

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07679

研究課題名(和文) 肺癌においてmiR-20aが制御する新規lncRNA、TILRの機能解析

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms how TILR regulates apoptosis in lung cancer

研究代表者

梶野 泰祐 (Kajino, Taisuke)

愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR分野・主任研究員

研究者番号：50723673

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)：これまでに我々は、肺癌において機能するmiR-20aの標的lncRNAを探索し、機能未知の新規lncRNAを同定した。このlncRNAはp53の発現を抑制することからTILR (TP53-inhibiting lncRNA)と命名し、その作用機序について検討を重ねた。TILR結合タンパク質はin vitroプルダウンアッセイを用いて探索・同定し、TILRによる肺癌細胞の生存制御機構は、網羅的な遺伝子発現解析ならびにパスウェイ解析により、DNA損傷応答能における重要性を明らかにした。本研究成果は、難治がんのひとつである肺癌に対し、TILRを標的とした治療法の開発に道を拓くものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において我々は、肺癌細胞の生存に必須の働きをするlncRNA、TILRの機能解析を行った。TILR結合タンパク質の探索および網羅的な遺伝子発現プロファイルの解析を通じ、TILRがp53タンパク質の発現を抑制するlncRNAであることを明らかにした。さらに、TILRの発現抑制とDNA損傷応答誘発剤処理により、p53の活性化を著しく誘導することを見出した。以上の結果から、本研究において我々が明らかにしたTILRによるp53の発現制御機構は、新たな肺癌の治療の提案に繋がることと期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-coding RNAs have integral regulatory roles in numerous functions related to lung cancer development. Previously, we identified novel lncRNA, termed TILR (TP53-inhibiting lncRNA), which was found to suppress p53 expression and tumor cell growth. In this research, we aimed to reveal the molecular mechanisms how TILR regulates p53 in lung cancer. We performed the proteomic search to identify TILR-binding protein(s) as well as transcriptomic analysis to find the pathways which are regulated by TILR. Our data demonstrated that TILR was also shown to suppress p53 expression in a post-transcriptional manner, as well as via a positive feedback loop involving p53 and Fanconi anemia pathway genes. These results indicated that TILR constitutively inhibits p53 expression to maintain p53 transcriptional activity at a level sufficiently low for avoidance of spurious apoptosis induction.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：TP53 lncRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析が進むにつれて、ゲノム DNA の 70%もの領域が転写されている一方で、タンパク質をコードする RNA は、ほんの 2%しか含まれていないことが明らかになった。タンパク質をコードしない non-coding RNA には長さ 20 nt 程度の miRNA や 200 nt 以上の lncRNA などが知られているがその機能は大きく異なり、miRNA は標的 mRNA の分解を誘導し、lncRNA はタンパク質や RNA などと結合し、下流の遺伝子発現を複雑に制御すると考えられている。

近年研究代表者らは、システム生物学を通じて肺がんにおいて重要な働きをしているタンパク質と miRNA のネットワークを推定し、miR-30d と miR-195 の重要性を実験的に証明した (Arima, Kajino et al., *Carcinogenesis*, 2014)。さらに、MYC の活性制御に着目し、MYC の活性を制御する miR-342 を同定し、E2F1 を標的にすることにより、MYC の活性を抑制することを見出した (Tai, Kajino et al., *Carcinogenesis*, 2015)。また、システム生物学的手法を用いて MYC を制御する新規 lncRNA、MYMLR を同定し、MYMLR が MYC のエンハンサーと結合することにより MYC の発現を制御し、がん細胞の増殖に必須の働きをすることを明らかにした (Kajino et al., *EMBO J*, 2019)。このように、肺がんにおいて重要な働きをする non-coding RNA の研究が miRNA から lncRNA と広がりを見せる一方で、miRNA と lncRNA によるタンパク質の発現制御とそれに伴う細胞のがん化の制御機構には未だ解明されていない点が数多く存在していた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、肺がんにおいて重要な働きをしている miR-20a の標的 lncRNA を探索し、機能未知な lncRNA を同定し、後述の作用機序から TILR (TP53-inhibiting lncRNA) と命名した。分子生物学的な検討から、TILR は p53 野生型肺がん細胞の増殖に必須の働きをすること、さらに p53 タンパク質ならびに標的遺伝子である p21 や MDM2 の発現を抑制することを明らかにした。そこで、本研究では、TILR 結合タンパク質の探索や網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を通じ、p53 の発現制御の詳細な分子機構に迫り、miR-20a と TILR による複雑ながん細胞の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

