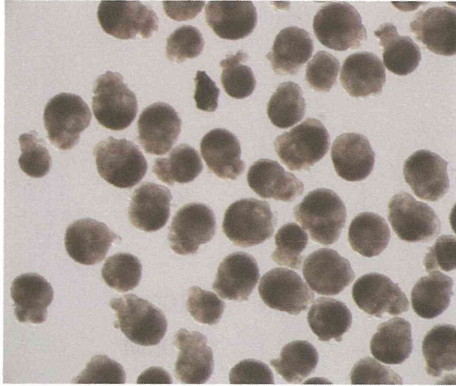


1000nM BPA添加8日後のEBの実体顕微鏡写真

Wild



Malat-1ホモ欠失



図 7. Wild 及び Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞に 1000nM BPA 添加 8 日後に形成された EB の実体顕微鏡写真

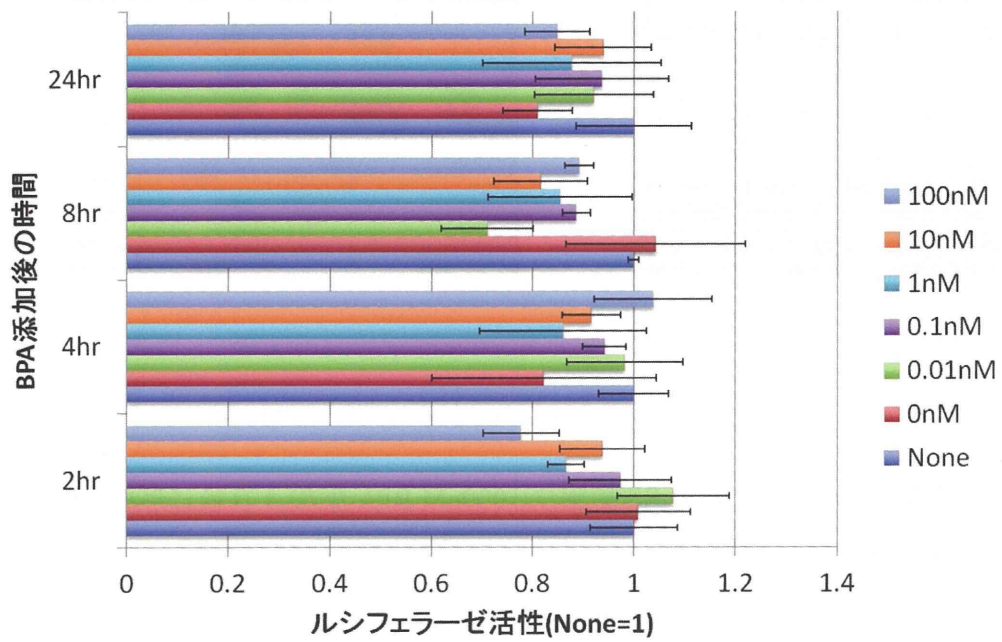


図 8. BPA 添加 ES 細胞を用いた Malat-1 遺伝子発現のルシフェラーゼアッセイ結果

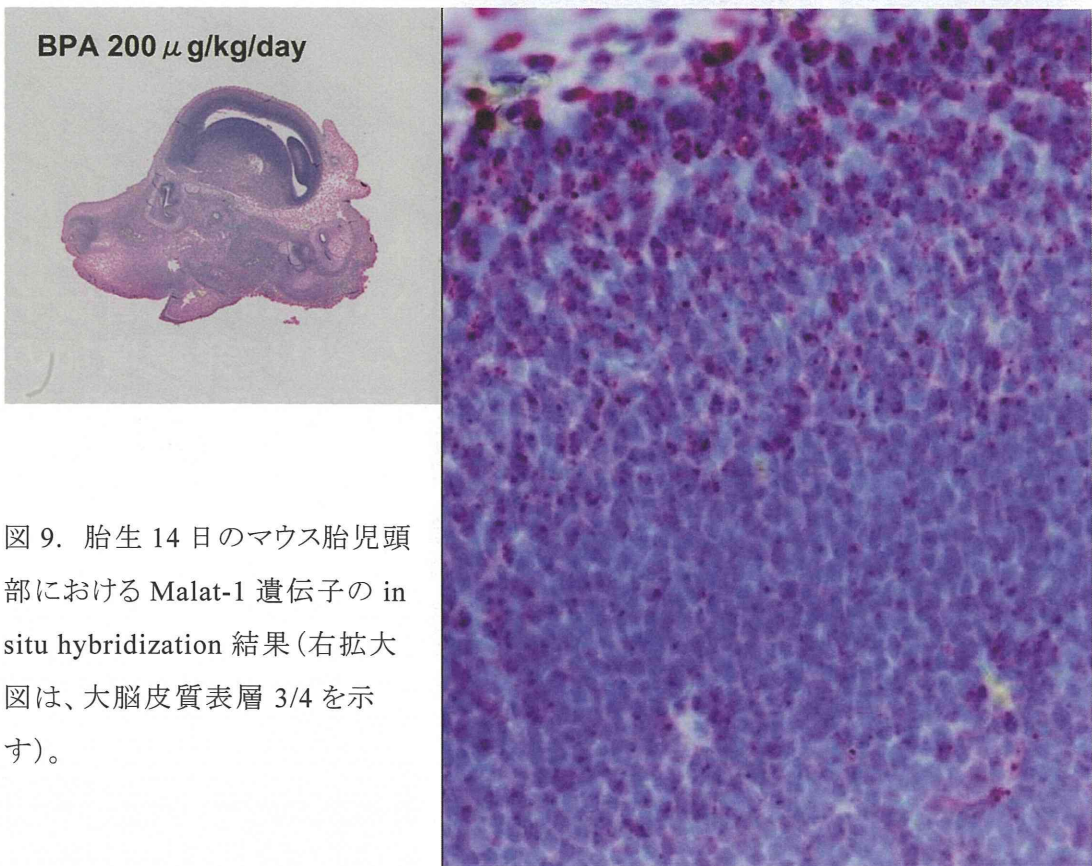
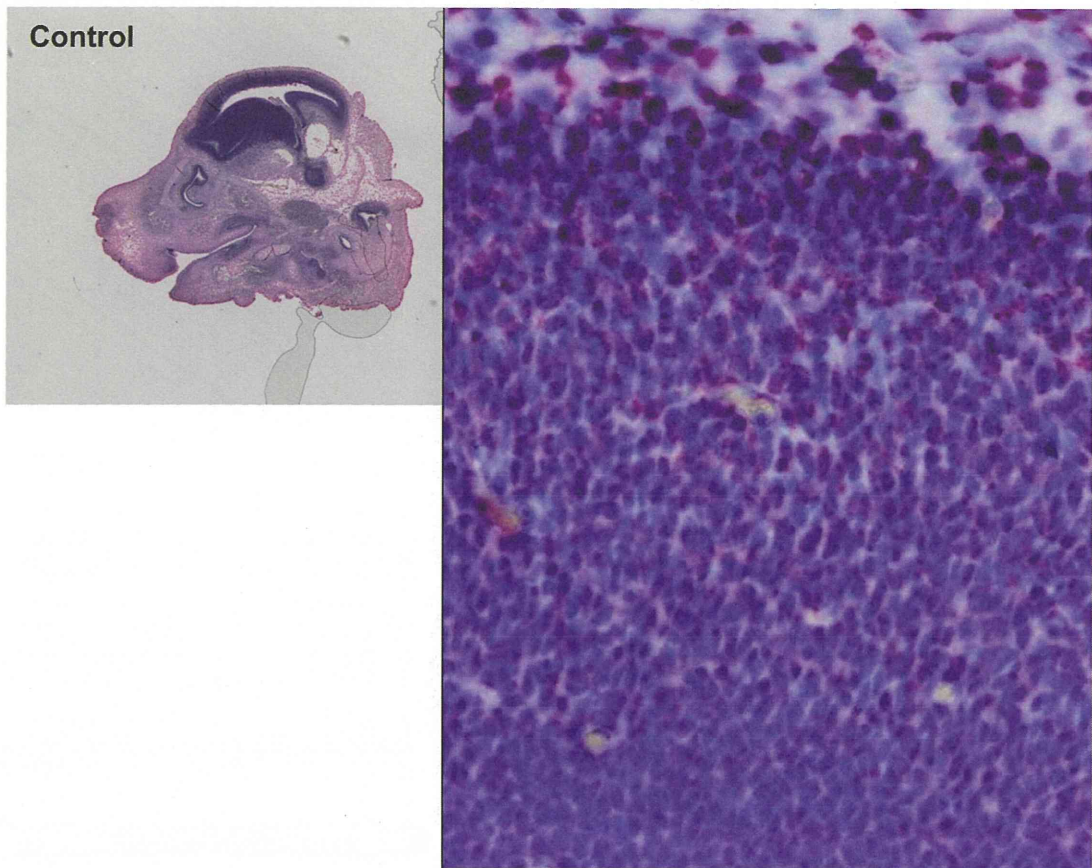


