

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ヒトRDRC/RITS複合体の同定とその機能解析
研究機関・部局・職名	独立行政法人国立がん研究センター・がん幹細胞研究分野・分野長
氏名	増富 健吉

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	127,000,000	127,000,000	0	127,000,000	126,990,401	9,599	
間接経費	38,100,000	38,100,000	0	38,100,000	38,100,000	0	
合計	165,100,000	165,100,000	0	165,100,000	165,090,401	9,599	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	494,280	6,075,663	15,280,795	33,157,260	55,007,998
旅費	0	92,770	84,580	1,045,446	1,222,796
謝金・人件費等	0	7,838,873	12,426,321	15,056,371	35,321,565
その他	0	3,027,069	2,249,418	30,161,555	35,438,042
直接経費計	494,280	17,034,375	30,041,114	79,420,632	126,990,401
間接経費計	0	18,600,000	3,960,000	15,540,000	38,100,000
合計	494,280	35,634,375	34,001,114	94,960,632	165,090,401

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
超低温フリーザー	パナソニック社 MDF-C8V1-PJ	1	506,100	506,100	H25.11.20	独)国立がん研究センター
正立顕微鏡	オリンパス社 BX-53F	1	2,572,500	2,572,500	H25.12.16	独)国立がん研究センター
8チャンネルストリップウォッシャー	BioTek社 ELX508V	1	793,800	793,800	H26.1.27	独)国立がん研究センター

5. 研究成果の概要

ヒトRDRC/RITS複合体の構成因子としてのTBN複合体を同定した。TBN複合体がM期特異的に染色体セントロメア領域や分裂期紡錘系に共局在することを見出し、これらを手がかりとしてTBN複合体のM期特異的な機能解析を行った。1.M期特異的に合成されるTBN複合体がRdRP活性を保證していること、2. M期特異的に誘導されるRdRP活性を介して、セントロメア領域やレトロトランスポゾン領域のヘテロクロマチン構造維持に関わりその領域からの遺伝子発現抑制に関わること、3. RdRP活性を介したヘテロクロマチン構造維持にAgoタンパク質や小さなRNAが介在する可能性が高いことを見出し、これまでの部分を論文公表した(Maida et al., Mol Cell Biol 2014; 34: 1576-1593)。また、RdRP活性阻害剤や活性促進剤の同定に関しては、これまで、約450種類の天然化合物(製薬企業より分与)、抗がん物質などのライブラリーを探索し、2種類のRdRP特異的阻害剤を同定した。

課題番号	LS131
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	ヒト RDRC/RITS 複合体の同定とその機能解析
	Identification of human RDRC/RITS complex and functional role of the complex
研究機関・部局・職名 (下段英語表記)	独立行政法人国立がん研究センター・がん幹細胞研究分野・分野長
	National Cancer Center, Division of Cancer Stem Cell, Chief
氏名 (下段英語表記)	増富 健吉
	Kenkichi Masutomi

研究成果の概要

(和文): サイズの小さな RNA が直接的に遺伝子の発現量の調節や遺伝子の構築に深く関わることで生命現象に影響する現象を RNA 干渉と呼び、この十数年の生命科学研究の中で非常に重要な発見として知られている。この RNA 干渉の一連の反応に重要である酵素(RDRC/RITS 複合体)の存在はヒトでは未だ立証されていなかったが、本研究で RDRC/RITS 複合体の存在の立証および RDRC/RITS 複合体ががん幹細胞の機能維持に関わることを世界にさきがけ報告した。ヒト RDRC/RITS 複合体の機能を制御することでがん幹細胞の治療が可能となる可能性があり、がん根治療法確立への波及効果が期待される。

(英文): RNA dependent RNA polymerase (RdRP) is a critical enzyme which is responsible for RNA interference and chromatin maintenance mediated by small RNAs such as siRNAs. While the existence of a functional mammalian homologue of RDRC/RITS complex (RNA-directed RNA polymerase complex and RNA-induced transcriptional gene silencing complex) has been predicted, such an enzyme has not yet been identified. In this study, we succeed to identify a functional mammalian homologue of RDRC/RITS complex and to show that the complex largely involves in heterochromatin maintenance and show biological significance of this enzyme in cancer stem cell maintenance.

