA 発現が増加したことから、RBM47 が間接的に

p21/CDKN1A や MafK の発現を抑制することが示唆された。その結果、RBM47 の knockdown により、Nrf2 の活性が増加し、細胞の酸素消費量と side population の割合が増加することで、腫瘍の増大速度を亢進させたことが考えられる (図 22)。肺腺癌細胞では、Nrf2 自身や、Nrf2 の分解に関わる KEAP1 に変異が入っていることが知られており、Nrf2 が安定化し、肺腺癌の予後不良に寄与することが示唆されている。^{24,25} A549 細胞では KEAP1 に変異が入っていることが知られており、Nrf2 が安定化する。²⁴ 本研究では、RBM47 の knockdown により、KEAP1 や CUL3 の発現が減少し、Nrf2 の標的遺伝子の ARE 部位への結合能が増加することが分かった。従って、KEAP1 に変異が入っても、完全に Nrf2 の活性が抑制されたわけではなく、RBM47 の発現が減少することにより、KEAP1 や CUL3 の発現が減少することで、Nrf2 の活性が促進されたことが考えられる。

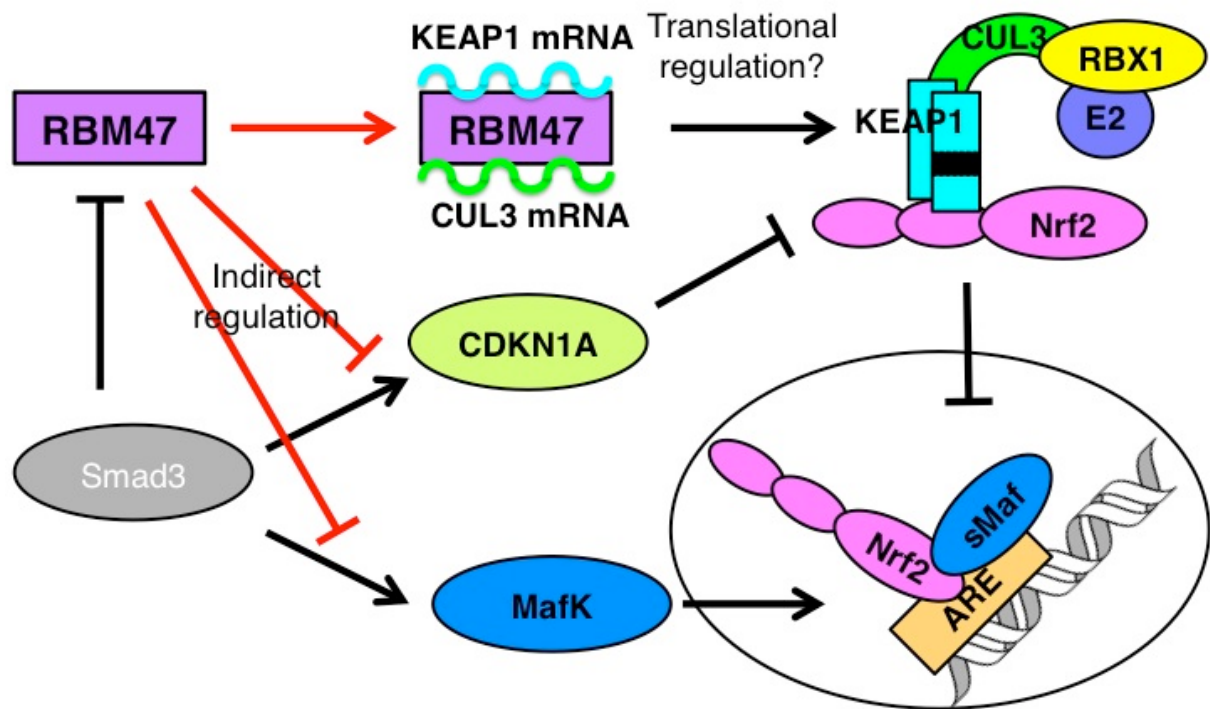


図 22. 本研究で解析した肺腺癌細胞における RBM47 の作用機構

RBM47 は、KEAP1 と CUL3 の mRNA に結合してタンパク発現を促進し、一方 p21/CDKN1A と MafK を抑制することで Nrf2 の活性を抑制することが示唆される。