図9. 胎生14日のマウス胎児頭部における Malat-1 遺伝子の in situ hybridization 結果(右拡大図は、大脳皮質表層 3/4 を示す)。

平成25年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

研究課題名：化学物質の子どもへの影響評価に関する研究-発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、それに基づく試験スキームの最適化-
(H23-化学-一般-002)

化学物質による遅発影響標的分子としてのmRNA修飾機構の解析、 及びOECD/WHO対応

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

菅野 純

高木 篤也

五十嵐 勝秀

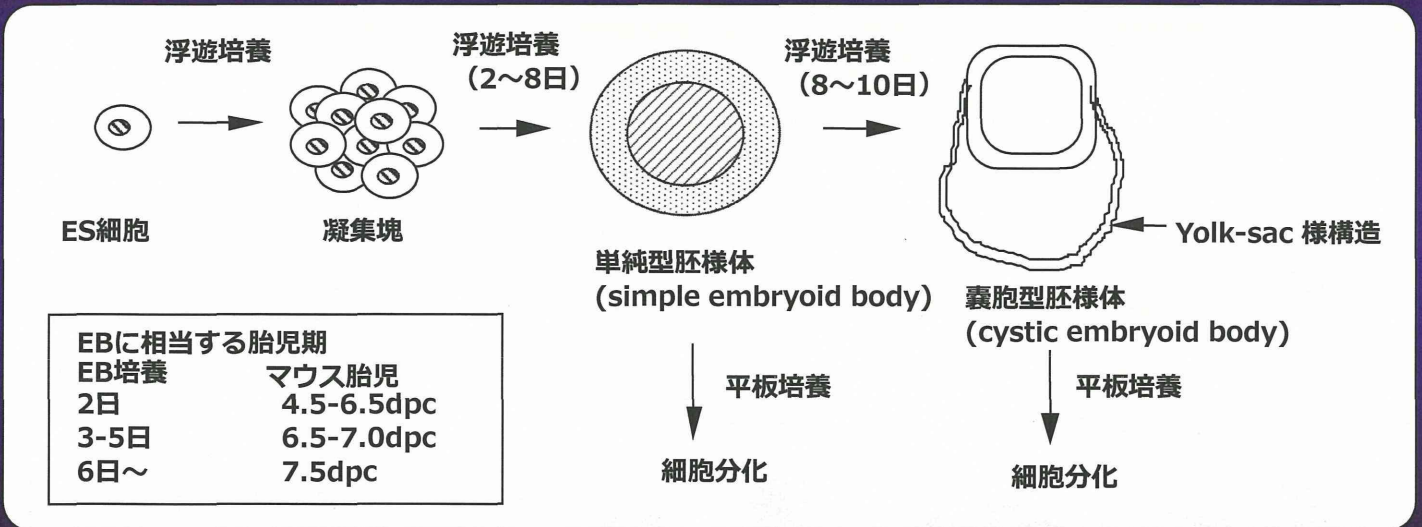
安彦 行人

目 的

本研究は、ES細胞から形成された胚様体において、低濃度BPAで発現増加することを見出したnon-coding RNAのMalat-1遺伝子の発現増加の分子機構、*in vivo*での標的臓器、ならびに発現増加の毒性学的意義を分子生物学的手法、発生工学的手法を用いて明らかにする。

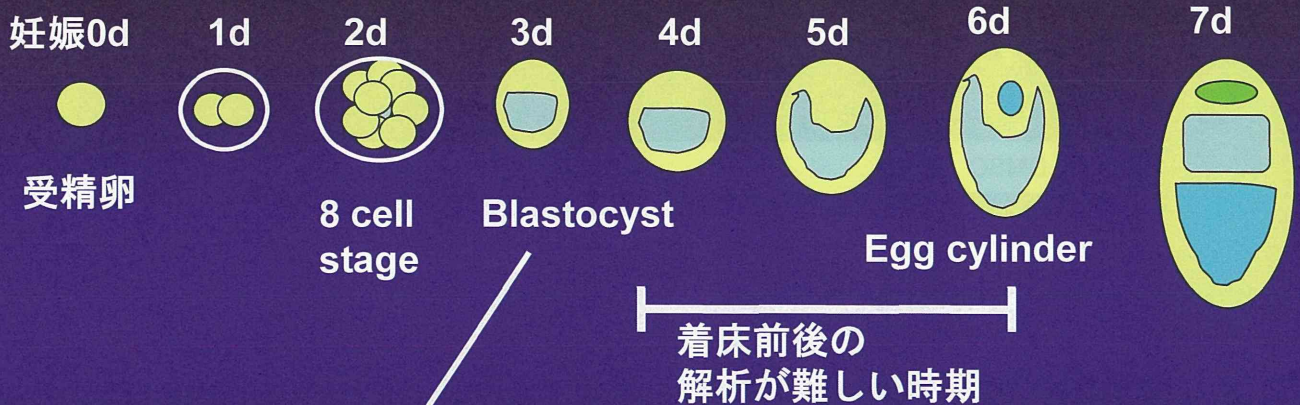
ES細胞と胚様体(Embryoid body)

