

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460929

研究課題名(和文) p53標的大型介在性非コードRNAの同定と機能解析による消化器発癌機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 in cancers of digestive organs

研究代表者

井戸川 雅史 (Masashi, Idogawa)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00404749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：p53の直接転写標的となる大型介在性非コードRNA(lincRNA)を同定するため、クロマチン免疫沈降産物の次世代シーケンサー解析(ChIP-seq)およびin silicoでのp53結合モチーフ検索を行った。その結果、p53結合領域の約半数がコード遺伝子間に存在し、その近傍に存在する23のlincRNAがp53により発現誘導されることを見出した。その内3つのlincRNAについて消化器癌細胞でノックダウンを行ったところ、p53誘導アポトーシスが変化し、特定の遺伝子クラスターの発現が促進された。以上からp53とlincRNAが腫瘍抑制において複雑な転写ネットワークを形成することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：p53 is one of the most important known tumor suppressor genes, and it is inactivated in approximately half of human cancers. To identify the direct transcriptional targets of p53, we performed chromatin immunoprecipitation together with next-generation sequencing (ChIP-seq) and searched for p53 binding motifs across the entire human genome. Among the identified ChIP-seq peaks, approximately half were located in an intergenic region. Therefore, we assumed large intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) to be major targets of the p53 family. Through a combination of ChIP-seq and in silico analyses, we found 23 lincRNAs that are upregulated by the p53 family. Additionally, knockdown of specific lincRNAs modulated p53-induced apoptosis and promoted the transcription of a gene cluster. Our results suggest that p53 family members and lincRNAs constitute a complex transcriptional network involved in various biological functions and tumor suppression.

研究分野：腫瘍学, 消化器内科学

キーワード：p53 lincRNA ChIP-seq 癌 lincRNA non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

p53 は、細胞が DNA 障害などのストレスを受けた際に細胞死を誘導する最も重要な癌抑制遺伝子のひとつであり、ヒトに生ずるすべての癌の約半数に異常が認められる (Vogelstein, et al. Nature 2000). 消化器癌においても、p53 変異は食道癌の 41.1%、胃癌の 32.3%、大腸癌の 43.1%と、高頻度に認められる (IARC TP53 DATABASE). また、p53 の欠失や変異は、発癌を引き起こすのみならず化学療法や放射線治療に対する抵抗性にも関与することが報告されている (Brosh and Rotter. Nat. Rev. Cancer 2009). p53 は転写因子であり、ゲノム上の特定の塩基配列に結合し標的遺伝子の転写を誘導することで機能する。更に、p53 は変異によりその機能を失う (loss-of-function, LOF) だけではなく、新たな機能を獲得 (gain-of-function, GOF) し癌の発生、進展に寄与することが知られている (Brosh and Rotter. Nat. Rev. Cancer 2009). 変異型 p53 に獲得される機能として、正常型 p53 によって転写が誘導されない遺伝子を異常に活性化することが判明している。このため、p53 標的遺伝子の同定は、発癌機構の解明のみならず、癌の診断や治療への応用の可能性も秘めている。しかし近年、以上のような蛋白コード遺伝子ではなく、蛋白に翻訳されない非コード RNA (non-coding RNA) の役割が注目されており、中でも p53 の標的として複数の miRNA が同定され、癌における重要な役割が多数、報告されている (He, et al. Nature 2007)。

2. 研究の目的

そこで我々は、non-coding RNA の一つで、発生、分化、幹細胞性、癌において重要な働きが明らかになりつつある大型遺伝子介在性非コード RNA (large intergenic non-coding RNA, lincRNA) に着目し、解析を行うことを着想した。ゲノム網羅的 p53 結合配列のコンピュータ解析と、次世代シーケンサーによるクロマチン免疫沈降産物解析 (ChIP-seq)、更にマイクロアレイによる発現解析を組み合わせることで、p53 の直接的な転写標的となる lincRNA を同定したい。次に、これらの lincRNA の発現および機能解析を行い、消化器癌における lincRNA の役割を明らかにしたい。更に、消化器癌の診断や治療への応用の可能性がある、変異型 p53 特異的に発現が誘導される lincRNA を同定したい。

3. 研究の方法

A. *In silico* p53 結合配列解析による p53 ゲノム結合部位予測

1. 既知の p53 結合モチーフ

RRRCWWGYYY+spacer+RRRCWWGYYY を用いた p53 結合配列予測アルゴリズムにより *in silico* でヒトゲノムの全塩基配列を検索する。

2. 予測された p53 結合配列の位置および配列情報から、モチーフとのマッチ率、スパーサー長、lincRNA を含む遺伝子の転写開始点、転写終了点からの距離など、付随する情報を取得する。

