

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14987

研究課題名(和文)新規がんlncRNAが制御するエピジェネティクスと細胞増殖メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of epigenetics and cell proliferation mechanism controlled by novel cancer lncRNA

研究代表者

野中 綾 (Nonaka, Aya)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：50786621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNA-seqとb-カテニン-ChIP-seqの組み合わせにより、新規b-カテニン標的lncRNA 12Rを同定した。12Rの抑制は細胞増殖を減少させ、CRISPR/Cas9を用いた12Rのノックアウトは異種移植モデルにおける腫瘍形成を阻害する。12Rの抑制は、b-カテニン発現変化なしに、H3K27Acおよびb-カテニン標的遺伝子の発現を抑制した。b-cateninとTCF12またはASCL2との結合は、12Rによって引き起こされるH3K27Acの変化領域の多くにおいて観察された。まとめると、12Rはb-カテニン標的発癌性lncRNAおよびプロモーターWnt標的遺伝子発現である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナリングの異常から活性化する下流のb-カテニンの標的遺伝子は、これまで多くの報告がなされている。その中で本研究により明らかにされたlncRNA12Rは癌細胞のみで発現している分子である。この12Rはb-カテニンの標的遺伝子の発現を正に制御するが、12Rを標的とする事で、正常細胞でも発現しているb-カテニンノの転写制御機能を阻害することなく、癌細胞のみで制御される標的遺伝子を抑制し腫瘍形成を阻害する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a novel β -catenin-target lncRNA, 12R, by combination of RNA-seq and β -catenin-ChIP-seq. 12R is overexpressed in colorectal tumors with APC mutation. Repression of 12R reduced cell proliferation, and knockout of 12R using CRISPR/Cas9 inhibits tumorigenesis in xenograft model. Repression of 12R suppressed H3K27Ac and the expression of β -catenin target genes without β -catenin expression change. Binding of β -catenin and TCF12 or ASCL2 was observed in many of the change regions of H3K27Ac caused by 12R. Collectively, 12R is a β -catenin target oncogenic ncRNA and promoter Wnt target gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：lncRNA 癌 Wnt b-カテニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは近年罹患する割合が増加し、生命に深く関わる疾患である。近年の研究により遺伝子の欠損・変異だけではなく DNA・ヒストン修飾 (エピジェネティクス) に関する機構の調節不全ががんを引き起こす事が明らかになってきている。

これまでのがん研究では、ゲノム全領域の 1%以下にあたるタンパク質をコードする RNA に注目してきたが、超並列シーケンスの発展により網羅的に全転写産物の発現解析が行えるようになると、その中で 200 nt~100 kb にわたり発現しているコーディング領域を欠く RNA (long non-coding RNAs, 以下 lncRNAs) も予測や診断に用いられるようになった。この lncRNA ががんにおいて異常な発現をし、エピジェネティクス制御に関わるという報告もなされているが、がん進展にどのように関与しているか明確なメカニズムが示されているものは多くはない。

また組織の分類ごとにそれぞれエピジェネティクスマークを比較すると、コーディング遺伝子の転写開始点 (Transcript Start Site, TSS) におけるヒストン修飾よりも lncRNA のそのの方が組織特異性が高いことが知られている (Viren Amin *et al.*, *Nat Commun*, 2015)。このことにより、lncRNA の発現は細胞・組織の運命づけと密接に相関していることを意味し、lncRNA を標的としてがん進展のメカニズムを解明することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は -カテニンにより制御される RNA であり、腫瘍細胞特異的に発現亢進している新規がん長鎖非コード RNA (long non-coding RNA, lncRNA) である 12R を同定した。本研究ではこの 12R の機能解析を行い、がん発生及び細胞増殖メカニズムへの関与について解明する。