ES細胞の天井培養によるEBの形成

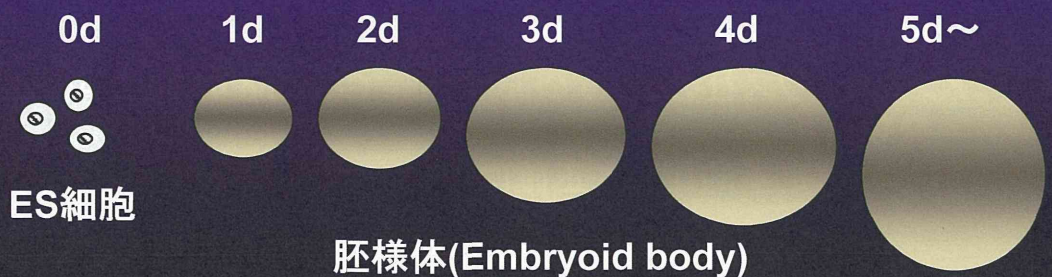


胎児とES細胞/胚様体の比較

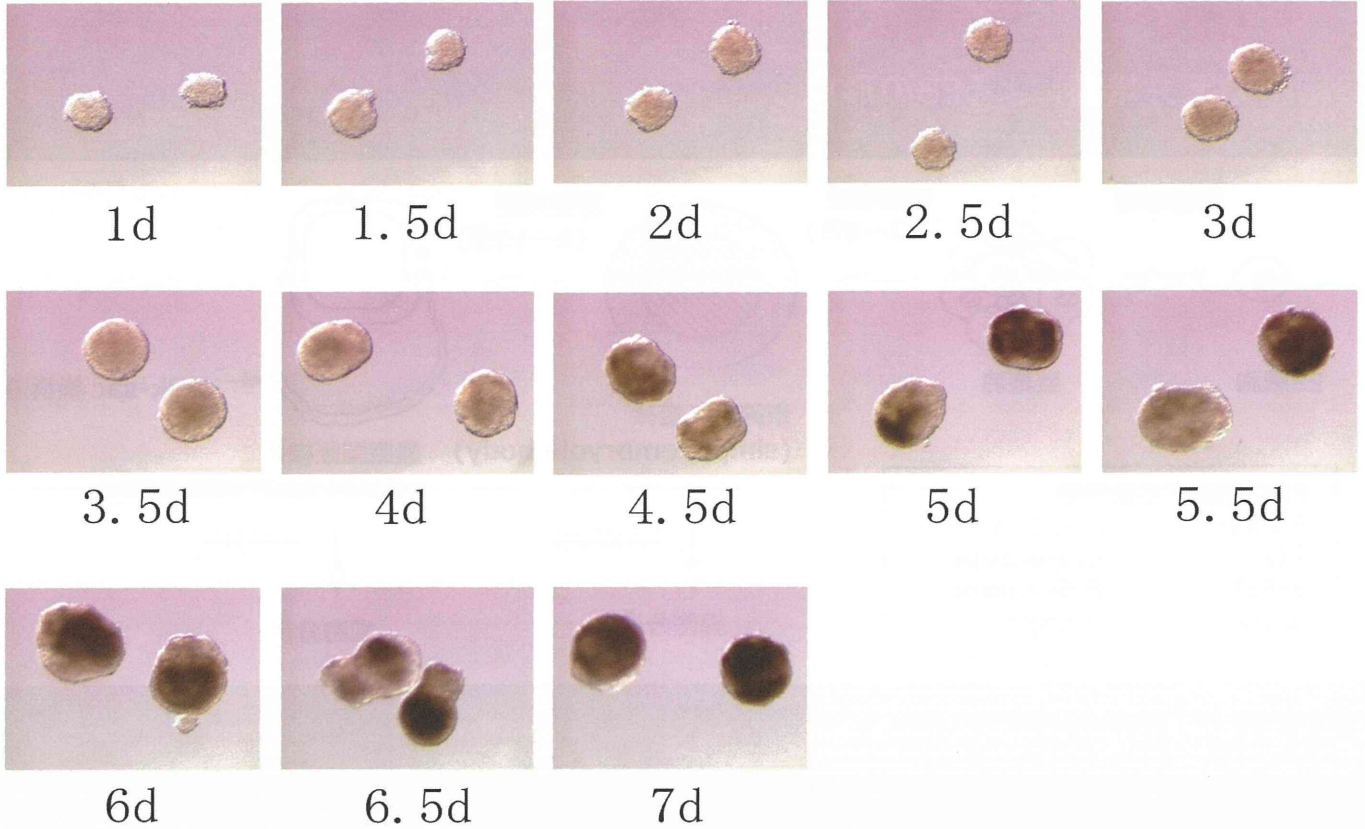
In vivo



In vitro

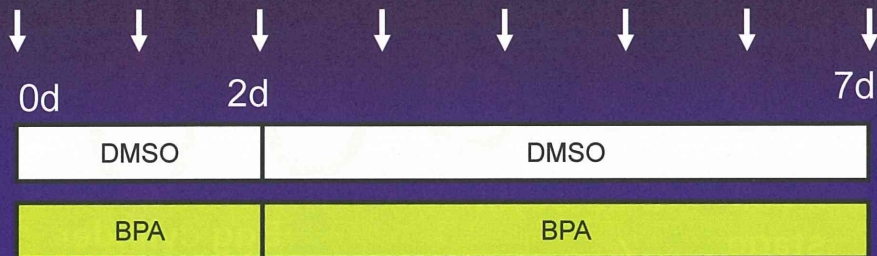


TT2 ES細胞由来EBの形態の経時的変化



実験プロトコール

- ・細胞: ES 細胞 (TT2)
- ・培養: 7日間の浮遊培養



- ・培地: LIF(-)のES細胞培養用培地
- ・化合物: Bisphenol-A (1nM)
