

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430127

研究課題名(和文) 癌化シグナルによって発現誘導される長鎖非コードRNAの機能解明とその阻害剤の探索

研究課題名(英文) The elucidation of function of long noncoding RNAs induced by oncogenic signal and the exploration of their inhibitors.

研究代表者

神武 洋二郎 (KOTAKE, Yojiro)

近畿大学・工学部・准教授

研究者番号：90531963

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)：本研究により、癌化シグナルによって発現量が増加する長鎖ノンコーディングRNA、PANDAが、DNA損傷時における癌抑制タンパク質p53の安定化を促進する機能を持つことが明らかとなった。発現解析の結果、PANDAはヒト骨肉腫細胞で高発現していることが分かった。ヒト骨肉腫細胞U2OSにおいて、PANDAをノックダウンすると、細胞増殖が顕著に抑制された。その作用機序として、PANDAはCDKインヒビターp18の転写抑制を介して、細胞周期のG1期を促進し、細胞増殖を正に制御することが明らかとなった。本研究により、将来的にPANDAは癌治療薬の分子標的になりうるということが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that a long noncoding RNA, PANDA, induced by oncogenic signal stabilizes p53 tumor suppressor protein in response to DNA damage. Quantitative RT-PCR assay showed that PANDA was highly expressed in U2OS human osteosarcoma cells. Silencing PANDA caused arrest at the G1 phase of the cell cycle, leading to inhibition of cell proliferation. We revealed that PANDA promotes G1-S transition by repressing p18 transcription, and thus promotes U2OS cell proliferation. These results indicate that PANDA may be a good molecular target for cancer treatment drug.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ガン化シグナル 長鎖ノンコーディングRNA 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

近年のトランスクリプトーム解析や高解像度タイリングアレイ解析の結果、ヒトで1万個以上の long noncoding RNA (lncRNA) が存在することが明らかとなった。最近の研究により、いくつかの lncRNA が、ヒストン修飾因子や転写因子のリクルーターとして機能し、標的遺伝子の転写制御に関与していることが明らかとなった。報告者もこれまでに、*ANRIL* という lncRNA が、ヒストン修飾因子であるポリコム複合体と結合し、標的遺伝子座 (癌抑制遺伝子 *p15/p16*) へのリクルーターとして機能していることを明らかとした (Kotake et al. *Oncogene*. 2011, Kotake et al. *Genes & Dev*. 2007)。さらに *ANRIL* が、細胞老化を抑制する機能を持つことを明らかとした。

その他、*XIST*、*HOTAIR* や *MALATI* などの lncRNA が、標的遺伝子の転写制御を介して癌化や分化など、細胞運命決定に関与することが分かってきた。しかしながら、ほとんどの lncRNA の機能は未だ分かっていないのが現状である

2. 研究の目的

本研究では、癌化シグナルによって発現誘導される lncRNA、*PANDA* に注目し、その細胞機能と作用機序を解明し、さらにその阻害剤を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

PANDA の発現解析は、RT-PCR により行った。*PANDA* 標的遺伝子の発現量は、リアルタイム RT-PCR 及びウエスタンブロットにより、解析した。細胞周期解析は、フローサイトメーターを用いて、アポトーシス解析は IN Cell Analyzer 2200 を用いて行った。

4. 研究成果

本研究により、癌化シグナルによって発現量が増加する lncRNA、*PANDA* をノックダウンすると、癌抑制タンパク質 p53 の半減期が減少することが分かった。*PANDA* ノックダウンによる p53 タンパク質の不安定化は、プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加によって阻害された。p53 タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム経路によって分解されることが報告されている。本研究の結果から、*PANDA* はユビキチン-プロテアソーム経路を抑制することにより、p53 タンパク質安定化に寄与しているのではないかと考えられた。また、*PANDA* ノックダウンすると、DNA 損

傷時の p53 タンパク質の蓄積が見られないことが分かった。これらの結果から、*PANDA* は DNA 損傷における p53 タンパク質の安定化を促進する機能を持つことが考えられた。