1. 執行金額 165,090,401 円

(うち、直接経費 126,990,401 円、 間接経費 38,100,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

RNA interference (RNAi) が発見されて以来、RNAi に関与する小さな RNA の代表的な合成経路には、1本鎖 RNA を鋳型に2本鎖 RNA を合成する酵素である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) の存在が植物や分裂酵母、アカパンカビ、線虫などのモデル生物で立証されてきた。ヒトを始めとする哺乳類の RdRP はこれまでその存在が立証されていなかったが、近年我々は、ヒトにおける RdRP の存在を証明し、RdRP による内在性 siRNA の合成経路の一部を明らかにした (Nature 2009, Maida et al.)。ヒト RdRP とヒト内在性 siRNA が同定されたことから、モデル動物である分裂酵母、線虫などで見られるように、生体内で合成されたヒト内在性 siRNA がヒストン修飾の調節やヘテロクロマチン形成・維持メカニズムに関与するか否かは次の重要な生物学的な命題となってきた。内在性 siRNA によるヘテロクロマチン形成・維持メカニズムの研究は分裂酵母で進んでおり、RdRP を含む RDRC 複合体 (RNA-directed RNA polymerase complex) と RITS 複合体 (RNA-induced transcriptional gene silencing complex) の2つの複合体が必須であることが知られている。ヒトでも hTERT により合成された内在性 siRNA によるヘテロクロマチン維持メカニズムが存在する可能性や、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ機能を有する TERT がヒト RDRC 複合体または RITS 複合体の構成因子の一つである可能性が強く示唆される。本研究では、ヒト RDRC/RITS 複合体の存在を立証すると同時に RDRC/RITS 複合体によるヒトヘテロクロマチン構造維持機構の解明を目的とする。

4. 研究計画・方法

下記の実験仮説と Specific Aim を設定し研究を進めた。

実験仮説: ヒト RDRC/RITS 複合体はヒト内因性 siRNA を介してヘテロクロマチン構造維持に関わる

Specific Aim #1: ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子として hTERT-Brg1-NS/GNL3L-HP1-Ago が存在する

Specific Aim #1-A: ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子の物理的相互作用を生化学的に検討する

Specific Aim #1-B: ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子の共局在を細胞生物学的に検討する

Specific Aim #1-C: ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子の共通機能を遺伝子レベルで検討する

Specific Aim #1-D: ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子の共通機能を細胞レベルで検討する

Specific Aim #2: ヒト RDRC/RITS 複合体はヒトヘテロクロマチン構造維持に関与する

Specific Aim #2-A: ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子を発現抑制することでヘテロクロマチン構造が維持できなくなることを検討する

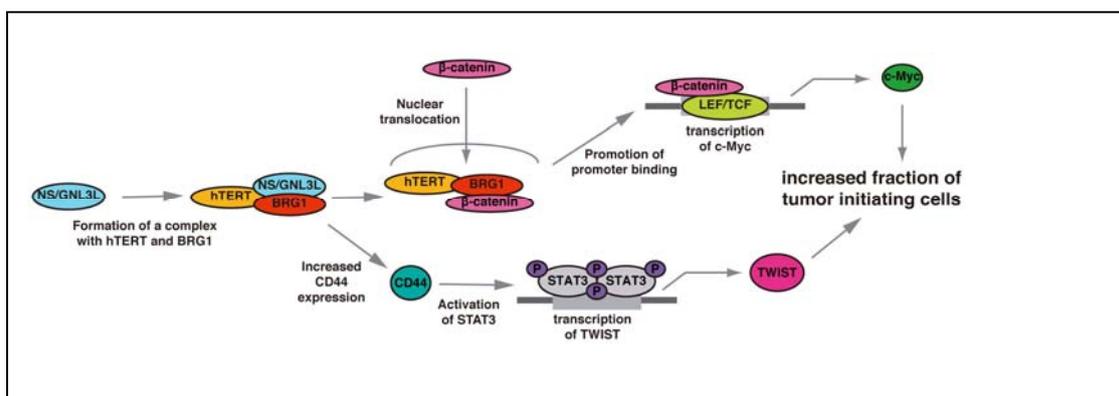
Specific Aim #2-B: ヒト RDRC/RITS 複合体が制御する領域を同定する