B. クロマチン免疫沈降産物の次世代シーケンサー解析 (ChIP-seq) によるゲノム上の p53 結合部位の同定

1. p53 を欠失している癌細胞に、アデノウイルスを用いて FLAG タグを付加した正常型および変異型 p53 を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行う。

2. 得られた p53 結合ゲノム DNA を精製し、アダプターやバーコード配列を付加しライブラリーを作成する。

3. 次世代シーケンサーである ABI 社の SOLiD4 を用いて、ライブラリーを網羅的にシーケンスし (ChIP-seq)、得られたリードを、Bowtie ソフトウェアを用いてヒトゲノム配列上にアラインメントする。

4. リードのアラインメントによって得られたピークを、複数のアルゴリズム (MACS, USeq, CCAT など) で検出することで、p53 と結合するゲノム領域を網羅的に同定する。

C. データの統合による p53 の直接的標的遺伝子候補の同定

1. p53 の ChIP-seq で検出された p53 結合領域の中で、*in silico* で予測された p53 結合モチーフを含むもののみを抽出することで非特異的結合によるノイズを取り除き、標的遺伝子の転写に直接関わる p53 結合領域を絞り込む。

2. p53 結合領域の近傍 (10kb 以内) に存在する lincRNA を含む遺伝子群をデータベースより抽出する。

D. p53 標的 lincRNA の発現応答性の確認

癌細胞において、p53 が欠失または変異しているものではアデノウイルスを用いて p53 を発現させ、正常型 p53 を持つ場合は内因

性 p53 を薬剤で活性化した際に、p53 の直接的標的遺伝子候補として同定された lincRNA の発現量が上昇するかどうかを、定量的 PCR を用いて比較解析する。

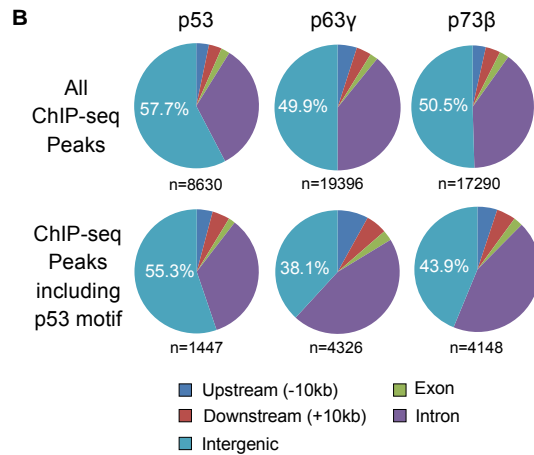
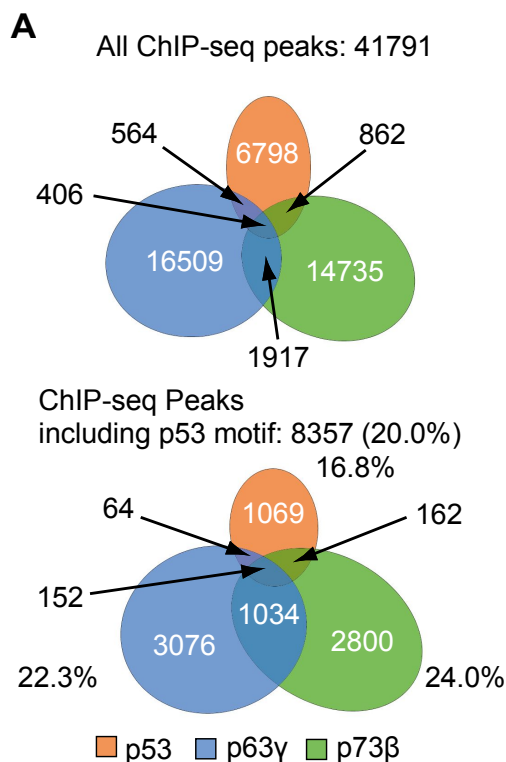
E. p53 標的 lincRNA の機能解析

p53 による発現応答性が確認された lincRNA について、siRNA によるノックダウンを行い、それによって生ずる p53 機能(アポトーシス誘導や細胞周期停止)や消化器癌における増殖、浸潤、その他の細胞生物学的影響について、詳細な解析を行う。