さらに、*PANDA* の発現解析の結果、*PANDA* はヒト骨肉腫細胞 U2OS に特異的に高発現していることが分かった。ヒト骨肉腫細胞 U2OS において、*PANDA* をノックダウンすると、細胞増殖が顕著に抑制され、細胞周期の G1 期で停止する細胞が増加することが分かった。また、*PANDA* をノックダウンすると、G1 期のブレーキである CDK インヒビター *p18* の転写が活性化することが明らかとなった。これらの結果から、*PANDA* は、CDK インヒビター *p18* の転写抑制を介して、細胞周期の G1 期を促進し、細胞増殖を正に制御する機能を持つことが考えられた。本研究の成果により、*PANDA* は将来的に癌治療薬の分子標的になる可能性が示唆された。また、本研究で合成に成功した、*PANDA* 発現を効果的に阻害する siRNA オリゴは、*PANDA* を標的とした核酸医薬のリード化合物となりうることが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

1. Silencing of bcr/abl Chimeric Gene in Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line K562 by siRNA-Nuclear Export Signal Peptide Conjugates: Shinkai S, Kashihara S, Minematsu G, Fujii H, Naemura M, Kotake Y, Morita Y, Ohnuki K, Fokina AA, Stetsenko DA, Filichev VV, Fujii M. *Nucleic Acid Ther.*, 査読有, 印刷中.

2. Y-box Binding Protein 1 is Involved in Regulating the G2/M Phase of the Cell Cycle: Kotake Y, Arikawa N, Tahara K, Maru H, Naemura M. *Anticancer Res.*, 査読有, 37(4): 1603-1608, 2017.

3. Long Noncoding RNA *PANDA* Positively Regulates Proliferation of Osteosarcoma Cells: Kotake Y, Goto T, Naemura M, Inoue Y, Okamoto H, Tahara K. *Anticancer Res.*, 査読有, 37(1): 81-85, 2017.

4. Oncogenic Ras influences the expression of multiple lncRNAs: Kotake Y, Naemura M,

Kitagawa K, Niida H, Tsunoda T, Shirasawa S, Kitagawa M. *Cytotechnology*, 査読有, 68(4): 1561-1569, 2016.

5. Long Non-coding RNA, PANDA, Contributes to the Stabilization of p53 Tumor Suppressor Protein: Kotake Y, Kitagawa K, Ohhata T, Sakai S, Uchida C, Niida H, Naemura M, Kitagawa M. *Anticancer Res.*, 査読有, 36(4): 1605-1611, 2016.

6. ANRIL regulates the proliferation of human colorectal cancer cells in both two- and three-dimensional culture: Naemura M, Tsunoda T, Inoue Y, Okamoto H, Shirasawa S, Kotake Y. *Mol Cell Biochem.*, 査読有, 412(1-2): 141-146, 2016.

7. Long noncoding RNA ANRIL regulates proliferation of non-small cell lung cancer and cervical cancer cells: Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H, and Kotake Y. *Anticancer Res.*, 査読有, 35(10): 5377-5382, 2015.

8. Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene: Kotake Y, Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H. *Anticancer Res.*, 査読有, 35(8): 4397-4401, 2015.

9. Regulation of pRB and p53 pathways by the long noncoding RNAs *ANRIL*, *lincRNA-p21*, *lincRNA-RoR*, and *PANDA*: Kotake Y, Kitagawa M. *Long Noncoding RNAs*, 査読有, 175-189, 2015.

10. 長鎖非コード RNA, *ANRIL*, *PANDA* による細胞増殖, アポトーシス制御機構: 神武洋二郎, 苗村円佳, 紫千大. *日本生化学会誌*, 査読有, 87(2): 230-233, 2015.

11. YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers: Harada M, Kotake Y, Ohhata T, Kitagawa K, Niida H, Matsuura S, Funai K, Sugimura H, Suda T, Kitagawa M. *Genes to Cells*, 査読有, 19(6): 504-516, 2014.

