

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03501

研究課題名(和文) H3K27脱メチル化とシグナル伝達を連結する長鎖ncRNAによるがん細胞運命制御

研究課題名(英文) LncRNA connecting H3K27 demethylation with signal transduction cancer controls cell fate regulation.

研究代表者

北川 雅敏 (Kitagawa, Masatoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTGF β で誘導され上皮間葉転換(EMT)に関与する新規長鎖ncRNA(LncRNA)としてELIT-1を見出した。ELIT-1はTGF β -Smad経路を介して転写誘導される。ELIT-1はSmadと結合し、Snail、N-cadherin、等のEMT関連遺伝子の転写を促進し、EMTを正に制御する。さらに本研究によりELIT-1はあるH3K27脱メチル化酵素(KDM-Xとする)と結合することが証明された。ELIT-1は標的遺伝子のプロモーターへのKDM-XのリクルートをSmad3依存的に促進することにより標的遺伝子のH3K27脱メチル化を促進し、遺伝子発現を助け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

これまでの研究で、ヒストン脱メチル化を含むエピゲノム修飾によるクロマチン構造制御が遺伝子の発現制御に極めて重要であることは周知の事実である。しかしながらエピゲノム因子はDNA結合能を持たず、どのようなメカニズムで遺伝子特異的なエピゲノム修飾を実行するのかが不明な点が多かった。本研究により、LncRNAが転写因子とエピゲノム因子と結合して、転写因子依存的に標的遺伝子のプロモーターへエピゲノム因子を運ぶ機能をしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found ELIT-1 as a novel lincRNA induced by TGF β and involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT). ELIT-1 is transcriptionally induced via the TGF β -Smad pathway. ELIT-1 binds to Smad, promotes transcription of EMT-related genes such as Snail and N-cadherin, and positively regulates EMT. Furthermore, this study demonstrated that ELIT-1 binds to an H3K27 demethylase (referred to as KDM-X). It was suggested that ELIT-1 promotes H3K27 demethylation of the target gene by promoting the recruitment of KDM-X to the promoter of the target gene in a Smad3-dependent manner, and participates in gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：長鎖ノンコーディングRNA エピゲノム因子 転写制御

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換、細胞老化、がん幹細胞化、アポトーシス等のがん細胞の運命制御の分子機構の解明は生命科学において重要なだけでなく、それら細胞運命の制御によるがんの治療の可能性からも極めて重要である。これらの細胞運命決定と運命転換後の状態の維持には、不要な遺伝子発現の抑制とその維持、加えて新たな運命に必要な遺伝子の発現誘導とその維持が必要である。つまりシグナル伝達機構とゲノム状態のリプログラミングを維持するエピジェネティックな機構の連結(リンク)が必須である。しかしながらその分子機構はほとんど不明である。

長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)に関しては数万あるとされているが、機能の報告のあるものは20分の1以下で、それらがゲノムのブラックボックスとして、原因遺伝子不明の生命現象を担っている可能性が高いと考えられる。我々は上皮間葉転換の進行に寄与する新規 lncRNA として *ELIT-1* (*EMT-associated lncRNA induced by TGF- β -1*) を見出した。*ELIT-1* が TGF- β で誘導されること、*ELIT-1* をノックダウンすると TGF- β で誘導される上皮間葉転換(EMT)が抑制されること、Smad と結合すること、TGF- β の標的遺伝子の発現を亢進することが判明したが、その詳細な分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

我々は lncRNA ががん細胞の運命転換シグナルの伝達機構とエピジェネティックな機構をつなぐキープレイヤーであると考えている。つまり、本研究ではある種の lncRNA は特異的に転写因子とエピゲノム因子と結合して機能するのではないかと考えており、その実証を行う。

これまでの研究で、我々は Smad と結合し上皮間葉転換の進行に寄与する新規 lncRNA *ELIT-1* を見出しており、本研究では、その作動メカニズムの解析を行う。まず、*ELIT-1* の標的遺伝子と TGF- β の標的遺伝子の比較解析を行う。さらに *ELIT-1* が如何にして Smad と協力して標的遺伝子のシグナル依存的発現に寄与するかの解析を行う。また、本研究ではヒストン H3K27 の脱メチル化が転写促進に関与することに注目し、*ELIT-1* がヒストン H3K27 の脱メチル化酵素と結合するかを検証する。

