

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14995

研究課題名（和文）膠芽腫における機能性長鎖非翻訳RNAの探索および機能解析

研究課題名（英文）Global analysis of long non-coding RNA during gliomagenesis

研究代表者

勝島 啓佑 (Katsushima, Keisuke)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00754053

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）：長鎖非翻訳RNA（long non-coding RNA, lncRNA）による遺伝子発現制御は様々な生命現象に関わっており、近年ではがんの発生や進展への関与も明らかになりつつある。本研究では膠芽腫を自然発生する遺伝子改変マウスを用いて、腫瘍形成過程におけるlncRNAの発現変動を解析した。その結果、腫瘍形成過程において発現が増加するLnc-1、Lnc-2は正常脳組織と比較し、膠芽腫において有意な発現の亢進を認めた。さらにヒト膠芽腫細胞ではLnc-1、Lnc-2の発現抑制が増殖抑制効果を示すことから、Lnc-1、Lnc-2は膠芽腫の形成や進展に関わるlncRNAであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膠芽腫自然発生マウスモデル、ヒト膠芽腫細胞株を用いて腫瘍形成に重要な役割を果たす長鎖非翻訳RNA（long non-coding RNA, lncRNA）を複数同定した。本研究結果により得られた知見は、現在までに効果的な治療法が確立されていない膠芽腫に対する治療戦略を考案するうえで重要な学術的意義、社会的意義を有するものであると考える。

研究成果の概要（英文）：Control of gene expression by long non-coding RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) is related to various biological processes. In recent research, lncRNA has been shown to be involved in the development and progression of cancer. In this study, we analyzed the lncRNA expression during tumorigenesis using genetically modified mice that naturally generate glioblastoma. As a result, Lnc-1 and Lnc-2, whose expression was increased during tumorigenesis, were significantly enhanced in glioblastoma in comparison with normal brain tissue. Furthermore, in human glioblastoma cells, suppression of Lnc-1 and Lnc-2 expression has a growth inhibitory effect, suggesting that Lnc-1 and Lnc-2 are lncRNAs involved in glioblastoma formation and progression.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：長鎖非翻訳RNA

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

## 1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍である膠芽腫にはゲノム異常に加え、多彩な“エピゲノム”異常が蓄積している。近年、遺伝子特異的にエピゲノムを誘導する分子として“長鎖非翻訳 RNA (lncRNA)”が注目されている。これまでに研究代表者は lncRNA のひとつである TUG1 が膠芽腫の“脳がん幹細胞”のエピゲノムを調節し、脳がん幹細胞の維持や腫瘍形成を促進することを見出している。lncRNA は腫瘍形成において紛れもなく重要なファクターであり、有効な膠芽腫の治療法を開発する上で、有望な治療標的になりうる。

## 2. 研究の目的

本研究では (1) 腫瘍の発生や悪性化に関わる lncRNA の同定、(2) ヒト-マウス間で高い保存性を有する lncRNA の抽出、(3) lncRNA の発現阻害に対する抗腫瘍効果の評価を行い、膠芽腫形成に関わる lncRNA を包括的に探索し、膠芽腫に対する新規治療標的として提示する。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍の発生や悪性化に関わる lncRNA の同定

MADM マウス生後 6 日目、60 日目、150 日目 (MUT P6、60、150) における遺伝子発現変動を microarray (Agilent.SingleColor.28005) にて解析した。解析には正常マウス生後 6 日目 (WT P6) における遺伝子発現状態を比較対象とした。

### (2) lncRNA 発現阻害に対する抗腫瘍効果の検証

(1) の解析より同定した lncRNA の発現を阻害する核酸を作製し、ヒト膠芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果の評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍の発生や悪性化に関わる lncRNA の同定

#### 1. 腫瘍形成過程における lncRNA の発現変動解析

MADM マウス生後 6 日目、60 日目、150 日目 (MUT P6、60、150) における lncRNA 発現を解析したところ、150 日目で発現上昇した 898 種類の lncRNA ならびに発現低下した 696 種類の lncRNA を同定した。このうちヒト-マウス間において高い保存性 (>200 bp、>80%) を示す lncRNA はそれぞれ 6、8 lncRNA であった (図 1)。