Specific Aim #2-C: ヒト RDRC/RITS 複合体阻害剤あるいは活性剤を同定する

上記の課題に関して、免疫沈降法などの生化学的手法を用いた複合体構成因子群の同定と物理的相互作用の検討および標的遺伝子部位の同定とその発現調節機構の解明、細胞免疫染色法を用いた複合体構成因子群の局在解析、遺伝学的手法を用いた複合体構成因子群の細胞レベル機能解析などを行った。また、同定したヒト RDRC/RITS 複合体の阻害剤や活性剤をスクリーニングした。

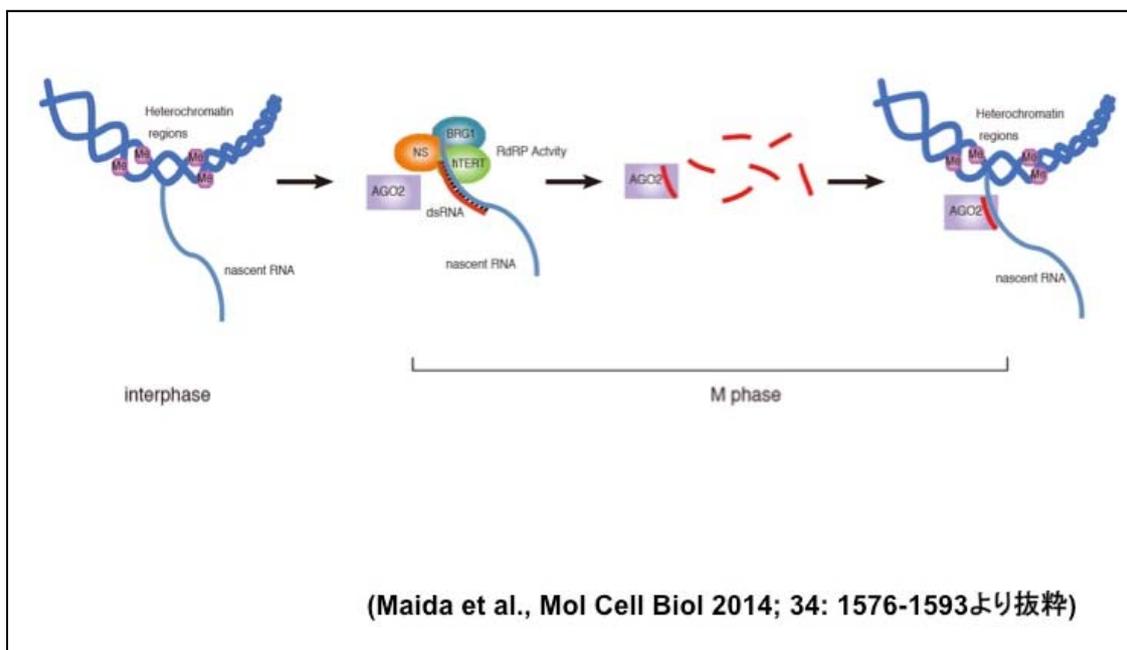
5. 研究成果・波及効果

ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子として予測した hTERT-Brg1-NS/GNL3L が物理的相互作用を示すことを示し、この因子群の機能解析を行ったところ、これらの因子群は、がん幹細胞の維持に必須であることを報告した(PNAS 2011 Okamoto *et al.*)。具体的には、hTERT-Brg1-NS/GNL3L 複合体は造腫瘍能の著しい亢進、放射線療法抵抗性、および高い転移能を付与することを見出した。さらに、*c-MYC*、*OCT3/4*および *KLF4*の発現上昇にも関与することを見出した。これらの現象は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の活性化、EMT 関連因子である TWIST の発現を制御するリン酸化 STAT3 によるものであることを報告した(下図、PNAS 2011 Okamoto *et al.*)。



また、hTERT-Brg1-NS/GNL3L が RNA dependent RNA polymerase (RdRP)として機能することを見出した。具体的には TERT がテロメアのみならず、M 期特異的にセントロメアやレトロトランスポゾン領域において RdRP 活性による siRNA 合成を介してテロメア以外のヘテロクロマチン構造維持に関わることを見出した。さらに、ヒト RDRC/RITS 複合体の構成因子としての TBN 複合体の可能性を引き続き検証し、TBN 複合体が M 期特異的に染色体セントロメア領域や分裂期紡錘糸に共局在することを見出した。これらを手がかりとして TBN 複合体の M 期特異的な機能解析を行い、

