

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07941

研究課題名(和文) 超保存領域に内在されたRNAメチル化スイッチと大腸がん進展の分子基盤

研究課題名(英文) Roles of RNA methylation in regulation of oncogenic T-UCRs.

研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師

研究者番号：00563454

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)：高等生物のゲノムに完全保存された配列である超保存領域(UCR)はヒトゲノムに481か所あるが、生理的意義は明らかになっていない。UCR領域より転写されるRNA(Transcribed-UCR: T-UCR)の一部が、がん化した細胞に高発現し、その細胞増殖に寄与する可能性がある。

本研究では、T-UCRsががん細胞の核に蓄積するメカニズムとして、1) ステムループ構造を取り、核内RNA結合タンパク質と結合すること、2) がん細胞において選択的にRNAメチル化され、二次構造を変化させること、3) RNAメチル化はUCRを含んだエクソンの挿入を促進する可能性があること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超保存領域(UCR)はマウス以上の高等生物のみ進化の過程で獲得したゲノム配列であるが、その生理学的意義は不明である。UCRから転写されるRNA群(T-UCR)の発現異常は、がんを含めた高等生物の複雑な細胞恒常性の破綻を判定するRNAバイオマーカーと成りうる。

UCRの多くはタンパク質をコードしておらず、一部のT-UCRはがん悪性化とともに核への蓄積が認められることから、T-UCRの配列特異的なノックダウンは、正規タンパク質の発現に影響を与えず、新しいコンセプトの核酸医療の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ultraconserved regions (UCRs) are 481 genomic sequences with 100% identity across humans, rats, and mice. Increasing evidence suggests that non-coding RNAs transcribed from UCRs are involved in various diseases, especially cancers. The human transformer 2 gene (TRA2B) encodes a UCR (uc.138) that spans exon 2 and its neighboring introns. Uc.138 is upregulated in colon cancer cell lines, although it is not translated to Tra2 protein because of its nuclear retention. Nevertheless, the clinical significance and biological functions of uc.138 in colon cancer cells remain unclear. In this study, RNA in situ hybridization showed that uc.138 was predominantly overexpressed in the nucleus of colon adenocarcinoma and adenoma. Overexpression of uc.138 in colon cancer cells promoted cell proliferation by changing the expression of G2/M-related cell cycle regulators. Uc.138 plays an oncogenic role in tumor progression and may become a potential biomarker and therapeutic target in colon cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 超保存領域 RNAプロセッシング 大腸がん RNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ultraconserved region (超保存領域: UCR) は、マウスからヒトまでの高等生物に種を超えて 100%保存された領域であり、ゲノム上に 481 か所存在する。UCR の大部分は、転写因子や選択的スプライシング調節因子をコードする遺伝子領域に分布しているが、その理由は未だわかっていない。進化の過程で、限られた遺伝子数から高等生物の高度な表現型を作り出す遺伝子の多様性の獲得に寄与したと考えられるが、同時に、癌を含む複雑な代謝性疾患の発症経路に関与する可能性がある。

(2) UCR より転写される RNA 群 (Transcribed-UCRs: T-UCRs) のいくつかは、ヒトにおいて発生段階・組織特異的及び疾患依存的な発現パターンを示すことが報告されている。

(3) スプライシング調節因子 SR (Ser/Arg) タンパク質 (SRSF) ファミリー (*SRSF1-10*) の遺伝子領域より転写された T-UCRs は、中途ストップコドン (PTC) を含むが、RNA 品質管理機構であるナンセンス RNA 分解 (NMD) により分解を受けず、がん細胞の核内に蓄積していることを見出した。