TGF- β ファミリーのサイトカインは、正常細胞や癌細胞で、多面的な役割を果たす。TGF- β ファミリータンパク質とその下流の Smad タンパク質は、RNA に転写された後の制御を司ることが報告されている。Davis らは、Smad タンパク質が、miRNA のプロセッシングを行う DROSHA と複合体を形成する因子を増加させ、miRNA の変異を制御することを報告した。

⁶¹ TGF- β は、制御性 T 細胞の増加に重要である CCL22 の発現を抑制する miR-34a を含む様々な miRNA の発現を制御することも報告されている。⁶² miRNA の制御機能に加え、TGF- β は RNA 結合タンパク質の発現を制御することも知られている。これまで、所属する研

研究室では、ESRP1 と ESRP2 が TGF- β によって転写を介して抑制され、fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) の mRNA などの、複数の mRNA の選択的スプライシングを介して、EMT を抑制する機能を有することを報告してきた。⁴² 本研究では、TGF- β が RBM47 の発現を強く抑制することを示し、また RBM47 が KEAP1 と CUL3 の mRNA に結合し、KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現を促進させることで Nrf2 の活性を抑制させ、腫瘍の増大を抑制することを示唆した。NMuMG 細胞において、TGF- β 刺激により抑制される RNA 結合タンパク質を比較したとき、RBM47 は ESRP2 に比べ、TGF- β によって顕著に抑制されるタンパク質であることが分かった (表 2)。A549-Luc-shRBM47 細胞における遺伝子発現の変動は、TGF- β 刺激によって変動する遺伝子発現と関連していた (図 10A)。従って、RBM47 の発現減少が TGF- β の多彩な作用の一部を説明するメカニズムとなっていることが考えられる。しかし、TGF- β によって誘導される Snail や Slug は、RBM47 の knockdown により発現が減少するなど、TGF- β の標的遺伝子のいくつかは、RBM47 によって異なる制御を受けており (図 10B)、Nrf2 の標的遺伝子の制御もまた、多くはこれに該当した。このことは side population の割合の変化を含め、必ずしもすべての Nrf2 関連形質について RBM47 の knockdown と TGF- β 刺激の結果が一致しなかったことと関連する可能性がある。

Cancer Genome Atlas Research Network で肺腺癌の分子プロファイリングでは、KEAP1 の変異は腫瘍の 19%で観察され、Nrf2 タンパク質の発現は KEAP1 の変異の発現に関連す

ると報告されている。⁶³ Hast らは、KEAP1 遺伝子の 18 個の変異の機能の解析により、A549 細胞において G333C の変異は KEAP1 の CUL3 への結合を保つ一方で、Nrf2 への結合を減弱させることを示した。⁵⁰ 本研究では、RBM47 を knockdown した細胞では、KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現量が減少したが、Nrf2 のタンパク質の発現量に変化は観察されなかった。その一方で、RBM47 を knockdown した細胞では Nrf2 のゲノムに対する結合能が亢進しており、Nrf2 の標的遺伝子の発現が亢進することが分かった。この観察結果は、KEAP1 に変異があっても、Nrf2 の活性を阻害する機能を残すという最近の知見と一致することが分かった。⁵⁰ また、RBM47 を knockdown した A549 細胞では HMOX1 の ARE 部位に対する Nrf2 の結合能の変化が顕著ではないにもかかわらず、HMOX1 の発現を亢進させた一方で、RBM47 を knockdown した H441 細胞では HMOX1 の ARE 部位に対する Nrf2 の結合能を亢進させることが観察された。従って、この阻害の作用機構は、標的遺伝子や細胞によって違うことが考えられる (図 13A, B)。加えて、Nrf2 の標的遺伝子である NQO1 は、RBM47 の存在下でも高い発現を示しており、RBM47 を knockdown した A549 細胞では、僅かな発現の亢進しか観察されなかった。このような転写活性の制御における標的遺伝子の選択性は、TGF- β の下流にある Smad ファミリーでも観察されており、ゲノムにおける結合配列と転写共役因子の違いによると考えられる。^{38,64,65} 乳腺上皮細胞では、TGF- β が Bach1 と共に働く Maf family の転写因子を増加させることで、Nrf2 による酸化ストレス応答を阻害

することが報告されており、本研究でも用いた A549 細胞では異なる結果が観察された。⁵³

以上のことを踏まえると、RBM47 の knockdown により、一つの経路の因子の増減した結果、Nrf2 を介した転写活性が促進したのではなく、Nrf2 の活性に関する各段階を制御する複数の因子の発現変化が重なり合って、Nrf2 の転写機能が促進したことが考えられる。