- (1)M 期特異的に合成される TBN 複合体が RdRP 活性を保證していること、
- (2)M 期特異的に誘導される RdRP 活性を介して、セントロメア領域やレトロトランスポゾン領域のヘテロクロマチン構造維持に関わりその領域からの遺伝子発現抑制に関わること、
- (3)RdRP 活性を介したヘテロクロマチン構造維持に Ago タンパク質や小さな RNA が介在する可能性が高いことを見出し(下図)これまでの部分を論文公表した(Maida *et al.*, *Mol Cell Biol* 2014; 34: 1576-1593)。



以上のごとく、当初、ヒト RDRC/RITS 複合体構成因子として予測した hTERT-Brg1-NS/GNL3L-HP1-Ago が M 期特異的ヒト RdRP 活性を保障し、小さな siRNA を介して染色体ヘテロクロマチン構造を維持することを示し、「ヒト RDRC/RITS 複合体はヒト内因性 siRNA を介してヘテロクロマチン構造維持に関わる」との実験仮説を立証した。

また、RdRP 活性阻害剤や活性促進剤の同定に関しては、これまで、約 450 種類の天然化合物（製薬企業より分与）、抗がん物質などのライブラリーを探索し、2 種類の RdRP 特異的阻害剤を同定した。

ヒト RDRC/RITS 複合体ががん幹細胞の機能維持に関わることが見出された。このことより、ヒト RDRC/RITS 複合体の機能を制御することでがん幹細胞の治療が可能となる可能性があり、がん根治療法へ期待が膨らむ。

上記の「2 種類の RdRP 特異的阻害剤」に関してはヒト RDRC/RITS 複合体を標的とした抗がん剤としての応用を視野に入れた前臨床研究が国立がん研究センターにて展開されており、今後の抗がん剤としての臨床応用への波及効果が大きいと期待されている。

6. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 9 件
計 13 件	<ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="371 416 1378 546">1. Maida Y, Yasukawa M, Okamoto N, Ohka S, Kinoshita K, Totoki Y, Ito TK, Minamino T, Nakamura H, Yamaguchi S, Shibata T, <u>Masutomi K</u> Involvement of TERT in heterochromatin maintenance <i>Mol Cell Biol</i> 2014; 34: 1576–1593 <li data-bbox="371 580 1378 674">2. Maida Y, Kyo S, Lassmann T, Hayashizaki Y, <u>Masutomi K</u> Off-Target Effect of Endogenous siRNA Derived from <i>RMRP</i> in Human Cells <i>Int J Mol Sci</i> 2013; 14: 9305–9318 <li data-bbox="371 707 1378 875">3. Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, <u>Masutomi K</u>, Yoshida T, Fujiwara Y, Tamura K Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells <i>Cancer Science</i> 2012; 103: 1665–1671 <li data-bbox="371 909 1378 1070">4. Nakajima TE, Yoshida H, Okamoto N, Nagashima K, Taniguchi H, Yamada Y, Shimoda T, <u>Masutomi K</u> Nucleostemin and TWIST as predictive markers for recurrence after neoadjuvant chemotherapy for esophageal carcinoma <i>Cancer Science</i> 2012; 103: 233–238 <li data-bbox="371 1104 1378 1198">5. Hirai Y, <u>Masutomi K</u>, Ishikawa F Kinetics of DNA replication and telomerase reaction at a single-seeded telomere in human cells <i>Genes Cells</i> 2012; 17: 186–204 <li data-bbox="371 1232 1378 1326">6. Rosenbluh J, Nijhawan D, Chen Z, Wong KK, <u>Masutomi K*</u>, Hahn WC* <i>RMRP</i> is a non-coding RNA essential for early murine development <i>PLoS ONE</i> (*: co-corresponding author) 2011; 6: e26270 <li data-bbox="371 1359 1378 1565">7. Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, <u>Masutomi K</u>, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Yagita H, Takaoka A, Tahara H Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anti-cancer drug responses of cancer stem/initiating cells <i>Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America</i> 2011; 108: 12425–12430 <li data-bbox="371 1599 1378 1729">8. Kawashima M, Kawakita T, Maida Y, Kamoi M, Ogawa Y, Shimmura S, <u>Masutomi K</u>, Tsubota K Comparison of telomere length and association with progenitor cell markers in lacrimal gland between Sjögren and non-Sjögren syndrome dry eye patients <i>Molecular Vision</i> 2011; 17: 1397–1404 <li data-bbox="371 1762 1378 1924">9. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon KL, Fukami K, Hahn WC, <u>Masutomi K</u> Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin <i>Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America</i> 2011; 108: 20388–20393