2. 研究の目的

SRSF 遺伝子由来の T-UCR が、なぜがん細胞では分解を受けずに蓄積されるのか、メカニズムは全く分かっていない。最近研究代表者は、大腸がん細胞において T-UCR はアデノシン残基が選択的に“メチル化修飾 (m6A)”を受けている可能性を初めて見出した。本研究では、① 大腸がん細胞の核に T-UCR が蓄積するメカニズムの解明、② T-UCR のがん悪性化を引き起こす分子基盤の解析、③ T-UCR の RNA メチル化による T-UCR 発現調節システムの同定、を目指した。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞核内において UCR に結合する因子の網羅的解析

T-UCR 群の一部は正常細胞ではほとんど発現しないにも関わらず、がん細胞の核内に高発現することを見出している。T-UCR の核内での貯留に関与する RNA 結合タンパク質を RNA 免疫沈降と質量分析を用いて網羅的に解析した。

(2) T-UCR の安定過剰発現細胞の樹立と機能解析

HCT116 大腸がん細胞に TRA2B 遺伝子から転写される T-UCR uc.138 を導入し、安定過剰発現を樹立した。これらの細胞株を用いて、がん悪性化のフェノタイプ (細胞増殖、マイグレーション能、抗がん剤耐性能) を比較検討した。

(3) 大腸がん悪性化を促す T-UCR の機能配列特定とマウス腫瘍形成実験

uc.138 の機能配列として想定しているステムループ部分に変異を加え、ループ構造を特異的に破壊した変異株を構築した。ヌードマウスに (2) で作成した wild-type uc.138 と変異株をそれぞれ移植し、腫瘍形成能を比較した。

(4) 大腸がん細胞に蓄積する T-UCR のメチル化の網羅的解析 (MeRIP-seq 法)

メチル化 m6A 特異的抗体を用い m6A メチル化を含む RNA を免疫沈降後精製した。得られたメチル化 RNA は T-UCR を含む非コード長鎖 RNA (lncRNA) カスタムマイクロアレイを用い網羅的に定量し、大腸がん細胞株における T-UCR の RNA メチル化ステータスを比較解析した。得られた結果はリアルタイム PCR によりバリデーションを行った。

(5) 大腸がんにおける RNA メチル化の制御因子の同定

ヒト大腸がん組織 tissue パネルを用い、m6A RNA メチル化関連因子 (メチル化酵素、脱メチル化酵素、m6A 結合タンパク質) の発現スクリーニングを行い、正常組織と比較し発現変動する因子を同定した。また、変動した因子については、大腸がん細胞株を用いノックダウン実験及び安定過剰発現を行い細胞のフェノタイプを確認した。さらに、変動した因子について T-UCR の RNA プロセッシング調節への関与を検討した。

4. 研究成果

(1) T-UCR の核内貯留を調節する因子の同定

大腸がん細胞の核分画を用いて uc. 138 に特異的に結合する因子を質量分析によって検討した結果、RNA 結合タンパク質ヌクレオリン (nucleolin) を同定した (図 1a)。ヌクレオリンは C 末端側の GAR ドメインを介して uc. 138 のエクソン 2 領域に結合した。ヌクレオリンの GAR ドメインを欠いた変異体は、uc. 138 の核内貯留が起こらず、uc. 138 の分解亢進と発現量の低下が認められた (図 1b、緑の蛍光)。さらに、大腸がん組織においてヌクレオリンの発現量と uc. 138 の発現量は正に有意に相関していた ($n=48$, $r=0.47$, $p<0.05$)。 (発表論文 5)

図 1a. ビオチン化 RNA-pull down

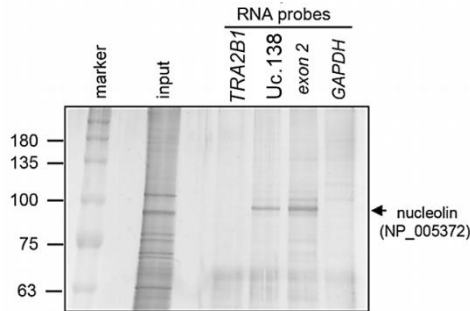
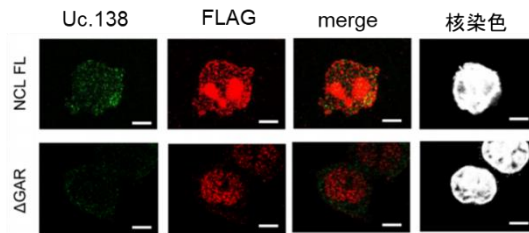