[学会発表](計48件)

1. 細胞周期制御に関する長鎖ノンコーディングRNAの機能解析: 神武洋二郎, 苗村円佳, 井上恭敏, 岡本春奈, 田原圭一郎. 日本

農芸化学会 2017 年度大会, 京都市, 2017 年 3 月 18 日

2. ガン化シグナルによって発現変動する長鎖ノンコーディング RNA の機能解析: 苗村円佳, 角田俊之, 井上恭敏, 岡本春奈, 田原圭一郎, 白澤専二, 神武洋二郎. 第 20 回バイオ治療法研究会, 福岡市, 2016 年 12 月 10 日

3. A novel long noncoding RNA positively regulates cancer cell proliferation: Inoue Y, Naemura M, Okamoto H, Tahara K, Kotake Y. Joint International Symposium on 「Regional Revitalization and Innovation for Social Contribution」 and 「e-ASIA Functional Materials and Biomass Utilization 2016」, Tagawa city, Japan, 2016 年 12 月 7 日

4. 化学修飾 siRNA の RNA 干渉効果への影響: 新貝恭広, 苗村円佳, 神武洋二郎, 山吉麻子, 有吉順平, Alesya A. Fokina, Dmitry A. Stetsenko, Vyacheslav V. Filichev, 藤井政幸. 日本核酸医薬学会第二回年会, 東京都, 2016 年 11 月 15-17 日

5. Roles of long noncoding RNAs, ANRIL and PANDA in RB and p53 pathways: Kotake Y. The 2nd International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference, Iizuka city, Japan, 2016 年 9 月 30 日

6. 新規長鎖ノンコーディング RNA の作用機構と細胞内機能の解明: 井上恭敏, 苗村円佳, 濱崎彩花, 中川飛鳥, 神武洋二郎. 第 15 回近畿大学環境科学研究会, 岩出市, 2016 年 8 月 8 日

7. Long Noncoding RNA, ANRIL Regulates the Proliferation of Non-Small Cell Lung and Colorectal Cancer Cells: Naemura M, Inoue Y, Okamoto H, Tahara K, Kotake Y. 12th International Congress of Cell Biology, Prague, Czech Republic. 2016 年 7 月 24 日

8. 転写因子 YB-1 による細胞老化抑制機構: 田原圭一郎, 苗村円佳, 井上恭敏, 岡本春奈, 神武洋二郎. 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2016 年 7 月 2 日

9. レスベラトロール及びその誘導体は大腸癌細胞三次元増殖を抑制する: 岡本春奈, 松川泰治, 苗村円佳, 井上恭敏, 田原圭一郎,

大貫宏一郎, 神武洋二郎. 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2016 年 7 月 2 日

10. Long noncoding RNA ANRIL represses the expression of INK4 locus: Naemura M, Inoue Y, Okamoto H, Tahara K, Kotake Y. 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2016 年 7 月 2 日

11. Two long non-coding RNAs that are involved in the transcriptional repression of INK4 locus: Inoue Y, Naemura M, Okamoto H, Tahara K, Kotake Y. 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2016 年 7 月 2 日

12. siRNA の構造と遺伝子サイレンシング効果への影響: 新貝恭広, 柏原慎一, 峰松剛, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2016 年 7 月 2 日

13. ペプチド-siRNA 複合体による無毒生細胞導入と遺伝子サイレンシング: 柏原慎一, 新貝恭広, 藤井啓史, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2016 年 7 月 2 日

14. 長鎖ノンコーディング RNA, ANRIL による細胞増殖促進機構の解明: 苗村円佳, 角田俊之, 井上恭敏, 岡本春奈, 田原圭一郎, 白澤専二, 神武洋二郎. 第 68 回日本細胞生物学会大会, 京都市, 2016 年 6 月 17 日

15. がん化シグナルによって発現誘導される新規長鎖ノンコーディング RNA の機能解明: 井上恭敏, 苗村円佳, 濱崎彩花, 中川飛鳥, 岡本春奈, 田原圭一郎, 神武洋二郎. 第 68 回日本細胞生物学会大会, 京都市, 2016 年 6 月 17 日

16. 細胞老化における転写因子 YB-1 の機能解明: 田原圭一郎, 苗村円佳, 井上恭敏, 岡本春奈, 北川雅敏, 神武洋二郎. 第 68 回日本細胞生物学会大会, 京都市, 2016 年 6 月 15 日

