

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04696

研究課題名(和文) 長鎖ncRNAが担うTGF-β経路の新規調節機構とがん細胞の運命制御

研究課題名(英文) A novel regulatory mechanism of TGF-β pathway via long non-coding RNA

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTGF-βによって誘導される新規lncRNA ELIT-1 (EMT-promoting lncRNA induced by TGF-β-1)を同定した。ELIT-1は、vimentin、Snail等の上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子の発現制御に関与して、EMTの誘導を正に制御して浸潤能の増強に関与し、ELIT-1の高発現は肺腺がんの予後不良と相関することを見出した。ELIT-1はTGF-β-Smad経路を介して転写誘導され、Smad3と特異的に結合し、Smad3の標的遺伝子プロモーターへのリクルートを促進するSmad cofactorであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が見出した新規lncRNA ELIT-1は、Smad3と結合することによりvimentin、Snail等の上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子の発現制御に関与して、EMTの誘導を正に制御して浸潤能の増強に関与する。さらにELIT-1の高発現は肺腺がんの予後不良と相関することも判明した。よってELIT-1はがんの予後マーカーとなる可能性がある。さらにELIT-1の発現や機能の阻害する化合物はがん転移抑制薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel lncRNA ELIT-1 (EMT-associated lncRNA induced by TGFβ-1) involved in TGFβ-signaling. ELIT-1 is transcriptionally and rapidly induced via TGFβ-Smad-pathway and promotes EMT and cell migration via expression of EMT-associated genes such as Snail and N-cadherin. A positive correlation between high expression of ELIT-1 and poor prognosis in lung adenocarcinoma cancer patients. ELIT-1 bound to Smad3 but not Smad2 and facilitated recruitment of Smad3 to promoter regions of the target genes. These results suggest that ELIT-1 binds to Smad3 and recruits to the Smad3-target genes such as Snail as a novel mediator of TGFβ-Smad pathway and thereby it is involved in promotion of EMT.

研究分野：分子生物学、腫瘍生物学

キーワード：TGF-β 長鎖ncRNA がん細胞 上皮間葉転換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$  経路は細胞増殖、生存、分化、遊走、線維化など、多様な機能を持つ重要な経路である。さらにがんにおいては EMT や転移、がん微小環境等に関与しているが、TGF- $\beta$  経路の全容はまだ見えていない。また、がん細胞の運命については TGF- $\beta$  経路の関与も含めて精力的に研究されてきたが、全容の解明には遠い。我々はゲノムのブラックボックスである長鎖 ncRNA (lncRNA) に注目して、細胞の運命制御に関与する lncRNA の同定とその分子機構の解明を目指している。

### 2. 研究の目的

本研究では、「長鎖 ncRNA を介した TGF- $\beta$  経路の新規制御機構と、がん細胞運命決定における機能」の解析を行う。特に我々の見出した TGF- $\beta$  によって誘導され、がん細胞の上皮間葉転換 (EMT) に関与する *ELIT-1* (EMT-promoting lncRNA induced by TGF-beta -1) の機能と作用の分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### I. TGF- $\beta$ による *ELIT-1* の発現誘導機構の解析

*ELIT-1* は TGF- $\beta$  刺激 2 時間後という早い時期から著明に誘導されることから、*ELIT-1* 遺伝子は TGF- $\beta$  経路の直接的な標的遺伝子である可能性が高い。Smad 経路、Non-Smad 経路の阻害剤 (TGF- $\beta$  I 型受容体阻害剤、Smad3 活性阻害剤および p38 阻害剤等) 処理及び、Smad 経路、Non-Smad 経路の関連因子のノックダウンが *ELIT-1* の発現に影響を及ぼすかを RT-qPCR で定量し、*ELIT-1* の発現誘導が Smad 経路か Non-Smad 経路のどちらを介するかを解析した。

#### II. *ELIT-1* による EMT 誘導機構の解析

TGF- $\beta$  経路による EMT 関連遺伝子発現制御における *ELIT-1* の役割の解析

A549 や Huh7 細胞等を用いた場合 TGF- $\beta$  刺激によって EMT が誘導されるが、*ELIT-1* のノックダウンにより EMT の指標である紡錘体型の細胞形態、上皮系マーカー (E-cadherin) の低下、間葉系マーカー (N-cadherin 等) の発現が如何にどんな時間軸で影響を及ぼされるかを RT-qPCR 及びこれら標的遺伝子のレポーターアッセイで解析した。

