

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640073

研究課題名(和文) 癌幹細胞の形成、維持に機能する長鎖ノンコーディングRNAの同定

研究課題名(英文) Long non-coding RNA associated with cancer stemness

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌細胞および癌幹細胞の形成、維持に機能する長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)を同定し、さらにその標的遺伝子の同定と作用機構の解析を行なうことを目的とする。まず、癌の自己複製に関与する事が予想されるlncRNAであるANRILについて、活性型Ras等の癌化シグナルによる発現制御に関して解析した。その結果活性型Rasの導入により発現が著明に抑制され、アポトーシスに関与するlncRNA PANDAは逆に増加する事を見いだした。次にPANDAの新規機能の解析を行なった。その結果、PANDAはp53の安定化に寄与しており、癌抑制遺伝子としての機能を持っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to identify long non-coding RNAs (lncRNA) associated with development of cancer cell and cancer stem cells. Moreover, we also investigated their function and regulation in molecular level. We found that expression of lnc RNA ANRIL, a lncRNA associated with cancerous self-growth, was suppressed by overexpression of activated Ras. In contrast, expression of lncRNA PANDA associated with apoptosis was upregulated. Moreover, we investigated a novel function of PANA in tumor suppression. We found that PANDA promoted stabilization of p53 protein. The result suggested that PANDA may be a tumor suppressor lncRNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：lncRNA cancer

1. 研究開始当初の背景

以前から細胞は長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) と呼ばれる mRNA 様の構造を持つタンパク質をコードしない RNA を多種発現していることが知られていた。これまで lncRNA は機能しない RNA でジャンクとされていたが、近年の研究で遺伝子の転写や翻訳の制御等多様な細胞機能に重要である事が示唆されてきた。癌においてはいくつかの lncRNA がヒト腫瘍検体で高発現していることが報告されている。しかし、癌の自己複製、転移、再発、抗がん剤耐性等の癌細胞および癌幹細胞が有する特性に関する責任遺伝子とその分子機構については不明の点が多く、これらに關する lncRNA に関してもほとんど未知であった。

我々は重要な癌抑制遺伝子である p15 や p16 等の CDK 阻害タンパク質遺伝子と同じ *INK4* 遺伝子座に存在し、p15 や p16 転写抑制に關する lncRNA である *ANRIL* を見いだした (Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., *Kitagawa, M. and *Xiong, Y.: Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15^{INK4B} tumor suppressor gene. *Oncogene* 30:1956-1962, 2011.)。 *ANRIL* は p15 や p16 の発現を抑制することから、新たな癌遺伝子候補と考えられる重要な lncRNA である。また lncRNA *PANDA* は DNA 障害によって誘導され、アポトーシスに關する遺伝子発現を制御する lncRNA として他グループが報告したが、機能やその作用機序には不明の点が多い。このように *ANRIL* や *PANDA* 等の lncRNA は癌の発生や進展に深く關与し、癌幹細胞の形成、維持にも關与することが予想されるが、その点については全く不明である。またこれらの発現を制御するシグナルやその伝達機構はほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞および癌幹細胞の形成、維持に關する lncRNA を探索し、さらにその誘導機構、標的遺伝子と作用機構等の解析を行なうことを目的とする。本研究の成果は、癌細胞あるいは癌幹細胞制御における新たな分子標的として lncRNA に注目し、癌の新しい治療法への応用に発展することが期待される。

3. 研究の方法

(1) Ras の活性化による *ANRIL*、*PANDA* の発現への影響を調べる為、正常ヒト線維芽細胞である WT38 あるいは TIG3 細胞に H-RasG12V を導入し、RNA を抽出し、*ANRIL*、*PANDA* の発現を RT-PCR により解析した。

また、Ras 経路の活性化に伴って変動する lncRNA を探索するため、WT38 細胞に H-RasG12V を導入し、RNA を抽出し、マイクロアレイによる解析を行い、対照 WI38 細胞と比較して Ras 経路の活性化の多様な遺伝子の発現への影響を解析した。