4. 研究成果

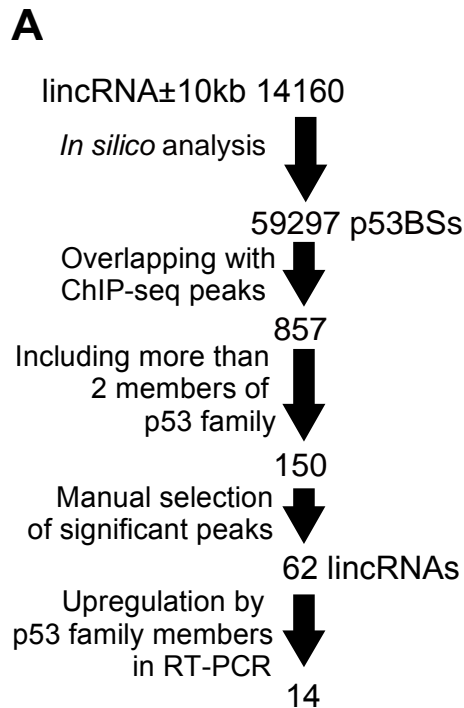
p53 が欠失している癌細胞 H1299 にアデノウイルスを用いて FLAG タグのついた p53 および、そのファミリーである p63 γ , p73 β を発現させ ChIP-seq を行ったところ、すべてのファミリー合わせて 41791 の結合ピークが検出された。そのうち *in silico* で検索された p53 モチーフを持つピークは 20.0%であった(図1A)。また、これらのピークのうち半数はコード遺伝子の近傍に存在したが、残りの半数は遺伝子間に存在していたことから(図1B), lincRNA が p53 の標的となっている可能性が示唆された。

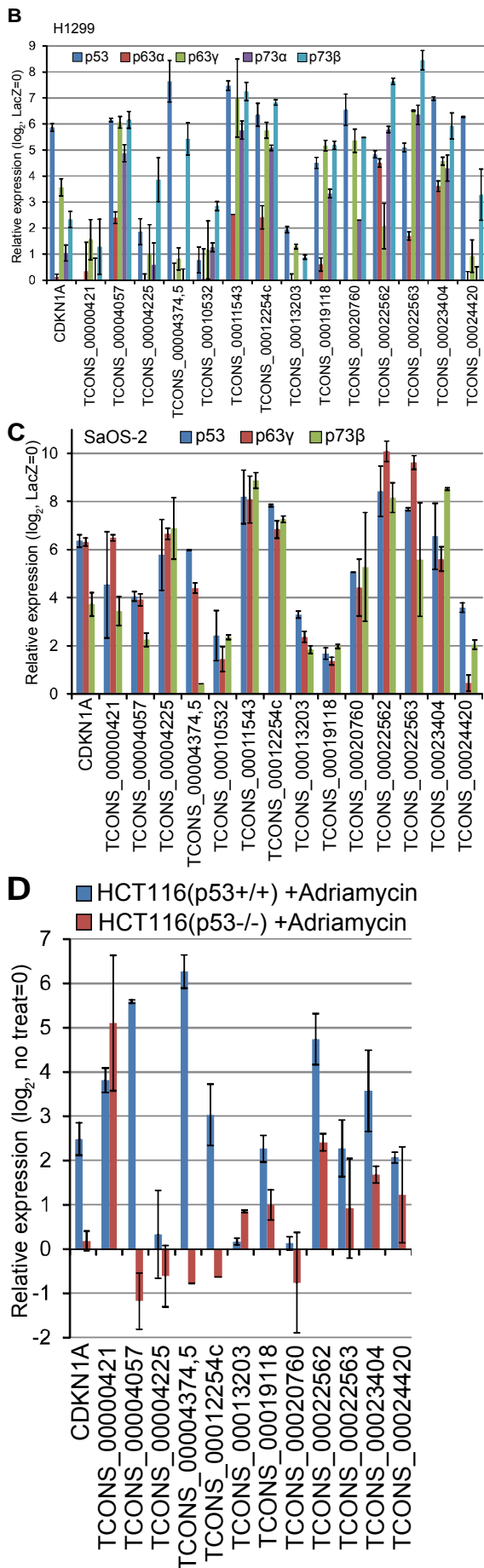
【図1】



14160 の lincRNA の近傍 10kb には 59297 の p53 モチーフが存在し、このうち ChIP-seq のピークと重なるものは 857 であった。更に 2 つ以上の p53 ファミリーで検出された有意なピークは 62 あった。これらについて PCR で発現を確認したところ、14 が p53 ファミリーにより発現上昇を認めた。(図2A)これらの lincRNA について、H1299 および SaOS-2 細胞で定量的 PCR を行ったところ、p53 ファミリーを過剰発現によりその発現上昇が認められた(図2B, C)。また、大腸癌細胞 HCT116 およびその p53 ノックアウト細胞をアドリマイシン処理したところ、7 つの lincRNA で p53 依存的に発現が上昇した(図2D)。