3. 研究の方法

1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析

肝臓がん細胞株 Huh7 細胞に *ELIT-1* siRNA あるいはコントロール siRNA を RNAiMax を用いてトランスフェクションして、10 ng/ml の TGF- β で刺激し、48 時間後細胞を回収し RNA を調整し、アジレント社のマイクロアレイにより *ELIT-1* の標的遺伝子の解析を行った。

2. RIP アッセイによる *ELIT-1* と Smad の相互作用の解析

(1)の結果から *ELIT-1* の標的遺伝子は TGF- β の標的遺伝子と大きく重複することがわかり、*ELIT-1* が TGF- β -Smad 経路における正の制御分子として機能していることが示唆された。そこで *ELIT-1* と Smad 結合を検証した。まず HEK293 細胞において *ELIT-1* と FLAG-Smad2 あるいは FLAG-Smad3 を強制発現し、ライセートを調整、FLAG-抗体で免疫沈降 (IP)して、RT-qPCR で *ELIT-1* を測定することで両者の結合を検証した(RIP-qPCR)。また、同様の実験において局在性を調べるために、細胞質分画と核分画に分けて

解析した。さらに内因性の *ELIT-1* と Smad の結合を検証するために、Huh7 細胞を TGF で刺激し、Smad 抗体で IP し RT-qPCR で両者の結合を検証した。

3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析

レポーターアッセイによる解析：(2)の結果から *ELIT-1* は Smad3 と結合して機能することが示唆された。よって Smad 結合配列を持つレポータープラスミド 3TP-Lux、(CAGA)₁₂-MLP-Luc、4xSBE-Luc を用いて、*ELIT-1* のノックダウンの効果を解析した。実際には A549 細胞に *ELIT-1* siRNA あるいはコントロール siRNA をトランスフェクトし、24 時間後にこれらのレポーターを導入し、その 24 時間後に TGF-β 刺激を行い、さらに 24 時間後に回収してルシフェラーゼ活性を測定した。また、*ELIT-1* を過剰発現させ、その標的遺伝子の転写活性に対する効果を同様の系で解析した。

ChIP アッセイによる解析：*ELIT-1* および Smad の標的遺伝子である *Snail*、*vimentin*、*PAI-1*、*ELIT-1* (*ELIT-1* 自身も Smad の標的) の上流領域の Smad 結合領域に対する PCR プライマーを設定した。Huh7 細胞に *ELIT-1* siRNA あるいはコントロール siRNA を導入し、TGF-β で刺激 1.5 時間後に細胞を集めてクロマチン分画を調整し、*Snail*、*vimentin*、*PAI-1*、*ELIT-1* などの上流領域に対する Smad3 の結合を ChIP-qPCR で解析し、*ELIT-1* のノックダウンの影響を解析した。

4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析

これまでの結果から *ELIT-1* は TGF-β-Smad 経路における正の制御分子として標的遺伝子の転写促進に機能していることが示唆された。一般に、転写活性化状態のクロマチンでは H3K4me3 および H3K36me3 の増加と、H3K9me3 および H3K27me3 の低下が起こり、クロマチン構造を緩めている可能性が高い。本研究では H3K27 の脱メチル化に注目した。そこで *ELIT-1* とヒストン H3K27 の脱メチル化酵素の結合を検証した。まず HEK293 細胞において *ELIT-1* と数種の FLAG-H3K27 脱メチル化酵素を強制発現し、ライセートを調整、FLAG-抗体で免疫沈降 (IP) して、RT-qPCR で *ELIT-1* を測定することで両者の結合を検証した(RIP-qPCR)。

4. 研究成果

1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析

マイクロアレイにより発現遺伝子解析を行い、TGF-β の刺激で発現変動する遺伝子のうち、327 の遺伝子が発現上昇し、138 の遺伝子が発現低下することがわかった。*ELIT-1* の標的遺伝子としては、376 の遺伝子が発現上昇し、280 の遺伝子が発現低下した。TGF-β と *ELIT-1* の標的遺伝子として共通に正に制御されているものは 134、負に制御されているものは 49 遺伝子であった。ジーンオントロジー(GO)解析を行ったところ、*ELIT-1* の標的経路の多くは TGF-β の標的経路であることが判明し、*ELIT-1* は TGF-β 経路の正の調節因子であることが示された。しかしながら *ELIT-1* の標的遺伝子で TGF-β の標的遺伝子でないものも少なからず存在し、canonical な *ELIT-1* の機能が TGF-β-Smad-*ELIT-1* axis であるとする、non-canonical な機能もあることが示唆され、その説明は今後の課題と考えている。