17. INK4 遺伝子座に存在する長鎖非コード RNA, ANRIL の機能解析: 苗村円佳, 角田俊之, 紫千大, 井上恭敏, 岡本春奈, 白澤専二, 神武洋二郎. 第 19 回バイオ治療法研究会, 東京都, 2015 年 12 月 5 日

18. カチオン性 5'-末端を有する siRNA の遺

伝子サイレンシング効果: 藤井政幸, 大野結有, 新貝恭広, 藤井啓史, 柏原慎一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 山吉麻子, 村上章. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 京都市, 2015 年 11 月 30 日

19. 5'-アミノ T を有する siRNA の遺伝子サイレンシング効果: 大野結有, 新貝恭広, 藤井啓史, 柏原慎一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 山吉麻子, 村上章, 藤井政幸. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 京都市, 2015 年 11 月 30 日

20. ミスマッチまたはバルジ構造を有する miRNA 様 siRNA の遺伝子サイレンシング効果: 藤井政幸, 新貝恭広, 藤井啓史, 柏原慎一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 山吉麻子, 村上章. 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 京都市, 2015 年 11 月 30 日

21. LONG NONCODING RNA ANRIL PROMOTES PROLIFERATION OF CANCER CELLS: Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H, Kotake Y. Joint International Symposium on 「Regional Revitalization and Innovation for Social Contribution」 and 「e-ASIA Functional Materials and Biomass Utilization 2015」, Tagawa city, Japan, 2015 年 11 月 1 日

22. THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF NOVEL LONG NON-CODING RNA INVOLVED IN CARCINOGENESIS: Inoue Y, Naemura M, Murasaki C, Okamoto H, Kotake Y. Joint International Symposium on 「Regional Revitalization and Innovation for Social Contribution」 and 「e-ASIA Functional Materials and Biomass Utilization 2015」, Tagawa city, Japan, 2015 年 11 月 1 日

23. 長鎖ノンコーディング RNA による RB/p53 経路の制御機構: 神武洋二郎, 苗村円佳, 紫千大, 井上恭敏, 岡本春奈. 2015 年度日本農芸化学会中四国支部・西日本支部合同大会, 松山市, 2015 年 9 月 17 日

24. 固相フラグメント縮合法による核酸コンジュゲートの合成: 江見友裕, 大野有結, 赤池香菜実, 新貝恭広, 藤井啓史, 柏原慎一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 熊本市, 2015 年 9 月 10 日