12R が細胞増殖やヒストン修飾制御に関与している事がこれまでの研究により示唆されている。このように 12R がクロマチン制御を制御することによって、発現変動する遺伝子により細胞増殖を誘導するという仮説に基づき、腫瘍特異的に発現する 12R の役割を包括的に解析することを試みる。12R が関与する腫瘍増殖及びヒストン修飾制御に関与する機構を明らかにするため、(1) どのようにヒストン修飾を変化させ、また (2) どのように修飾するゲノム領域を決定しているのかを解明する。さらに 12R の発現による (3) 遺伝子発現変化を明らかにし、その結果 12R ががん細胞の増殖を誘導するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 12R の発現を抑制した大腸がん細胞 SW480 とその親株を RNA-seq によって遺伝子発現を比較する事で、12R の発現抑制によって発現量の変化する遺伝子を同定する。得られた遺伝子発現解析の結果について、GSEA プログラムを用いて、12R の発現抑制によって変化する特徴的なシグナル経路を抽出する。

(2) 12R の発現変化により引き起こされる H3K27Ac の修飾変化領域を選び出し、特異的に濃縮する転写因子の結合配列モチーフを論文で報告されている解析プログラム HOMER (GSE21512) を用いて選び出す。この解析により 12R と協調的に働く転写因子の候補因子を選出する。

(3) 候補転写因子の結合領域を同定するために ChIP-seq を行う。得られた結果とすでに同定された 12R 抑制により変化する H3K27Ac 領域と比較し、12R が直接制御するヒストン制御領域を同定する。

4. 研究成果

本研究は多くのがんで恒常的に更新している Wnt シグナルに注目し、-カテニンの標的 lncRNA である 12R の機能解析を行い、がん発生および細胞増殖メカニズムへの関与を明らかにすることである。12R のノックアウト細胞を大腸がん細胞株 SW480 に対して CRISPR/Cas9 システムを用い、12R 抑制株クローン 1 とクローン 2 を樹立した。12R の発現抑制は細胞増殖およびマウス異種移植による腫瘍形成能を低下させた (図 1)。

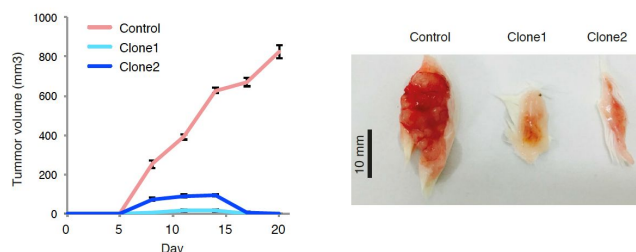


図 1. 12R 抑制細胞株のマウス異種移植による腫瘍形成

また、12R の抑制時に発現が低下する遺伝子群の GO 解析を行うと、Wnt シグナルが濃縮していることが明らかになった(図2)。このことから、12R は β -カテニンの標的 lncRNA であると同時に、 β -カテニンの下流の遺伝子群の発現制御に関与していることが予想された。

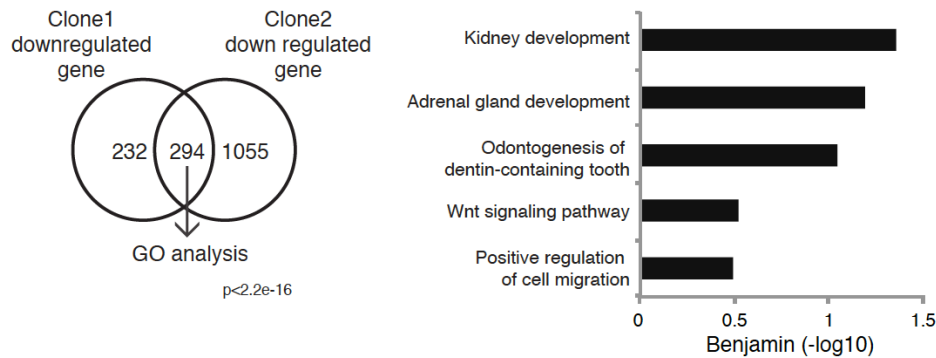


図2. 12R 抑制株における発現抑制遺伝子群の解析

12R が制御する標的遺伝子を同定するために、12R の発現の有無による H3K27Ac 修飾の低下領域のモチーフ解析を行い、低下領域には β -カテニンとベータ-ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 転写因子ファミリーの結合配列が有意に濃縮されることが明らかになった(図3)。このことから、12R の標的遺伝子の制御には β -カテニンと bHLH の両転写因子が関与していることが予測された。