- ・溶媒: DMSO (final 0.1%)
- ・サンプリング: 0日(ES)と、1日目から1日ごとに7日目までのEmbryoid body (EB)を採取し、それぞれ独立に実験を行った。
- ・測定: アフィメトリクス社のGene Chip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて遺伝子発現解析。
解析には定量的比較を正確に行うために、Percellome法を用いた。

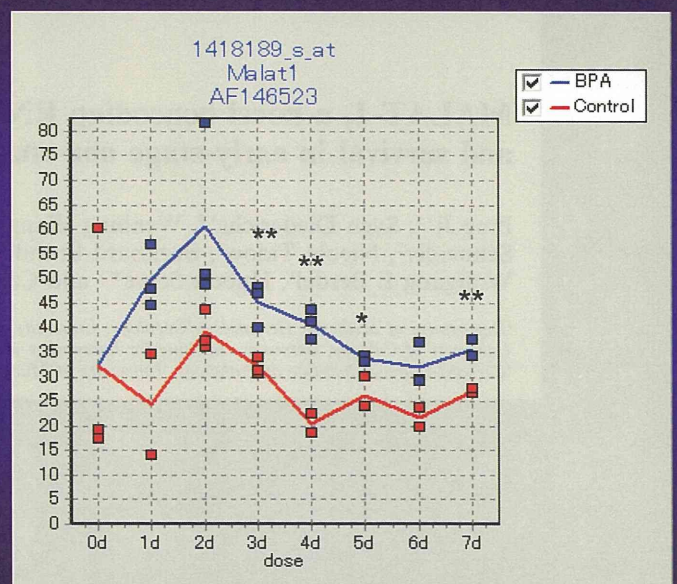
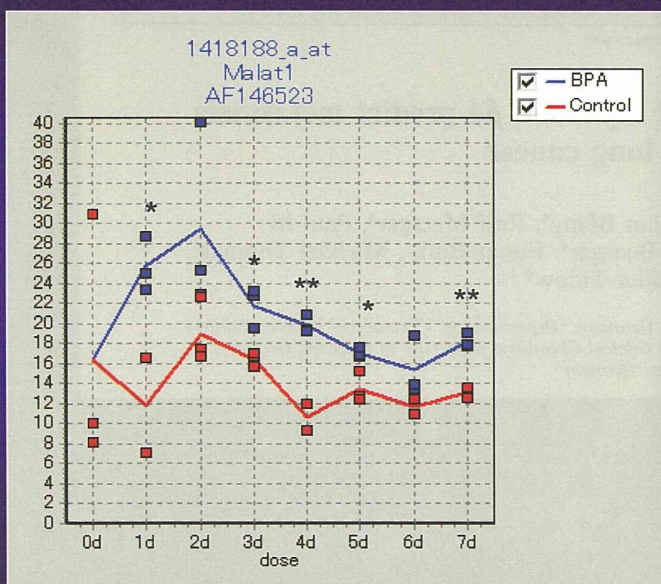
有意に変動した遺伝子数

