

# 研究報告書

研究課題：A（一般）

（平成26年度）

平成28年6月2日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 高山昭三 殿

研究施設 愛知県がんセンター研究所

住所 名古屋市千種区鹿子殿1-1

研究者氏名 佐久間 圭一郎



（研究課題）

Pre-mRNA スプライシング異常を標的とする抗がん剤開発のための基盤研究

---

平成27年2月27日付助成金交付のあった標記指定課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【1】 研究の背景・目的

転移の機序は未解明の点が多く、特に転移抑制因子はほとんど報告されていない。我々は、shRNA ライブラリーを用いたマウス生体内スクリーニング法によって、*Hnrnp11* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like*)が大腸がん転移抑制候補遺伝子であることを同定した。

*Hnrnp11* は RNA 結合タンパクをコードする遺伝子で、ヒトにもオルソログ(*HNRNPLL*)が存在する。機能的にはリンパ球の Pre-mRNA スプライシングに関与することが数篇報告されているのみで、未知の部分が多い。正常大腸および大腸がんにも *HNRNPLL* は発現するが、その役割は全く分かっていない。

本研究では、①大腸がん細胞において *HNRNPLL* によってスプライシング制御を受ける遺伝子の同定、ならびに、②転移能獲得に伴う *HNRNPLL* の発現低下機序の解明を目標に研究をおこなった。

## 【2】 研究結果・考察

### 1. *HNRNPLL*によってスプライシング制御を受ける遺伝子の同定

ヒト大腸がん細胞株SW480に*HNRNPLL* cDNAあるいは*HNRNPLL* shRNAを導入し、両者のmRNA発現プロファイルを次世代シーケンサーで比較した。エクソンの発現パターン変化を認めた複数の遺伝子の中で、転移との関連がよく知られている*CD44* に最初に着目した。*HNRNPLL* shRNAによって*CD44* variant exonの発現増加を認め(図 1)、RNA免疫沈降法にて*HNRNPLL*と*CD44* pre-mRNAとの結合を確認した(図 2)。マウス大腸がん細胞株CMT93でも*Hnrnp11*をノックダウンしたところ、特に*Cd44* variant exon 6 (*Cd44v6*)の発現増加を認め、ウエスタンブロットにてタンパクレベルでの*Cd44v6* の発現増加も確認された(図 3)。*CD44v6* の発現は大腸がんの予後不良因子として知られていることから注目される。

今後は*CD44v6* の増加と転移の関係を明らかにするとともに、*CD44* 以外の*HNRNPLL*標的遺伝子を同定し、転移への関与を検証したい。

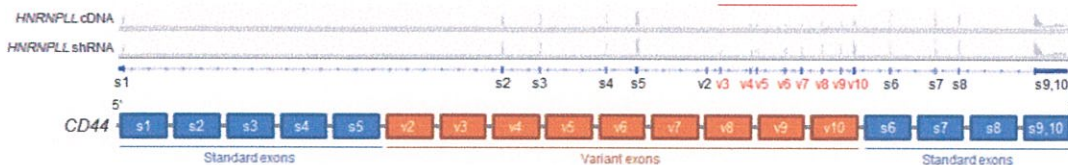


図 1. *HNRNPLL*のノックダウンによって*CD44* variant exonの発現が増加する  
*HNRNPLL* cDNAを導入したSW480細胞(グラフ上段)と*HNRNPLL* shRNAを導入したSW480細胞(グラフ下段)の*CD44* エクソン発現量を示す。下の模式図は*CD44* の遺伝子構造を示す。

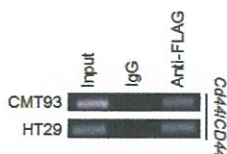


図 2. *Hnrnp11*は*Cd44* pre-mRNAと結合する  
CMT93細胞とHT29細胞にFLAG-*Hnrnp11*(*HNRNPLL*)を強制発現し、抗FLAG抗体でRNA免疫沈降後、*Cd44*(*CD44*)特異的なプライマーで検出した。