	<p>(掲載済み一査読無し) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 毎田佳子、<u>増富健吉</u> 拡大するテロメラーゼのバイオロジー 実験医学 31(9):1421-1427,2013 2. 木下圭太、<u>増富健吉</u> テロメラーゼの新機能 医学のあゆみ 241(11):841-845,2012 3. 岡本奈緒子、<u>増富健吉</u> テロメラーゼを標的としたがん幹細胞標的治療の可能性 ～Telomerase and Cancer stem cell～ 実験医学 増刊 29(20):3391-3396,2011 4. <u>増富健吉</u> テロメラーゼとがん幹細胞 ANTI-AGING MEDICINE 7(3): 400-404,2011 <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 19 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>増富健吉</u> テロメラーゼ新規機能とがん幹細胞 株式会社 医学生物学研究所セミナー 株式会社 医学生物学研究所伊那研究所 2014 年 2 月 25 日(招待講演) 2. <u>増富健吉</u> Analysis of human RNA dependent RNA polymerase JST さきがけ国際シンポジウム「哺乳類における小分子 RNA」 JST 東京本部 2014 年 2 月 21 日(招待講演) 3. 毎田佳子、安川麻美、山口聡子、<u>増富健吉</u> hTERT は細胞分裂期に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を示す 第36回日本分子生物学会年会 神戸 2013 年 12 月 5 日 4. Maida Y, Yasukawa M, Yamaguchi S, <u>Masutomi K</u> hTERT produces short RNAs <i>de novo</i> via its RNA-dependent RNA polymerase activity 第72回日本癌学会総会 パシフィコ横浜 2013 年 10 月 3 日～5 日 5. Yamaguchi S, Okamoto N, Kato T, Yoshida M, Takahashi R, Yasukawa M, Maida Y, Ochiya T, Tsuda H, <u>Masutomi K</u> Role of cancer stem cells in chemoresistance ovarian cancer 第72回日本癌学会総会 パシフィコ横浜

	<p>2013年10月3日～5日</p> <p>6. <u>Masutomi K</u> “Involvement of TERT-RdRP in heterochromatin maintenance” The 18th Annual Meeting of the RNA Society Davos, Switzerland Jun 11-16, 2013</p> <p>7. Okamoto N, Yasukawa M, Maida Y, <u>Masutomi K</u> “Involvement of TERT-RdRP in heterochromatin maintenance” Cold Sprig Harbor Laboratory Meeting “Telomeres and Telomerase” Cold Sprig Harbor, NY Apr 30- May 4, 2013</p> <p>8. <u>増富健吉</u> がん研究のパラダイムシフト: がん性疼痛をがん幹細胞研究で考えてみる 黒部市民病院講演会 黒部市民病院 2013年2月15日(招待講演)</p> <p>9. <u>増富健吉</u> ヒトRNA依存性RNAポリメラーゼとがん幹細胞 第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場 2012年12月11日～14日(招待講演)</p> <p>10. 岡本奈緒子、加藤友康、吉田政行、山口聡子、安川麻美、木下圭太、津田均、深見希代子、<u>増富健吉</u> 卵巣がんにおけるがん幹細胞関連因子及びhTERT複合体の発現検討 第35回日本分子生物学会年会 福岡国際会議場 2012年12月11日～14日</p> <p>11. Kinoshita K, Ohka S, Yasukawa M, Okamoto N, Totoki Y, Lassmann T, Ando Y, Ito T, Minamino T, Nakamura H, Fukami K, Shibata T, Hayashizaki Y, <u>Masutomi K</u> Link between heterochromatin maintenance and tumor initiating cell by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 第71回日本癌学会総会 ロイトン札幌 2012年9月19日～21日</p> <p>12. 岡本奈緒子、加藤友康、吉田政行、山口聡子、安川麻美、木下圭太、深見希代子、津田均、<u>増富健吉</u> 卵巣がんの組織型におけるがん幹細胞関連遺伝子の発現検討 第71回日本癌学会総会 ロイトン札幌 2012年9月19日～21日</p> <p>13. <u>増富健吉</u> テロメラーゼ・幹細胞・がん 第116回日本眼科学会総会 東京国際フォーラム</p>
--	--