| | Up | Down |
|----|------|------|
| 1d | 3880 | 217 |
| 2d | 426 | 128 |
| 3d | 361 | 199 |
| 4d | 757 | 612 |
| 5d | 1016 | 364 |
| 6d | 290 | 874 |
| 7d | 967 | 89 |

| Time point | Up | Down |
|------------|------|------|
| 7 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 0 |
| 4 | 5 | 3 |
| 3 | 77 | 21 |
| 2 | 1673 | 300 |
| 1 | 1275 | 458 |

45101 probe set中、 $p < 0.05$

Malat-1遺伝子の発現増加

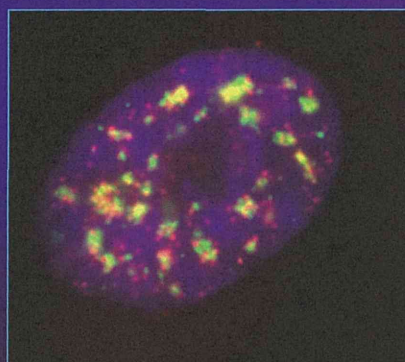


Malat-1遺伝子

(Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)

- ・転移性肺がん細胞で発現が高い遺伝子として発見された(2003)。
- ・核スペckルに存在するnon-coding RNAでスプライシング因子と共存し、スプライシングを制御していると考えられている。

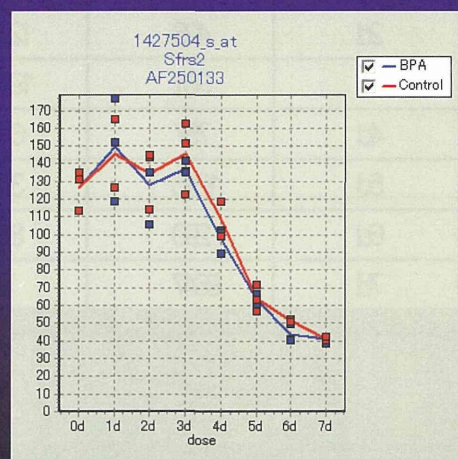
Malat-1遺伝子の核内局在



human fibroblast
Malat1 (red)
SC35
スプライシング因子

BMC Genomics, 8,
39, 2007より

ES/EB分化系でのSC35(sfrs2)の発現パターン



Oncogene (2003) 22, 8031-8041

© 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/03 \$25.00

www.nature.com/onc



MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer

Ping Ji^{1,5}, Sven Diederichs^{1,5}, Wenbing Wang¹, Sebastian Böing¹, Ralf Metzger², Paul M Schneider², Nicola Tidow³, Burkhard Brandt³, Horst Buerger⁴, Etmar Bulk¹, Michael Thomas¹, Wolfgang E Berdel¹, Hubert Serve^{*.1} and Carsten Müller-Tidow^{*.1}

¹Department of Medicine, Hematology/Oncology, University of Münster, Germany; ²Department of Visceral and Vascular Surgery, University of Cologne, Germany; ³Institute for Laboratory Medicine and Clinical Chemistry, University of Münster, Germany; ⁴Gerhard-Domagk-Institute of Pathology, University of Münster, Münster, Germany