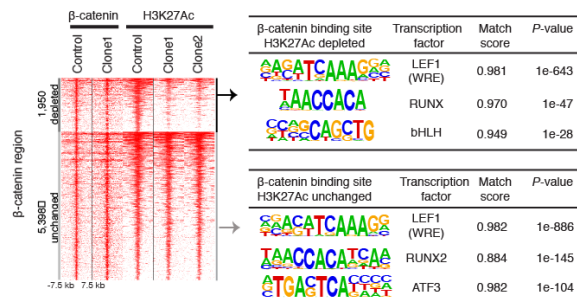


図3. 12R 発現抑制による H3K27Ac 修飾変化と β -カテニン結合領域のモチーフ解析

実験に用いた細胞で発現が高い bHLH 転写因子の ChIP-seq 解析を行うと、H3K27Ac の低下領域と bHLH 転写因子の結合が一致した。bHLH はヘテロダイマーを形成するが、今回同定した bHLH 転写因子も使用細胞で複合体を形成していることが IP1B により確認された。bHLH 転写因子の一つは β -カテニンの標的分子であり幹細胞の制御に重要であると報告されており、12R の発現低下に伴い bHLH 転写因子の発現も低下していた。このことは 12R の抑制で異種移植による腫瘍形成能を低下させたこと、また 12R が完全にノックアウトされたクローンを得ることができなかったと関連すると考えられる。12R は bHLH 転写因子と直接結合することが RNA 免疫沈降 (RIP)-PCR により確認されたが、 β -カテニンとの直接の結合は認められなかった(図4)。まとめると、Wnt シグナルが亢進する一部のがんで発現する lncRNA12R は bHLH 転写因子群と相互作用し β -カテニンの近傍に結合し、H3K27Ac の修飾を亢進し標的遺伝子の発現を活性化させる。その結果、Wnt シグナルの一部の発現制御を担いがん化に寄与していると推測される(図5)。

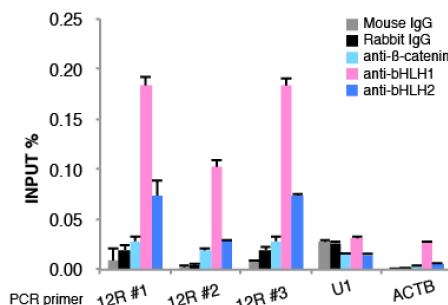


図4. 12R と転写因子との相互作用

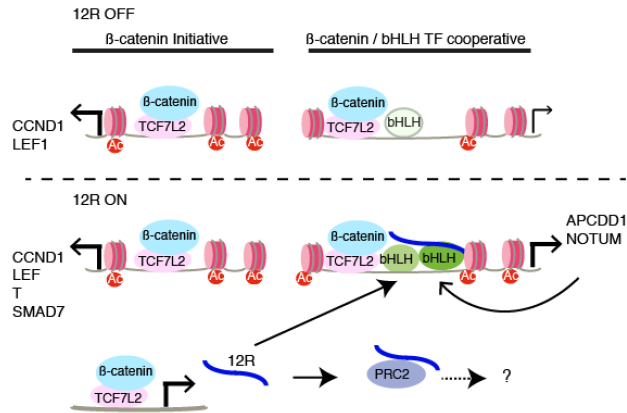


図 5 . 12R と β -カテニンおよび bHLH による標的遺伝子の発現制御の模式図

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

発表者：野中綾

β -catenin-regulated long noncoding RNA activates cell proliferation and tumorigenicity in colon cancer

第 76 回 日本癌学会学術総会 2017 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。