	<p>2012年4月7日(招待講演)</p> <p>14. <u>増富健吉</u> テロメースとがん幹細胞 金沢大学重点戦略経費 政策課題対応型研究推進セミナー 金沢大学がん進展制御研究所 2012年1月12日(招待講演)</p> <p>15. Ohka S, Okamoto N, Kinoshita K, Yasukawa M, <u>Masutomi K</u> Tumor initiating cell maintenance and heterochromatin establishment during mitotic phase 第34回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2011年12月13日～16日</p> <p>16. 岡本奈緒子、安川麻美、Christine Nguyen、深見希代子、William C.Hahn、<u>増富健吉</u> hTERT、BRG1、NS 複合体による tumor initiating cell の誘導 第70回日本癌学会総会 名古屋国際会議場 2011年10月3日～5日</p> <p>17. <u>増富健吉</u> テロメースによるエピジェネティクス制御と細胞老化制御の可能性 第11回日本抗加齢医学会総会 国立京都国際会館 2011年5月27日～29日(招待講演)</p> <p>18. Hirai Y, Wakai M, <u>Masutomi K</u>, Ishikawa F “The sequence of events at a single human telomere in S phase” Cold Sprig Harbor Laboratory Meeting “Telomere and Telomerase” Cold Sprig Harbor, NY May 3-7, 2011</p> <p>19. <u>Masutomi K</u> “Identification of the RNA dependent RNA polymerase and mechanism of chromatin maintenance” 62. Mosbacher Kolloquium-Mechanisms of RNA-mediated regulation Mosbach, Frankfurt Apr 4-7, 2011 (招待講演)</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1. <u>増富健吉</u> がん幹細胞研究の新展開 パークレイズ証券株式会社 大手町ファーストスクエアウエストタワー 2014年1月10日</p>
<p>図書 計1件</p>	<p><u>Masutomi K</u>, Hahn WC “Telomerases: Chemistry, Biology and Clinical Applications” Capter 8: Off-telomerase function of telomerase John Wiley & Sons, ISBN 978-0470592045, 201-212, 2012 318 ページ</p>

様式21

<p>産業財産権 出願・取得 状況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/p10cell/index.html</p>
<p>国民との科 学・技術対 話の実施状 況</p>	<p>2013年10月28日、都立戸山高等学校1～3年生を対象とした出張講義を行った。参加者は生徒12名とその保護者。 標題「がん研究のはなし」 http://www.ncc.go.jp/jp/about/rinri/suishin/suishin_04.html</p> <p>2012年11月19日、東京都広尾学園高等学校 医進・サイエンスコースの生徒・教諭が当研究室を訪問見学。 http://www.ncc.go.jp/jp/about/rinri/suishin/suishin_03.html</p> <p>2012年7月21日、東京都広尾学園高等学校の1～3年(約40名)を対象とした出張講義を行った。 標題「テロメラーズ新規機能とがん幹細胞」 http://www.ncc.go.jp/jp/about/rinri/suishin/suishin_02.html</p> <p>2011年12月16日、東京都立両国高校1年生(約200名)を対象とした出張講義を行った。 標題「がん研究って？」 http://www.ncc.go.jp/jp/about/rinri/suishin/suishin_01.html</p>
<p>新聞・一般 雑誌等掲載 計 2 件</p>	<p>1. 教育応援 vol.20 2013年12月、22ページ 「がん」で生命科学の最前線を学ぶ</p> <p>2. 科学新聞、2011年7月22日 「ガン幹細胞の機能維持に関わる遺伝子群を同定 人工ガン幹細胞モデル作成」</p>
<p>その他</p>	

7. その他特記事項