25. 新規ハイブリッドペプチドによる siRNA の無毒性細胞内導入: 柏原慎一, 新貝恭広, 藤井啓史, 大野結有, 赤池香菜実, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 熊本市, 2015 年 9 月 10 日
26. 5'-アミノ T を有する siRNA の遺伝子サイレンシング効果: 大野結有, 赤池香菜実, 新貝恭広, 藤井啓史, 柏原慎一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 山吉麻子, 村上章, 藤井政幸. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 熊本市, 2015 年 9 月 10 日
27. miRNA 様 siRNA の遺伝子サイレンシング効果: 新貝恭広, 藤井啓史, 大野結有, 赤池香菜実, 柏原慎一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 山吉麻子, 村上章, 藤井政幸. 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 熊本市, 2015 年 9 月 10 日
28. INK4 遺伝子座の転写抑制に関する 2 つの長鎖ノンコーディング RNA: 井上恭敏, 苗村円佳, 神武洋二郎. 第 14 回近畿大学環境科学研究会, 東大阪市, 2015 年 8 月 7 日
29. がん細胞における長鎖ノンコーディング RNA, ANRIL の機能とその作用機構の解明: 苗村円佳, 紫千大, 井上恭敏, 岡本春奈, 神武洋二郎. 2015 近畿大学サイエンスネットワーク・第 5 回院生サミット, 和歌山市, 2015 年 7 月 11 日
30. ガン細胞増殖における新規長鎖ノンコーディング RNA の機能解析: 井上恭敏, 苗村円佳, 紫千大, 岡本春奈, 神武洋二郎. 2015 近畿大学サイエンスネットワーク・第 5 回院生サミット, 和歌山市, 2015 年 7 月 11 日
31. 長鎖非コード RNA, ANRIL は p15 を抑制してがん細胞増殖を促進する: 苗村円佳, 紫千大, 井上恭敏, 岡本春奈, 神武洋二郎. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
32. レスベラトロールによる肺癌及び大腸癌細胞増殖抑制機構の解明: 岡本春奈, 田村恵士, 松川泰治, 江頭央透, 苗村円佳, 紫千大, 井上恭敏, 大貫宏一郎, 神武洋二郎. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
33. 長鎖ノンコーディング RNA による骨肉腫細胞増殖制御機構の解明: 紫千大, 苗村円佳, 井上恭敏, 岡本春奈, 神武洋二郎. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
34. ガン化に関する新規長鎖ノンコーディング RNA の探索と機能解析: 井上恭敏, 苗村円佳, 中川飛鳥, 濱崎彩花, 紫千大, 岡本春奈, 神武洋二郎. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
35. 化学修飾核酸の新規合成法: 江見友裕, 高松辰臣, 岡本大幹, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
36. 新規 β シート型ハイブリッドペプチドによる siRNA の無毒性細胞内導入: 添田晃吾, 柏原慎一, 上野桃子, 末廣優一, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
37. ミスマッチ塩基対またはバルジ構造を有する miRNA 様 siRNA の遺伝子サイレンシング効果: 新貝恭広, 藤井啓史, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
38. カチオン修飾 siRNA による遺伝子サイレンシング効果: 大野結有, 赤池香菜実, 峰松剛, 苗村円佳, 神武洋二郎, 藤井政幸. 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2015 年 6 月 27 日
39. 癌細胞増殖における長鎖非コード RNA, ANRIL の機能解明: 苗村円佳, 紫千大, 神武洋二郎. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山市, 2015 年 3 月 28 日
40. カチオン修飾 siRNA による遺伝子サイレンシング効果: 藤井政幸, 高科あゆみ, 苗村まどか, 神武洋二郎, 山吉麻子, 有吉純平, 村上章. 日本化学会第 95 春季大会, 船橋市, 2015 年 3 月 27 日
41. がん抑制遺伝子 p15/p16 を制御する長鎖非コード RNA, ANRIL の機能解析: 神武洋二郎, 苗村円佳, 紫千大. 第 18 回バイオ治療法研究会, 高松市, 2014 年 12 月 13 日
42. Efficient Transfection of siRNA by designed

peptides: Kayano H, Takashina A, Naemura M, Kotake Y, Morita Y, Fujii M. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu City, 2014 年 11 月 8 日

43. Regulation of RB and p53 pathways by long noncoding RNAs: Kotake Y, Naemura M, Murasaki C. The 1st International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference, Kitakyushu City, Japan, 2014 年 11 月 4 日

44. siRNA-ペプチド複合体の細胞内導入と遺伝子サイレンシング効果: 萱野光, 苗村円佳, 高科あゆみ 神武洋二郎, 森田資隆, 藤井政幸. 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014, 東京都, 2014 年 10 月 14 日

45. YB-1 binds to and activates cyclinD1 transcriptional activities in Non-Small-Cell lung cancer: 原田雅教, 神武洋二郎, 北川恭子, 丹伊田浩行, 梶村春彦, 北川雅敏. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2014 年 9 月 27 日

46. 長鎖非コード RNA, ANRIL によるがん細胞増殖制御機構の解明: 苗村円佳, 紫千大, 神武洋二郎. 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 佐賀市, 2014 年 9 月 9 日

47. 癌細胞における長鎖ノンコーディング RNA, ANRIL の機能解析: 苗村円佳, 神武洋二郎. 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2014 年 6 月 28 日

48. 長鎖ノンコーディング RNA による細胞死制御: 紫千大, 苗村円佳, 神武洋二郎. 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2014 年 6 月 28 日

〔図書〕(計 2 件)

1. ノンコーディング RNA テキストブック: 神武洋二郎. **羊土社**, 86-87, 2015.

2. 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発: 藤井政幸, 高科あゆみ, 神武洋二郎, 森田資隆, 山田康枝. **技術情報協会**, 262-267, 2014.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://blog.cc.fuk.kindai.ac.jp/biochem/labo/kotake/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神武 洋二郎 (KOTAKE, Yojiro)
近畿大学・産業理工学部・准教授
研究者番号 : 90531963

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()