#### 2. 腫瘍形成前における lncRNA の発現変動解析

MADM マウス生後 6 日目における腫瘍細胞 (MUT P6)、正常細胞 (WT P6) の lncRNA 発現状態を解析したところ、腫瘍細胞で発現上昇した 211 種類の lncRNA ならびに発現低下した 145 種類の lncRNA を同定した。このうちヒト-マウス間において高い保存性 (>200 bp、>80%) を示す lncRNA はそれぞれ 3、2 lncRNA であった (図 2)。

#### 3. ヒト膠芽腫における lncRNA の発現解析

公共のデータベース (The Cancer Genome Atlas: TCGA) を用いてヒト膠芽腫における lncRNA 発現と比較解析を行った結果、腫瘍形成過程において発現が増加する Lnc-1、Lnc-2 は正常脳組織 (Normal) と比較し、膠芽腫 (GBM) において発現の亢進を認めた (図 3)。

### (2) lncRNA 発現阻害に対する抗腫瘍効果の検証

Lnc-1 及び Lnc-2 内には miRNA cluster がコードされており、ヒト膠芽腫細胞において Lnc-1、-2 の発現を阻害させると、cluster 内に存在する miR (a-h) の発現低下及び細胞増殖抑制を示した。さらに Lnc-1、Lnc-2 の発現阻害時に miRNA cluster を過剰発現させることで、増殖抑制効果が解除された (図 4)。

本研究において同定した Lnc-1、Lnc-2 は MADM マウスにおいて発がん早期より発現上昇を示し、ヒト膠芽腫細胞では Lnc-1、Lnc-2 の発現阻害が増殖抑制効果を示すことから、膠芽腫の形成や進展に関わる重要な lncRNA であることが示唆された。今後、miR-a-h に対する標的遺伝子を同定し、膠芽腫の形成や進展における Lnc-1、Lnc-2 の役割を解析する。さらに MADM マウスやヒト膠芽腫細胞の移植モデルを用いて、Lnc-1、Lnc-2 発現抑制による腫瘍形成能や腫瘍悪性化への影響を解析する予定である。