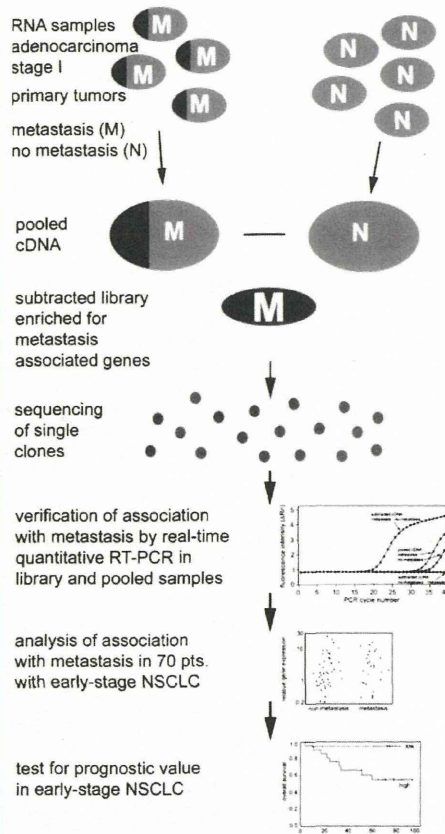


Figure 1 Experimental overview and example of subtraction procedure. RNA samples from tumors that subsequently metastasized (M) or did not metastasize (N) were pooled and subjected to subtractive hybridization. The resulting library was cloned and sequenced. The reliability of the subtractive hybridization was confirmed by real-time quantitative RT-PCR in the pooled samples and in the subtracted library. Then, the identified genes were analysed in 70 NSCLC patients

Table 1 Metastasis-associated transcripts in NSCLC identified by subtractive hybridization

| Accession number | No. of clones | Name | Chromosomal localization | Complete name | Quantitative RT-PCR (fold increase) |
|------------------|---------------|-------------------|--------------------------|--|-------------------------------------|
| AF203815 | 22 | MALAT-1 | 11q13 | Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 | 3.2 |
| XM_007650 | 21 | B2M | 15q21-q22 | Beta-2-microglobulin | |
| NM_021109 | 9 | TMSB4X | Xq21.3-q22 | Thymosin β 4, X chromosome | 1.02 |
| XM_005047 | 9 | RPL7 | 8q | Ribosomal protein L7 | |
| NM_001829 | 6 | CLCN3 | 4q33 | Chloride channel 3 | |
| NM_002933 | 5 | RNASE1 | Chr.14 | Ribonuclease, RNase A family, 1 | |
| XM_009451 | 5 | NPCR/PLUNC | 20q11.2 | (palate lung and nasal epithelium clone); tracheal epithelium-enriched protein | 46.2 |
| AK026534 | 4 | FLJ22881 | | Ferritin L chain | |
| NM_014302 | 4 | Sec61G | | Sec61 γ | 7.9 |
| XM_009292 | 4 | IFI30 | | Interferon, γ -inducible protein 30 | |
| AC010196 | 3 | RP11-202H2 | 12q seeder | | |
| XM_004738 | 3 | EGFR | 7p12.3-p12.1 | Epidermal growth factor receptor | |
| AF267861 | 3 | EF1a-like protein | 6q14 | Eucaryotic translation elongation factor 1 | |
| AF178581 | 3 | NCG | | Nasopharyngeal carcinoma gene sequence | |
| J03537 | 3 | RPS6 | 9p21 | Ribosomal protein S6 | |
| HS644L1 | 3 | RP4-644L1 | 20q12 | Kreisler (mouse) maf-related leucine zipper homolog | |
| D82059 | 2 | MRLC3 | 18 | Myosin regulatory light chain 3 | 4.6 |
| XM_002929 | 2 | NDUFB4 | | NADH dehydrogenase (ubiquinone) I, subcomplex, 4 | |
| XM_004073 | 2 | PGC | 6p21.3-p21.1 | Progastricsin (pepsinogen C) | |
| XM_008923 | 2 | RPS11 | 19q | Ribosomal protein S11 | |
| BC001392 | 2 | RPS27a | Chr.1 | Ribosomal protein S27a | |
| BC007273 | 2 | RPL27 | | Ribosomal protein L27 | |
| AF118092 | 2 | PRO2061 | | | |
| AK022248 | 2 | FLJ12186 | | Weakly similar to ACTIN | |
| AF147331 | 2 | YB24D08 | | | |
| Y00052 | 2 | CYPs | 5q23 | mRNA for T-cell cydophilin | |
| XM_007192 | 1 | TPT1 | 13q12-q14 | Tumor protein, translationally controlled 1 | 4.1 |
| XM_005403 | 1 | EHM2 | 9 | | 3.4 |
| XM_002072 | 1 | SSR2 | 1q21-q23 | Signal sequence receptor, β (translocation-associated protein β) | 3.0 |
| NM_001416 | 1 | eIF4A1 | 17p13 | Eucaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1 | 2.3 |
| NM_002719 | 1 | PPP2R5C | | Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, γ isoform | 1.7 |
| AF144029 | 1 | MDM2 | 12q14.3-q15 | MDM2 gene, intron 9 and exon 10 | 1.4 |