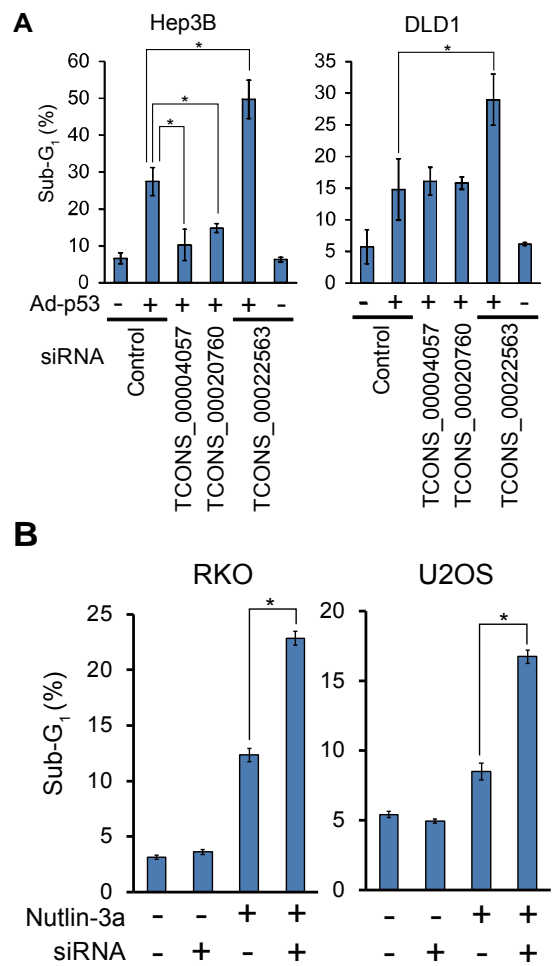
【図2】





これらの lincRNA のうち 3 つについて、p53 の変異が認められる肝癌細胞 Hep3B および大腸癌細胞 DLD1 において siRNA によりノックダウンを行い p53 のアポトーシス誘導能に対する影響を調べた。その結果、2 つの lincRNA はノックダウンによりアポトーシスが減少する一方、1 つの lincRNA についてはノックダウンによりアポトーシスの増強が認められた(図3A)。更に、p53 正常の大腸癌細胞 RKO および骨肉腫細胞 U2OS において nutlin-3a 処理により内因性 p53 を活性化したところ、同様に 1 つの lincRNA のノックダウンによりアポトーシスの増強が認められた(図3B)。

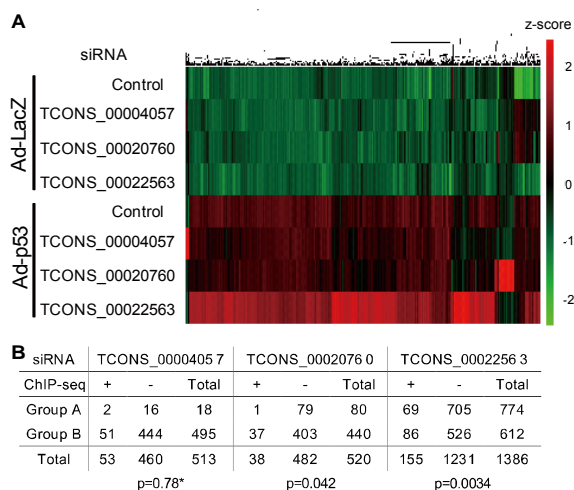
【図3】



これらの lincRNA がどのように機能しているかを明らかにするために、3 つの lincRNA をノックダウンした Hep3B 細胞において p53 を過剰発現させた際の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、それぞれの lincRNA のノックダウンにより、p53 による発現誘導が変化する遺伝子クラスターの存在が明らかとなった(図4A)。これらのクラスターに含まれる

遺伝子について ChIP-seq ピークの有無を確認すると, lincRNA のノックダウンにより変化しなかったグループ (Group B) と比較して変化したグループ (Group A) で有意に ChIP-seq ピークの無いものが多かった (図4B) . このことは, これらの lincRNA が p53 の直接の標的遺伝子ではない遺伝子の発現を 2 次的に制御している可能性を示唆した .

【図4】



以上の結果から, p53 ファミリーと lincRNA が様々な生物学的機能や腫瘍抑制において複雑な転写ネットワークを形成することが示唆された .