Cancer Genome Atlas Research Network からも、RTK-RAS や PI3K-mTOR 経路の活性の機構などで、腫瘍にゲノム上の変異があっても、その因子が欠損することで、各シグナル経路の活性が変化することが報告されている。⁶³ このことから、Nrf2 タンパク質の発現は、Nrf2 経路の活性化の一つの指標として用いられてきたが、肺腺癌細胞での異常な Nrf2 の活性化は、Nrf2 タンパク質の発現の変化だけでは説明が不十分であり、本研究で示したような他のシグナル経路により Nrf2 が活性化を制御する機構があることが示唆される。

これまでの RBM47 の研究では、RBM47 を強制発現させると、マウスの ES 細胞において Nanog の mRNA に結合することが報告されている。⁶⁶ 加えて、ゼブラフィッシュの発生における RBM47 の機能のマイクロアレイの解析から、RBM47 は胚で一様に発現しており、Wnt シグナル経路を制御することが報告されている。⁴⁶ また、最近になり、RBM47 と RBM47 の変異体を用いた実験により、Wnt シグナルの抑制を介して、RBM47 が乳癌の脳転移を抑えることが報告された。⁶⁰ Vanharanta らの deep sequencing と cross-linking immunoprecipitation (HITS-CLIP) の解析により、強制発現された RBM47 は優先的に mRNA の 3'UTR に結合

し、選択的スプライシングを制御することが示唆された。しかし、Vanharanta らの報告によると、解析された RBM47 の結合モチーフは、以前に Ray らによって報告された“GAUGAU”の配列とは異なり、⁶⁷ ウラシルの連続配列であった。HITS-CLIP のライブラリー調製プロトコルを考慮すると、これが真に RBM47 の結合配列であるか否かは今後の検証が必要と思われる。本研究で示した RIP-seq のデータからも、RBM47 は細胞の代謝に関わる因子である ATP5L や NDUF6 の mRNA や他の mRNA にも、直接結合することが示された (図 15A, B, C)。これらの結果は、RBM47 には複数の標的遺伝子があることを示唆している。従って、異なる細胞株では、RBM47 の他のターゲットに関連した違うフェノタイプが現れる可能性がある。

Fossat らは、RBM47 が APOBEC1 を介して、シトシンをウラシルに変える RNA 編集の機能があることを示している。⁴⁵ この結果から、RBM47 は RNA の安定性や翻訳を制御する可能性はある一方で、APOBEC ファミリーを介して RNA 編集により腫瘍を促進することが示唆される。^{68,69} しかし、本研究で用いた A549 細胞の RNA-seq のデータと ChIP-seq で用いたゲノム配列のデータからは、KEAP1 や CUL3 における RBM47 による RNA 編集の変化は観察されなかった。その理由として、RNA-seq でのデータ量が限られていること、APOBEC1 が小腸特異的に発現しているタンパク質であり、A549 細胞では APOBEC1 の発現量が少ないことが考えられる。従って、RBM47 が結合する RNA や RBM47 によって制御される作用機

構について解析するには、今後より多くの情報を得ることができるように改善した
`deep-sequencing` で解析を行うことが必要になると考えられる。

結論

本研究では、TGF- β 刺激を加えた NMuMG 細胞で、最も発現が減少した RNA 結合タンパク質として RBM47 を同定した。また、オンライン上のデータベースを解析した結果、RBM47 の発現が低い肺線癌患者では予後が悪くなることが示唆されたため、肺腺癌における RBM47 の役割について解析した。最初に、NMuMG 細胞と同様に A549 細胞、H441 細胞においても、TGF- β が RBM47 の発現を抑制することを観察した。また、H441 細胞では、肺腺癌において予後良好因子として重要である TTF-1 が RBM47 の発現を促進させることが分かった。次に、RBM47 の機能を解析するため、恒常的に RBM47 を knockdown させた A549 細胞株の作製と A549 細胞に発現する RBM47 に対する RIP-seq を行った。その結果、A549 細胞において、RBM47 は Nrf2 の活性を抑制する KEAP1 と CUL3 の mRNA に結合し、Nrf2 の標的遺伝子の発現を抑制することが分かった。また、RBM47 は、Nrf2 の活性を抑制する KEAP1 と CUL3 のタンパク質の発現を促進し、Nrf2 の活性を促進する p21/CDKN1A と MafK の mRNA の発現を抑制することが分かった。更に、A549 細胞において、RBM47 は Nrf2 の標的遺伝子の ARE 部位への結合能を抑制した。次に、Nrf2 の標的遺伝子には細胞の酸素消費量や side population の割合を促進する因子が含まれているため、RBM47 の酸素消費量や side population に対する作用を解析した。その結果、A549 細胞において、