図 1b. 大腸がん細胞の uc.138 FISH と免疫染色



(2) T-UCR の過剰発現はがん悪性をトリガーする

HCT116 大腸がん細胞に TRA2B 遺伝子から転写される T-UCR uc. 138 を導入した安定過剰発現を樹立した。uc. 138 過剰発現細胞では、細胞増殖の亢進が認められた (図 2a)。また、マイクロアレイを用いて過剰発現による遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析したところ、細胞周期パスウェイ関連因子の発現増加が認められた (図 2b)。さらに、uc. 138 過剰発現細胞は Transwell を用いた migration アッセイにおいて、遊走能が亢進した (図 2c)。以上の結果より、大腸がん中で高発現する T-UCR uc. 138 は、がん細胞の増殖や遊走などの悪性化フェノタイプの誘導に関与する可能性が明らかになった。 (発表論文 1)

図 2a. uc.138 過剰発現細胞の増殖

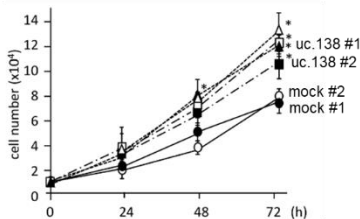


図 2b. uc.138 過剰発現細胞で亢進するパスウェイ

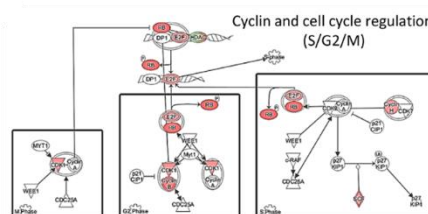
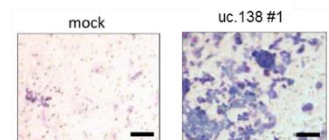


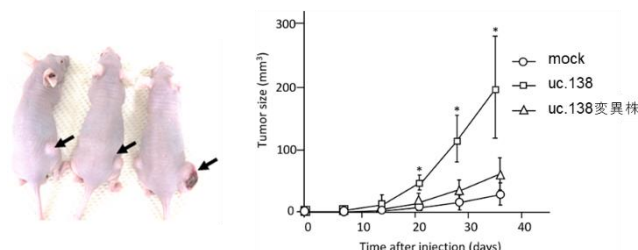
図 2c. 遊走能の比較



(3) T-UCR はステムループ構造を介してマウスの腫瘍形成を促進する

uc. 138 の機能配列として想定しているステムループ部分に変異を加え、ループ構造を特異的に破壊した変異株を構築しヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を検討した。uc. 138 の野生株を発現する大腸がん細胞を移植したヌードマウスにおいては、腫瘍形成能がコントロールに比較して有意に亢進した (図 3)。また、uc. 138 変異体発現細胞においては腫瘍形成能の変化が認められなかった。以上のことから、T-UCR はステムループ構造を介してマウスの腫瘍形成を促進することを見出した。 (発表論文 1)

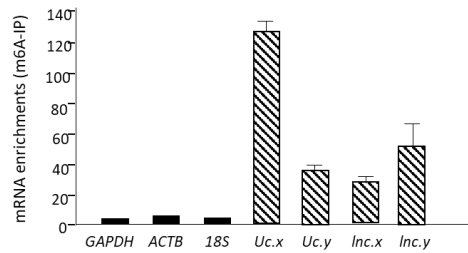
図 3. uc.138 のマウス腫瘍形成能



(4) 大腸がん細胞の T-UCR のメチル化ステータスの検出

メチル化 m6A 特異的抗体と lncRNA カスタムマイクロアレイを用い、大腸がん細胞株における T-UCR の RNA メチル化ステータスを解析した。その結果、メチル化ステータスの変動する数種類のがん関連 lncRNA と T-UCR の候補を抽出できた (図 4, 論文投稿準備中)。