図1. 腫瘍形成過程におけるlncRNAの発現変動解析

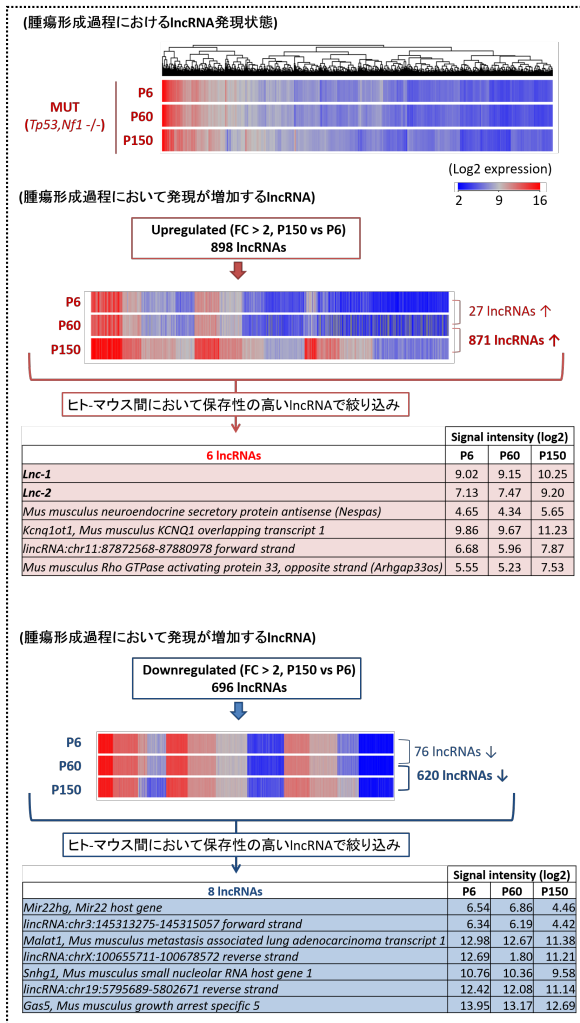


図2. 腫瘍形成前におけるlncRNAの発現変動解析

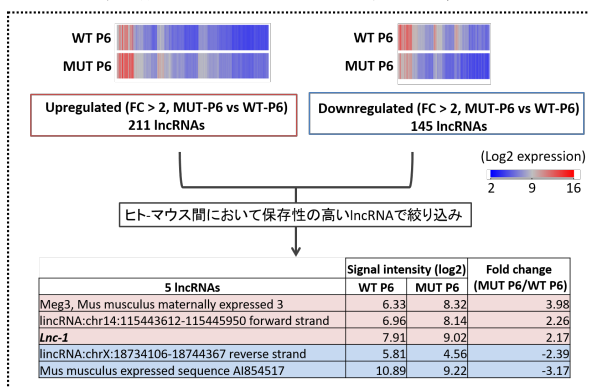


図3. ヒト膠芽腫におけるlncRNAの発現解析

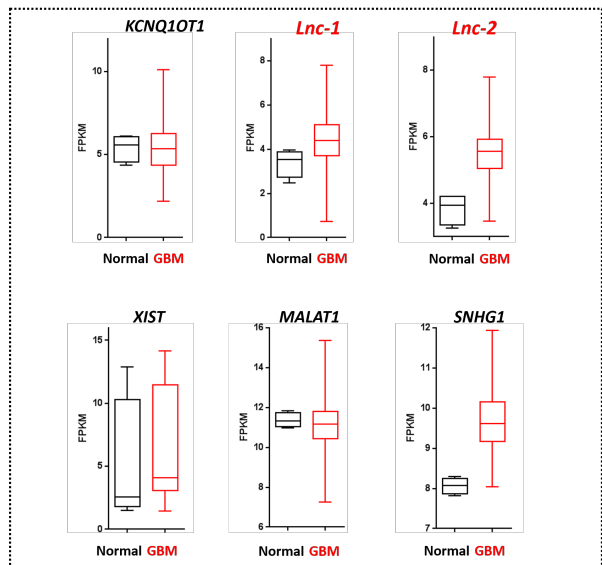
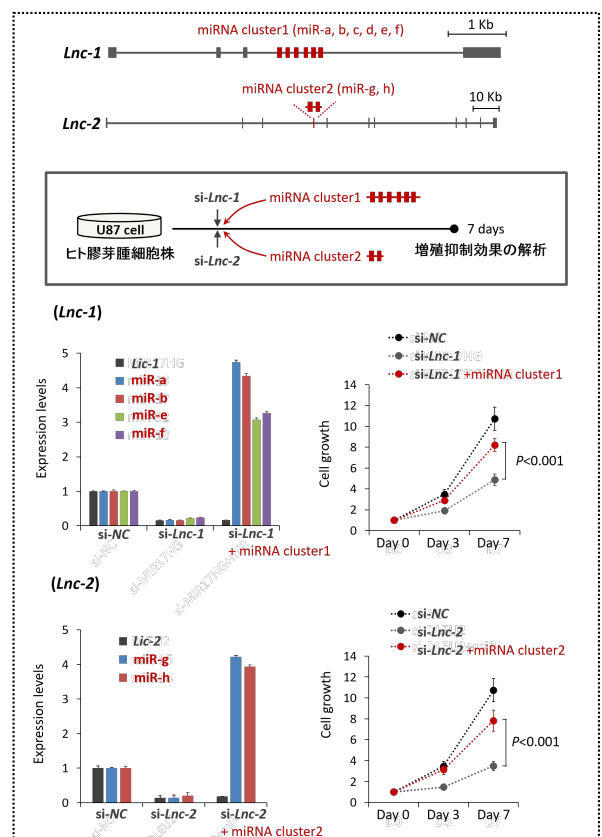