RBM47 は酸素消費量を抑制し、side population の割合を抑制することが分かった。最後に、腫瘍の増大速度に対する RBM47 による作用を解析した。ヌードマウスに A549 細胞を皮下移植および尾静脈移植した結果、RBM47 は腫瘍の増大を抑制することが分かった。

引用文献

1. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(1): 119-123.
2. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(15): 8621-8623.
3. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(3): 178-196.
4. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell*. 2009;v5(5):v504-514.
5. Hoshino Y, Katsuno Y, Ehata S, Miyazono K. Autocrine TGF- β protects breast cancer cells from apoptosis through reduction of BH3-only protein, Bim. *J Biochem*. 2011; 149(1): 55-65.
6. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003; 113(6): 685-700.
7. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad

- pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*. 2002; 7(12): 1191-1204.
8. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997; 389(6651): 631-635.
 9. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997; 89(7): 1165-1173.
 10. Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*. 2004; 23(11): 2071-2078.
 11. Nagano Y, Mavrikis KJ, Lee KL, et al. Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 2007; 282(28): 20492-20501.
 12. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003; 425(6958): 577-584.
 13. Stahlman MT, Gray ME, Whitsett JA. Expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in fetal and neonatal human lung. *J Histochem Cytochem*. 1996; 44(7): 673-678.
 14. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary

- adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(6): 767-773.
15. Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, et al. NKX2-1/TTF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012; 21(3): 348-361.
 16. Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K, Takahashi T. NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. *Cancer Cell*. 2013; 23(6): 718-723.
 17. Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, et al. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2009; 69(7): 2783-2791.
 18. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(16): 7130-7139.
 19. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 236(2): 313-322.
 20. Dayalan Naidu S, Kostov RV, Dinkova-Kostova AT. Transcription factors Hsf1 and

- Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36(1): 6-14.
21. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2009; 34(4): 176-188.
 22. Chen Z, Sui J, Zhang F, Zhang C. Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms. *J Cancer*. 2015; 6(3): 233-242.
 23. Zhao Y, Sun Y. Cullin-RING Ligases as attractive anti-cancer targets. *Curr Pharm*. 2013; 19(18): 3215-3225.
 24. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med*. 2006; 3(10): e420.
 25. Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*. 2008; 135(4): 1358-1368.
 26. Yoo NJ, Kim HR, Kim YR, An CH, Lee SH. Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. *Histopathology*. 2012; 60(6): 943-952.
 27. Chen W, Sun Z, Wang XJ, et al. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell*. 2009; 34(6): 663-673.

28. Oshimori N, Oristian D, Fuchs E. TGF- β promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma. *Cell*. 2015; 160(5): 963-976.
29. Wang R, An J, Ji F, Jiao H, Sun H, Zhou D. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373(1): 151-154.
30. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 2012; 22(1): 66-79.
31. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(4): 254-266.
32. Wurth L. Versatility of RNA-Binding Proteins in Cancer. *Comp Funct Genomics*. 2012; 2012: 178525.
33. Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K. MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene*. 2015; 34(24): 3085-3094.
34. Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet*. 2008; 24(8): 416-425.
35. Kim MY, Hur J, Jeong S. Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. *BMB Rep*. 2009; 42(3): 125-130.

- 36.** Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010; 1(2): 214-229.
- 37.** Lunde BM, Moore C, Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(6): 479-490.
- 38.** Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, et al. A Smad3 and TTF-1/NKX2-1 complex regulates Smad4-independent gene expression. *Cell Res*. 2014; 24(8): 994-1008.
- 39.** Hoshino Y, Nishida J, Katsuno Y, et al. Smad4 Decreases the Population of Pancreatic Cancer-Initiating Cells through Transcriptional Repression of ALDH1A1. *Am J Pathol*. 2015; 185(5): 1457-1470.
- 40.** Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(43): 15545-15550.
- 41.** Arase M, Horiguchi K, Ehata S, et al. Transforming growth factor- β -induced lncRNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer JygMC(A) cells. *Cancer Sci*. 2014; 105(8): 974-982.
- 42.** Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, et al. TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene*. 2012; 31(26):

3190-3201.