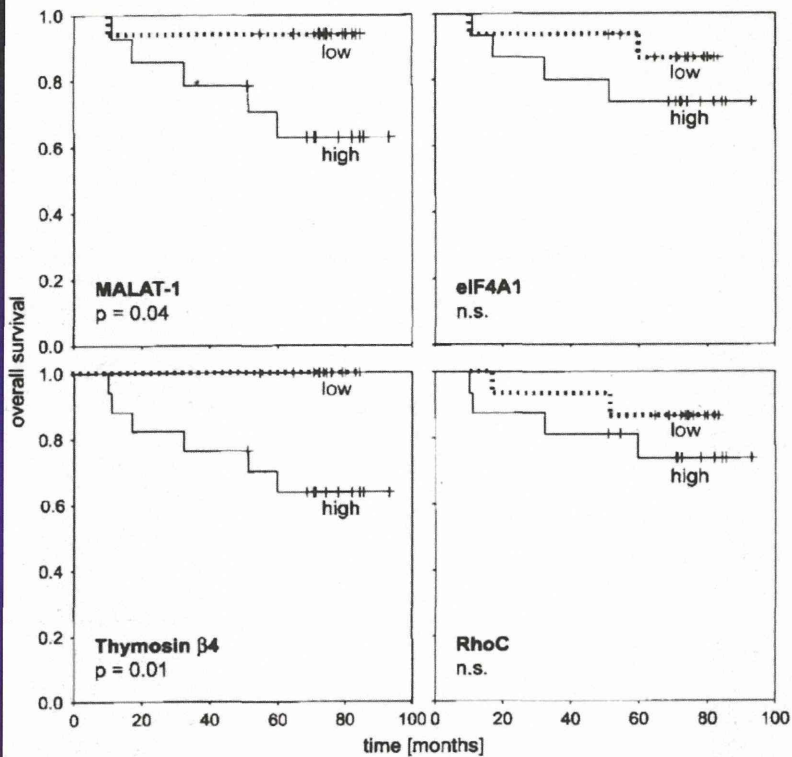
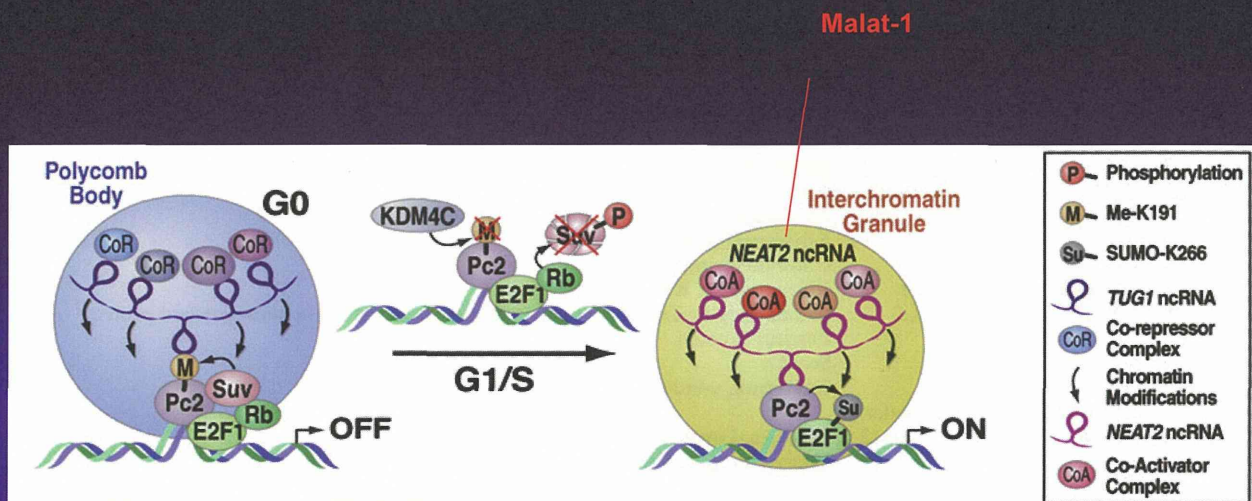


Figure 3 Identification of genes that predict prognosis in stage I NSCLC. Patients were grouped for each gene in high vs low expressing tumors based on its gene expression in comparison to the median expression of all tumors. The Kaplan–Meier survival plots are shown for patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma and stage I disease ($n = 31$). The log-rank test was used to calculate statistical significance



Cell, 147, 773, 2011より

HeLa細胞において増殖刺激により脱メチル化されたPC2により増殖コントロール遺伝子がポリコームからinterchromatin granuleへ移動する。NEAT2 (Malat-1)はPC2とCoActivatorを結合することにより、遺伝子発現制御に関与している。