TILR 結合タンパク質の同定には、BrU ラベル化 TILR とマスマスペクトロメトリーを組み合わせて行った。In vitro にて合成した BrU ラベル化 TILR あるいはネガティブコントロールの GFP を精製し、細胞質画分の細胞抽出液と混ぜ、抗 BrU 抗体にてプルダウンを行った。その後、TILR 結合タンパク質を単離・精製し、マスマスペクトロメトリーにより同定した。また、TILR と TILR 結合タンパク質との結合は、RNA プルダウン法あるいは RNA 免疫沈降法により検証した。網羅的な遺伝子発現解析では、siRNA を用いた TILR の発現抑制と、マイクロアレイを組み合わせて解析した。

4. 研究成果

(1) TILR 結合タンパク質の同定

lncRNA はタンパク質や核酸と結合して下流の遺伝子を制御する。そこで、in vitro プルダウンアッセイを用いて TILR 結合タンパク質の同定を行った。BrU ラベル化 TILR と細胞抽出液を混ぜ、抗 BrU 抗体を用いて TILR をプルダウンした。その後、TILR 結合タンパク質を精製してマスマスペクトロメトリーによる網羅的な探索を行い、TILR と結合する候補タンパク質として PCBP2 を同定した。TILR と PCBP2 との結合について検証したところ、RNA プルダウン法ならびに RNA 免疫沈降法において、TILR と PCBP2 との結合を確認した (図 1)。

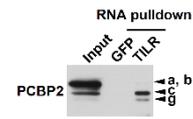


図 1 TILRとPCBP2との結合

(2) TILR による p53 の翻訳抑制

siRNA を用いた経時的な検討から、TILR は p53 mRNA の発現ではなく、p53 タンパク質の発現を抑制することを明らかにした。そこで、TILR と PCBP2 が p53 の翻訳を抑制するか、ポリソームアッセイを用いて検討した。超遠心を用いたショ糖密度勾配遠心法と qRT-PCR を組み合わせて解析を行ったところ、TILR の発現抑制により、ポリソーム画分における p53 mRNA が増大した。また、同様の結果を PCBP2 の発現抑制においても確認したことから、TILR と PCBP2 は p53 の翻訳を抑制することにより、p53 タンパク質の発現を抑制していると考えられる (図 2)。

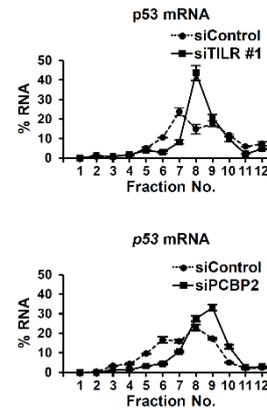


図 2 TILR/PCBP2によるp53の翻訳抑制

(3) TILR による p53 タンパク質の安定性制御

がん抑制遺伝子 p53 は細胞死を制御する転写因子であり、細胞内外の様々なシグナルに迅速に応答する必要がある。そのため、p53 タンパク質はユビキチン・プロテアソーム経路を介して適切に制御されている。そこで次に、TILR が p53 タンパク質の安定性を制御するか検討した。siRNA を用いて TILR の発現を抑制したところ、p53 のユビキチン化が抑制され、p53 タンパク質が安定化した (図 3)。

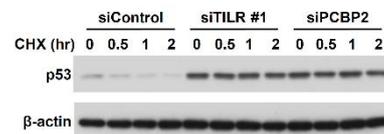


図 3 TILR/PCBP2によるp53タンパク質の安定性制御

さらに、microarray とパスウェイ解析を組み合わせた検討から、TILR はファンコーニ貧血関連遺伝子の発現に必須の働きをすることを明らかにした (図 4)。