図4. *Lnc-1*, *Lnc-2*発現阻害による増殖抑制効果の解析



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Murashima A, Shinjo K, Katsushima K, Onuki T, Kondoh Y, Osada H, Kagaya N, Shinya K, Kimura H, Yoshida M, Murakami S, Kondo Y, Identification of a Chemical Modulator of EZH2-mediated Silencing by Cell-based High-throughput Screening Assay, *J Biochem*, 査読有, 2019, *In press*

DOI: 10.1093/jb/mvz007

勝島啓佑, 鈴木美穂, 近藤豊, EZH2 阻害剤の作用原理と開発現状, 「医学のあゆみ」, 査読無, 266 巻, 2018, 18932-18938

鈴木美穂, 勝島啓佑, 近藤豊, 長鎖非コード RNA をターゲットにした膠芽腫の治療, 「Medical Science Digest」, 査読無, 44 巻, 2018, 238-240

勝島啓佑、近藤豊、長鎖非翻訳 RNA を標的とする革新的核酸治療薬の開発、「BIO Clinica」、査読無、1 巻、2018、28-33

田崎慶彦、勝島啓佑、近藤豊、がん幹細胞とエピゲノム制御、「がん転移学」、査読無、75 巻、2018、137-143

Mase S, Shinjo K, Totani H, Katsushima K, Arakawa A, Takahashi S, Lai HC, Lin RI, Chan MWY, Sugiura-Ogasawara M, Kondo Y, ZNF671 DNA methylation as a molecular predictor for the early recurrence of serous ovarian cancer, *Cancer Science*, 査読有、110 巻、2017、1105-1116

DOI: 10.1111/cas.13936

勝島啓佑、近藤豊、長鎖非翻訳 RNA を標的としたがん治療薬の開発、「腫瘍内科」、査読無、19 巻、2017、454-461

Kondo Y, Shinjo K, Katsushima K, Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers, *Cancer Science*, 査読有、108 巻、2017、1927-1933

DOI: 10.1111/cas.13342

Deguchi S, Katsushima K, Hatanaka A, Shinjo K, Ohka F, Wakabayashi T, Zong H, Natsume A, Kondo Y, Oncogenic effects of evolutionarily conserved noncoding RNA ECONEXIN on gliomagenesis, *Oncogene*, 査読有、36 巻、2017、4629-4640

DOI: 10.1038/onc.2017.88

#### 〔学会発表〕(計 5 件)

勝島啓佑、夏目敦至、大岡史治、出口彰一、新城恵子、柴田龍弘、宮田完二郎、片岡一則、近藤豊、Development of anticancer agents targeting long non-coding RNA、第 77 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2018

Katsushima K, Natsume A, Ohka F, Deguchi S, Shinjo K, Shibata S, Miyata K, Kataoka K, Kondo Y, Development of nucleic acid therapeutics targeting long non-coding RNA TUG1, Keystone Symposia meeting on: Noncoding RNAs: Form, Function, Physiology (国際学会) 2018

勝島啓佑、夏目敦至、大岡史治、出口彰一、新城恵子、柴田龍弘、宮田完二郎、片岡一則、近藤豊、長鎖非翻訳 RNA TUG1 を標的としたがん治療薬の開発、第 76 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2017

勝島啓佑、夏目敦至、大岡史治、出口彰一、新城恵子、柴田龍弘、宮田完二郎、片岡一則、近藤豊、Targeting long non-coding RNA, TUG1, as an effective treatment in cancer, 第 11 回日本エピジェネティクス研究会(招待講演) 2017

Katsushima K, Kondo Y, Targeting the Notch-regulated non-coding RNA, TUG1, as an effective treatment in glioblastoma, Gordon Research Conferences, Conference: Cancer Genetics & Epigenetics (国際学会) 2017

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/cancerbio/>

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

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。