図4. 大腸がんにおけるm6ARNAメチル化

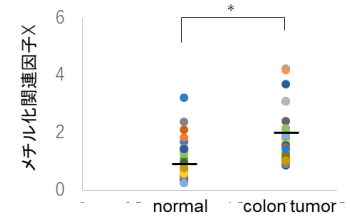


(5) 大腸がんで変動する RNA メチル化関連因子のスクリーニング

ヒト大腸がんと正常大腸上皮 ($n=24$) の cDNA を用いて、m6A RNA メチル化関連因子 (メチル化酵素、脱メチル化酵素、m6A 結合タンパク質) の発現を比較したところ、大腸がんにおいてメチル化酵素 X が高発現することを見出した (図 5)。さらに、RNA メチル化認識タンパク質 Y の発現も亢進しており、ノックダウンした細胞においては T-UCR の転写後調節が変化し T-UCR 発現量が低下した。

以上のことから、RNA メチル化は大腸がんにおいて、T-UCR の発現誘導に関与している可能性が示唆された。

図5. RNAメチル化因子の発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yuki Kuwano, Kensei Nishida, Kazuhito Rokutan | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Overexpression of the transcribed ultraconserved region Uc.138 accelerates colon cancer progression | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 8667-8667 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88123-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Saijo Saki, Kuwano Yuki, Tange Shoichiro, Rokutan Kazuhito, Nishida Kensei | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 A novel long non-coding RNA from the HOXA6-HOXA5 locus facilitates colon cancer cell growth | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BMC Cancer | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5715-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nishikawa Tatsuya, Kuwano Yuki, Takahara Yumiko, Nishida Kensei, Rokutan Kazuhito | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 HnRNP A1 interacts with G-quadruplex in the TRA2B promoter and stimulates its transcription in human colon cancer cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46659-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nishida Kensei, Kuwano Yuki, Rokutan Kazuhito | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 The MicroRNA-23b/27b/24 Cluster Facilitates Colon Cancer Cell Migration by Targeting FOXP2 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 174-174 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12010174 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Satake Yuzuru, Kuwano Yuki, Nishikawa Tatsuya, Fujita Kinuyo, Saijo Saki, Itai Miki, Tanaka Hiroki, Nishida Kensei, Rokutan Kazuhito | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Nucleolin facilitates nuclear retention of an ultraconserved region containing TRA2B and accelerates colon cancer cell growth | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 26817-26833 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25510 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Masuda Kiyoshi, Kuwano Yuki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Diverse roles of RNA binding proteins in cancer traits and their implications in gastrointestinal cancers | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA | 6. 最初と最後の頁 e1520 ~ e1520 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/wrna.1520 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 桑野由紀、西田憲生、六反一仁 |
| 2. 発表標題 大腸がん細胞に高発現する機能性RNA uc.138による大腸がん悪性化メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 桑野由紀、西田憲生、六反一仁 |
| 2. 発表標題 超保存領域を内在するT-UCRのRNAメチル化を介した大腸がん悪性化機構 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (福岡) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Y. Kuwano, K. Nishida, Y. Satake, K. Rokutan |
| 2. 発表標題 Nuclear retention of transcribed ultraconserved region uc.138 promotes colon cancer cell growth |
| 3. 学会等名 Cell Symposium-Regulatory RNAs (Berlin, Germany) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Y. Kuwano, T. Nishikawa, S. Saijo, K. Nishida, K. Rokutan |
| 2. 発表標題 機能性RNA TRA2 b 4の核局在が誘導する大腸がん悪性化メカニズム |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|