43. Warzecha CC, Sato TK, Nabet B, Hogenesch JB, Carstens RP. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Mol Cell*. 2009; 33(5): 591-601.
44. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, et al. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun*. 2012; 3: 883.
45. Fossat N, Tourle K, Radziewicz T, et al. C to U RNA editing mediated by APOBEC1 requires RNA-binding protein RBM47. *EMBO reports*. 2014; 15(8): 903-910.
46. Guan R, El-Rass S, Spillane D, et al. rbm47, a novel RNA binding protein, regulates zebrafish head development. *Dev Dyn*. 2013; 242(12): 1395-1404.
47. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res. Treat*. 2010; 123(3): 725-731.
48. Gyorffy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2013; 8(12): e82241.

49. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(17): 5718-5734.
50. Hast BE, Cloer EW, Goldfarb D, et al. Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. *Cancer Res.* 2014; 74(3): 808-817.
51. Singh A, Ling G, Suhasini AN, et al. Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46(3): 376-386.
52. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35(6): 639-650.
53. Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, et al. Transforming growth factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* 2013; 288(28): 20658-20667.
54. Hayes JD, Ashford ML. Nrf2 orchestrates fuel partitioning for cell proliferation. *Cell Metab.* 2012; 16(2): 139-141.
55. Singh A, Wu H, Zhang P, Happel C, Ma J, Biswal S. Expression of ABCG2 (BCRP)

- is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(8): 2365-2376.
- 56.** Sung JM, Cho HJ, Yi H, et al. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 371(1): 163-167.
 - 57.** Akunuru S, Palumbo J, Zhai QJ, Zheng Y. Rac1 targeting suppresses human non-small cell lung adenocarcinoma cancer stem cell activity. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16951.
 - 58.** Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* 2000; 60(1): 47-50.
 - 59.** Ehata S, Johansson E, Katayama R, et al. Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene.* 2011; 30(14): 1693-1705.
 - 60.** Vanharanta S, Marney CB, Shu W, et al. Loss of the multifunctional RNA-binding protein RBM47 as a source of selectable metastatic traits in breast cancer. *eLife.* 2014; 3.
 - 61.** Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control

- DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008; 454(7200): 56-61.
- 62.** Yang P, Li QJ, Feng Y, et al. TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2012; 22(3): 291-303.
- 63.** Network CGAR. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014; 511(7511): 543-550.
- 64.** Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, et al. Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(1): 172-186.
- 65.** Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH. Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene*. 2013; 32(13): 1609-1615.
- 66.** Yeganeh M, Seyedjafari E, Kamrani FA, Ghaemi N. RNA-binding protein Rbm47 binds to Nanog in mouse embryonic stem cells. *Mol Biol Rep*. 2013; 40(7): 4391-4396.
- 67.** Ray D, Kazan H, Cook KB, et al. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*. 2013; 499(7457): 172-177.
- 68.** Petit V, Guétard D, Renard M, et al. Murine APOBEC1 is a powerful mutator of

retroviral and cellular RNA in vitro and in vivo. *J Mol Biol.* 2009; 385(1): 65-78.

- 69.** Valdmanis PN, Roy-Chaudhuri B, Kim HK, et al. Upregulation of the microRNA cluster at the Dlk1-Dio3 locus in lung adenocarcinoma. *Oncogene.* 2015; 34(1): 94-103.

謝辞

本研究を施行するにあたり、多大な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学講座の宮園浩平教授に厚く御礼申し上げます。

また、研究方針から細かい実験に至るまで、終始御指導賜りました鯉沼代造准教授に深く御礼申し上げます。フローサイトメトリーとマウスを用いた実験と解析を中心に、御指導や研究内容への御助言を頂きました江幡正悟特任講師に心より御礼申し上げます。また、研究を進める中で、多くの御支援を頂きました分子病理学講座の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程進学より現在に至るまで、研究生活を経済的かつ精神的にサポートし、温かく見守ってしてくれた両親に感謝し、本論文の結びとしたいと思います。

2016 年 2 月 29 日

櫻井 翼

東京大学 本郷キャンパスにて