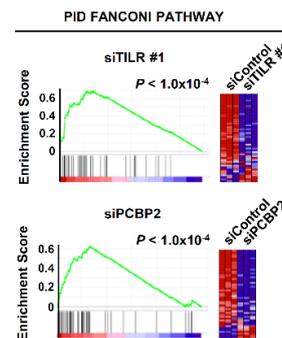
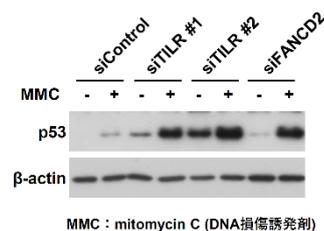


図 4 TILR/PCBP2によるファンコーニ貧血経路の制御

FANCD2 や BRCA1 などをはじめとするファンコーニ貧血経路は DNA 損傷応答に必須の働きをしているため、TILR は DNA 損傷応答経路の制御を通じて p53 タンパク質の安定化に寄与しているとかんがえられる。そこで、TILR



MMC : mitomycin C (DNA損傷誘発剤)

図 5 TILRの発現抑制とmitomycin Cの併用によるp53の活性化

の発現抑制と DNA 損傷誘発剤である MMC にて処理したところ、p53 タンパク質が著しく活性化されることを見出した (図 5)。

興味深いことに、TILR によるファンコーニ貧血関連遺伝子の発現は p53 により抑制されていた。そのため、TILR は、ファンコーニ貧血関連遺伝子によるフィードバック経路を介した制御により、p53 タンパク質の安定性を適切に制御する lncRNA であることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Iwai Mika, Kajino Taisuke, Nakatochi Masahiro, Yanagisawa Kiyoshi, Hosono Yasuyuki, Isomura Hisanori, Shimada Yukako, Suzuki Motoshi, Taguchi Ayumu, Takahashi Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Long non-coding RNA TILR constitutively represses TP53 and apoptosis in lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 364 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02546-w	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 -

1. 著者名 Shi Hanxiao, Niimi Atsuko, Takeuchi Toshiyuki, Shiogama Kazuya, Mizutani Yasuyoshi, Kajino Taisuke, Inada Kenichi, Hase Tetsunari, Hatta Takahiro, Shibata Hirofumi, Fukui Takayuki, Chen Yoshikawa Toyofumi Fengshi, Nagano Kazuki, Murate Takashi, Kawamoto Yoshiyuki, Tomida Shuta, Takahashi Takashi, Suzuki Motoshi	4. 巻 112
2. 論文標題 CEBP facilitates lamellipodia formation and cancer cell migration through CERS6 upregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2770 ~ 2780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14928	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Isomura Hisanori, Taguchi Ayumu, Kajino Taisuke, Asai Naoya, Nakatochi Masahiro, Kato Seiichi, Suzuki Keiko, Yanagisawa Kiyoshi, Suzuki Motoshi, Fujishita Teruaki, Yamaguchi Tomoya, Takahashi Masahide, Takahashi Takashi	4. 巻 112
2. 論文標題 Conditional <i>Ror1</i> knockout reveals crucial involvement in lung adenocarcinoma development and identifies novel HIF 1 regulator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1614 ~ 1623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14825	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 -

1. 著者名 Khaledian Behnoush, Taguchi Ayumu, Shin ya Kazuo, Kondo Ida Lisa, Kagaya Noritaka, Suzuki Motoshi, Kajino Taisuke, Yamaguchi Tomoya, Shimada Yukako, Takahashi Takashi	4. 巻 112
2. 論文標題 Inhibition of heat shock protein 90 destabilizes receptor tyrosine kinase ROR1 in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14786	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kajino T, Takahashi T
2. 発表標題 A novel long non-coding RNA, TILR, suppresses the apoptosis by inhibiting p53 expression.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------