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. **Idogawa M**, Ohashi T, Sasaki Y, Nakase H, Tokino T. Long non-coding RNA NEAT1 is a transcriptional target of p53 and modulates p53-induced transactivation and tumor-suppressor function. **International Journal of Cancer** 2017; 140:2785-2791. doi: 10.1002/ijc.30689. 査読有
2. Ohashi T, **Idogawa M**, Sasaki Y, Tokino T. p53 mediates the suppression of cancer cell invasion by inducing LIMA1/EPLIN. **Cancer Letters** 2017; 390:58-66. doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.034. 査読有
3. Sasaki Y, Tamura M, Takeda K, Ogi K, Nakagaki T, Koyama R, **Idogawa M**, Hiratsuka H, Tokino T. Identification and characterization of the intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 target. **Oncotarget** 2016; 7:61426-61437. doi: 10.18632/oncotarget.11366. 査読有
4. Tamura M, Sasaki Y, Kobashi K, Takeda K, Nakagaki T, **Idogawa M**, Tokino T. The CRKL oncogene is downregulated by p53 through miR-200s. **Cancer Science** 2015; 106:1033-40. doi: 10.1111/cas.12713. 査読有
5. Contextual niche signals towards colorectal tumor progression by mesenchymal stem cell in the mouse xenograft model. Nakagaki S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Nasuno M, Watanabe S, **Idogawa M**, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. **Journal of Gastroenterology**. 2015; 50:962-74. doi: 10.1007/s00535-015-1049-0. 査読有
6. **Idogawa M**, Ohashi T, Sasaki Y, Maruyama R, Kashima L, Suzuki H, Tokino T. Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53-binding sites. **Human Molecular Genetics** 2014; 23:2847-57. doi: 10.1093/hmg/ddt673. 査読有
7. **Idogawa M**, Ohashi T, Sugisaka J, Sasaki Y, Suzuki H, Tokino T. Array-based genome-wide RNAi screening to identify shRNAs that enhance p53-related apoptosis in human cancer cells. **Oncotarget** 2014; 5:7540-8. doi: 10.18632/oncotarget.2272. 査読有
8. Tamura M, Sasaki Y, Koyama R, **Idogawa M**, Takeda K, Tokino T. Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target gene of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness. **Oncogene** 2014; 33:4837-46. doi: 10.1038/onc.2013.427. 査読有
9. Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, **Idogawa M**, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal Stem Cells Cancel Azoxymethane-induced Tumor Initiation. **Stem Cells** 2014; 32:913-25. doi: 10.1002/stem.1594. 査読有
10. Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, **Idogawa M**, Naishiro Y, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. **Journal of Gastroenterology** 2014; 49:270-82. doi: 10.1007/s00535-013-0901-3. 査読有
11. Ohashi T, **Idogawa M**, Sasaki Y, Suzuki H,

Tokino T. AKR1B10, a transcriptional target of p53, is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with Poor Prognosis. **Molecular Cancer Research** 2013; 11:1554-63. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0330-T. 査読有

(学会発表) (計9件)

1. **Idogawa M**. The identification of p53 target genes and noncoding RNAs through the combined analysis of RNA-seq and ChIP-seq data. American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting. April 18, 2016, New Orleans, USA.
2. **井戸川雅史**. 癌における p53 および長鎖非コード RNA (lincRNA) による転写ネットワーク解析. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 8 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
3. **井戸川雅史**. RNA-seq と ChIP-seq の複合解析による非コード RNA を含む p53 標的遺伝子の同定. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).
4. **Idogawa M**. Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53 binding sites. the 16th International p53 Workshop. June 2014, Stockholm, Sweden.
5. **井戸川 雅史**. ゲノム網羅的 p53 結合領域解析とマイクロアレイを組み合わせた p53 標的長鎖非コード RNA (lincRNA) の同定と解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
6. **井戸川雅史**. ゲノム網羅的 p53 結合領域解析とマイクロアレイを組み合わせた p53 ファミリー標的長鎖非コード RNA (lincRNA) の同定と解析. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
7. **Idogawa M**. Identification of novel p53 family target genes by ChIP-Seq and mRNA expression analysis combined with genome-wide p53-binding motif analysis in silico. 6th p63/p73 International Workshop. September 2013, Kisarazu, Chiba, Japan.
8. **井戸川雅史**. ゲノム網羅的 p53 結合領域解析による p53 ファミリーの転写標的となる大型

遺伝子介在性非コード RNA (lincRNA) の同定と機能解析. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

9. **井戸川雅史**. ゲノム網羅的 p53 結合領域解析による p53 ファミリーの転写標的となる大型介在性非コード RNA (lincRNA) の同定と機能解析. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井戸川 雅史 (IDOGAWA, Masashi)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00404749