(2) lncRNA *PANDA* の癌抑制遺伝子様機能を調べる為、p53 が正常な U2OS 細胞を用いて実験を行った。U2OS 細胞に *PANDA* に対する siRNA あるいはコントロール siRNA をトランスフェクションし、*PANDA* をノックダウンし、経時的にサイクロヘキシミド処理を行い、p53 タンパク質の分解速度を p53 抗体を用いたイムノプロットにより解析した。*PANDA* や p53 等の mRNA の発現は RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 癌の自己複製に關する事が予想される lncRNA である *ANRIL* について、正常ヒト線維芽細胞である WT38 あるいは TIG3 細胞を用いて、活性型 Ras 等の癌化シグナルによる発現制御に關して解析した。その結果活性型

Ras の導入により *ANRIL* の発現が著明に抑制されることが判明した。一方で、DNA 障害によって誘導され、アポトーシスに關与する lncRNA *PANDA* は逆に増加する事を見いだした。正常細胞における過剰な癌化シグナルが、細胞に対し増殖停止あるいは老化 (premature senescence) に向かわせて、そのときに *ANRIL* は発現抑制され、*PANDA* は逆に発現上昇すると考えられた。

次に H-RasG12V を導入した WT38 細胞及び対照の WT38 細胞における発現遺伝子変動を、マイクロアレイで解析をした。その結果、Ras 経路の活性化により 243 (3.3%) の lncRNA が 2 倍以上発現上昇し、168 (2.3%) の lncRNA が 2 分の 1 以下に減少することがわかり、Ras の活性化により *ANRIL*、*PANDA* 以外に多様な lncRNA の発現変動が起こることが判明した (Kotake et al *cytotechnology*)。これらの中に癌細胞および癌幹細胞の形成、維持に關与する lncRNA が含まれることが予想され、今後はそれらを探索、同定し、機能解析を進めることが重要である。

(2) *PANDA* の新規機能の解析を行なった。その結果、*PANDA* は癌抑制遺伝子産物である p53 の安定性に關与していることが判明した。p53 が正常な U2OS 細胞において、siRNA により *PANDA* をノックダウンすると p53 の mRNA 量は減らなかったが、p53 タンパクが減少した。この減少はプロテアソーム阻害剤の添加で解消された。さらにサイクロヘキシミドを用いた安定性試験を行ったところ、*PANDA* をノックダウンすると p53 タンパク質の分解速度が速まっている (不安定化している) ことが判明した。エトポシド等の抗がん剤処理により細胞中の p53 はリン酸化され安定化するが、この時 *PANDA* をノックダウンすると p53 タンパク質の安定化は抑制された。以上より *PANDA* は癌抑制遺伝子産物である p53 の安定化に寄与しており、癌抑制遺伝子としての機

能を持っている lncRNA であることが示唆された (Kotake et al *Anticancer Res*)。今後は、癌幹細胞性との関係をさらに解析していく必要がある。

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 2 件)

Kotake, Y., Naemura, M., Kitagawa, K., Niida, H., Tsunoda, T., Shirasawa, S. and Kitagawa, M.: Oncogenic Ras regulates the expression of multiple lncRNAs. *Cytotechnology* in press.
doi:10.1007/s10616-014-9834-9

Kotake, Y., Kitagawa, K., Ohhata, T., Sakai, S., Uchida, C., Niida, H., Naemura, M., Kitagawa, M.: Long Non-coding RNA, *PANDA*, Contributes to the Stabilization of p53 Tumor Suppressor Protein. *Anticancer Res.* **36(4)**:1605-11, 2016.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

Kotake, Y. and Kitagawa, M.: Regulation of pRB and p53 Pathways by the Long Noncoding RNAs *ANRIL*, *lincRNA-p21*, *lincRNA-RoR*, and *PANDA*. *Long Noncoding RNAs*, edited by Kurokawa R., Springer, 175-189, 2015.
doi:10.1007/s10616-014-9834-9

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seika1.html

6．研究組織

(1)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

(3)連携研究者

大畑 樹也 (OHHATA, Tatsuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80616459

北川 恭子 (KITAGAWA, Kyoko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20299605

丹伊田 浩行 (NIIDA, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336671

内田 千晴 (UCHIDA, Chiharu)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授

研究者番号：60223567