2. RIP アッセイによる *ELIT-1* と Smad の相互作用の解析

RIP-qPCR 解析により、*ELIT-1* が FLAG-Smad3 と結合することが判明した。興味深いことに FLAG-Smad2 とは結合しないことが判明した。細胞分画の実験の結果、TGF- β シグナル依存的に核内で *ELIT-1* と FLAG-Smad3 の結合が見られた。また、内因性 *ELIT-1* と内因性 Smad3 の結合が見られ、TGF- β 刺激により増大だが、内因性 Smad2 と内因性 *ELIT-1* とは結合が見られなかった。以上の結果より、TGF- β 刺激により *ELIT-1* は選択的に Smad3 と結合することが示唆された。

3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析

レポーターアッセイによる解析： Smad 結合配列を持つレポータープラスミド 3TP-Lux、(CAGA)₁₂-MLP-Luc、4xSBE-Luc を用いて、*ELIT-1* のノックダウンの効果を解析したところ、TGF- β 刺激により上昇した転写活性は *ELIT-1* のノックダウンで抑制された。また、各レポーターの TGF- β 刺激依存的な転写活性は *ELIT-1* の過剰発現によって増強された。

ChIP アッセイによる解析： *Snail*、*vimentin*、*PAI-1*、*ELIT-1* 遺伝子上流領域に対する TGF- β 刺激依存的な Smad3 の結合は *ELIT-1* のノックダウンにより抑制された。

これまでの結果を考え合わせると、*ELIT-1* は TGF- β によって Smad 経路を介して誘導される。誘導された *ELIT-1* は TGF- β 依存的に Smad3 と結合し、Smad3 の標的遺伝子プロモーターへのリクルートを促進し、遺伝子発現を活性化して EMT の誘導に機能する。このように TGF- β -Smad-*ELIT-1* axis は TGF- β シグナルのポジティブフィードバック経路を形成すると考えられる(Sakai et al. Cancer Res 2019)。

4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析

RIP アッセイによって *ELIT-1* と H3K27 脱メチル化酵素の結合を検証した。*ELIT-1* と複数種類の FLAG- H3K27 脱メチル化酵素を強制発現し、FLAG- IP して、結合している *ELIT-1* を測定したところ、H3K27 脱メチル化酵素と *ELIT-1* が結合することを見出した。今後、H3K27 脱メチル化酵素が Smad の標的遺伝子プロモーター領域に *ELIT-1* によってリクルートされるか？ また、標的遺伝子のヒストンのメチル化状態がその HDM のリクルートに伴い変化するかについて、ChIP アッセイで解析する。またこれらの内因性分子の結合を調べることも必要である。

これらの結果から、*ELIT-1* は Smad3 及び H3K27 脱メチル化酵素と結合することにより、H3K27 脱メチル化の遺伝子特異性を担い、Smad3 特異的な遺伝子の転写の促進を介して TGF- β -Smad 経路を正に制御し、細胞運命を EMT 方向に向かわせることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakai, S., Ohhata, T., Kitagawa, K., Uchida, C., Aoshima, T., Niida, H., Suzuki, T., Inoue, Y., Miyazawa, K and *Kitagawa, M.	4. 巻 79
2. 論文標題 Long noncoding RNA ELIT-1 acts as a Smad3 cofactor to facilitate TGF-β/Smad signaling and promote epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2821-2838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-3210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北川雅敏
2. 発表標題 新規 lncRNA ELIT-1 は Smad3 コファクターとして TGFβ シグナリング と EMT を促進する
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川雅敏、酒井聡、大畑樹也
2. 発表標題 Smad3の標的遺伝子へのリクルーターとして機能する新規lncRNA ELIT-1
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川雅敏、酒井聡、大畑樹也
2. 発表標題 TGFβ によって誘導され、TGFβ-Smadシグナリングの正の制御因子として機能する新規lncRNA ELIT-1
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川雅敏
2. 発表標題 A novel lncRNA ELIT-1 promotes Snail induction and EMT via TGFβ signaling
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Kitagawa, Tatsuya Ohhata, Satoshi Sakai
2. 発表標題 Long noncoding RNA ELIT-1 act as a Smad3 cofactor to promotes TGFβ-Smad signaling and epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 EMBO Workshop The Non-Coding Genome (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

浜松医科大学医学部分子生物学講座 https://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/mol-biol/index.html

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
---------	---------