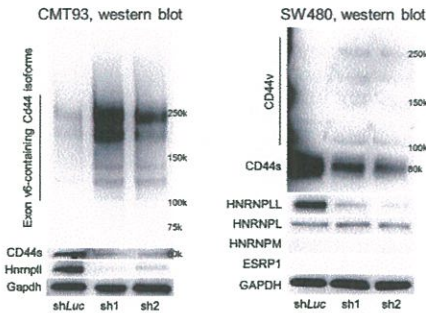


図 3. *Hnrnp11* のノックダウンによって *Cd44v6* の発現が増加する CMT93 細胞に *Hnrnp11* shRNA を導入し、*Cd44v6* 特異的抗体でウエスタンブロットをおこなった。ヒト *CD44v6* についてはウエスタンブロットに適した抗体が入手できなかったため、SW480 細胞については抗 *CD44s* 抗体を使用し、*CD44v* 全体を検出した。

## 2. 転移性大腸がん細胞における HNRNPLL の発現低下機序の解明

近年、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が転移を促進する現象として注目されていることから、EMT と HNRNPLL の関係を検証した。ヒト大腸がん細胞株 SW480 と CaRI に EMT を導入したところ、HNRNPLL の発現低下を認め (図 4)、*CD44 variant isoform* の発現が増加した。さらに、大腸がん臨床検体の免疫染色で、浸潤先端に存在するがん細胞の一部に、EMT の特徴である *E-cadherin* の発現低下とともに HNRNPLL の発現も低下した細胞を認めた (図 5)。これらの結果は、EMT に伴う HNRNPLL の発現低下機序の存在を示唆しており、今後詳しく検証をおこなう予定である。

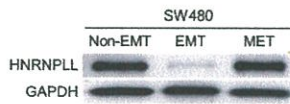


図 4. EMT によって HNRNPLL の発現が低下する SW480 細胞に EMT を導入し、HNRNPLL の発現をウエスタンブロットで調べた。EMT によって発現低下を認め、EMT と逆方向の変化 (MET) で回復した。

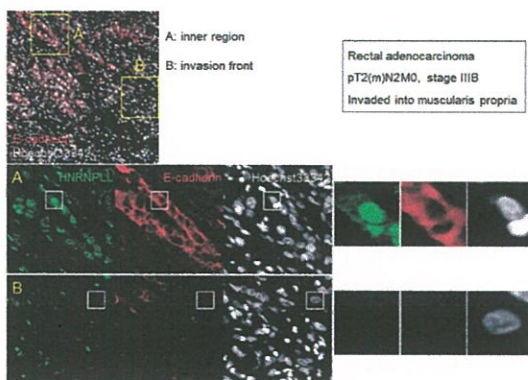


図 5. 浸潤先端に *E-cadherin* と HNRNPLL の発現が低下した細胞が存在する 大腸がん臨床検体を 2 重染色した。浸潤先端のがん細胞の一部に *E-cadherin* と HNRNPLL の発現が低下した細胞を認めた。

### 【3】学会発表

1. 佐久間圭一朗、青木正博: Epithelial mesenchymal transition negatively regulates HNRNPLL, a candidate metastasis suppressor of colon cancer. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 10 日, 2015.
2. Masahiro Aoki, Keiichiro Sakuma: An in vivo shRNA screen identifies HNRNPLL as a novel colorectal cancer metastasis suppressor. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, Lahaina, USA, February 19, 2016.

#### 【4】謝辞

本研究の遂行にあたり研究助成のご支援を賜りました公益財団法人 がん研究振興財団に深く感謝致します。また、本研究は愛知県がんセンター研究所 分子病態学部 青木正博部長のもとでおこなわれたものであり、同センター中央病院 遺伝子病理診断部 谷田部恭部長ならびに消化器外科部 清水泰博部長より臨床検体をご提供いただきました。ここに感謝申し上げます。