Smad と *ELIT-1* の結合の検証

293 細胞に FLAG-Smad2, 3 or 4 と *ELIT-1* および活性型 TGF- $\beta$  受容体を強制発現させ、FLAG 抗体で Smad を immunoprecipitation (IP) 後、Smad と結合している RNA を RT-qPCR で解析する RIP (RNA-IP) アッセイを行なった。この結合に TGF- $\beta$  シグナルによる Smad3 のリン酸化が必要かどうか、リン酸化部位変異型 Smad3 を用いて解析した。また A549 細胞で、TGF- $\beta$  刺激によって誘導される *ELIT-1* の、内在性 Smad3 との結合レベルを RIP で解析した。

*ELIT-1* の標的遺伝子転写制御機構の解明

*ELIT-1* KD によって発現変動が見られた E-cadherin, N-cadherin, PAI-1 等の TGF- $\beta$  下流の EMT-fibrosis 関連遺伝子を *ELIT-1* の直接の標的遺伝子の候補とし、レポーターアッセイで評価した。A549 および Huh7 細胞に上記分子のプロモーターを含むレポーターベクターと共に、*ELIT-1* と結合する Smad と *ELIT-1* の発現ベクターを導入し、*ELIT-1* と結合因子によるレポーター活性を解析する。さらにそれらの *ELIT-1* 結合因子の標的遺伝子に対する結合を *ELIT-1* が変動させるか、ChIP アッセイで検証した。

### 4. 研究成果

#### I. TGF- $\beta$ による *ELIT-1* の発現誘導機構

*ELIT-1* 遺伝子上流には Smad 結合配列が複数存在することが判明した。

Smad 経路、Non-Smad 経路の阻害剤処理実験の結果、TGF- $\beta$  I 型受容体阻害剤、Smad3 活性阻害剤で *ELIT-1* の発現は阻害されたが、p38 阻害剤等の処理では阻害されなかった。Smad2, 3 あるいは 4 のノックダウンにより *ELIT-1* の発現は阻害された。

以上より Canonical な TGF- $\beta$ -Smad 経路を介して *ELIT-1* 遺伝子の転写が誘導されることがわかった。

## II. *ELIT-1* による EMT 誘導機構

*ELIT-1* は、*N-cadherin*、*vimentin*、*Snail* 等の上皮間葉転換(EMT)関連遺伝子の発現制御に関与して、EMT の誘導を正に制御することを見出した。また、*ELIT-1* は Smad2 ではなく Smad3 と特異的に結合することが RIP assay により証明された。さらに *ELIT-1* は Smad3 の標的遺伝子プロモーターへのリクルートを促進することが ChIP assay により判明した。*ELIT-1* は TGF- $\beta$  によって誘導されて Smad と直接結合して、Smad cofactor として TGF- $\beta$  経路を正に制御する lncRNA であることが示された(Sakai et al Cancer Res 2019)。一方で *ELIT-1* はがん細胞の EMT の誘導を介して浸潤能の増強に関与し、その高発現は胃がんや肺腺がんの予後不良と相関することが判明した。

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, Kitagawa M	4. 巻 79
2. 論文標題 Long noncoding RNA ELIT-1 acts as a Smad3 cofactor to facilitate TGF- $\beta$ /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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 北川 雅敏, 大畑 樹也, 酒井 聡
2. 発表標題 上皮間葉転換に関する新規 lncRNA
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会 シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masatoshi Kitagawa, Tatsuya Ohhata, Satoshi Sakai
2. 発表標題 A novel lncRNA ELIT-1 promotes epithelial-mesenchymal transition via TGF $\beta$ -Smad pathway
3. 学会等名 第43回内藤コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masatoshi Kitagawa, Satoshi Sakai, Masanori Harada
2. 発表標題 ヒト肺腺癌において肺転写因子であるNKX2-1はサイクリンD1の転写亢進に関する
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井聡、大畑樹也、北川雅敏
2. 発表標題 TGFbeta-Smad経路を介した上皮間葉転換を制御する新規長鎖ncRNA
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masatoshi Kitagawa, Tatsuya Ohhata, Satoshi Sakai
2. 発表標題 A novel long noncoding RNA promotes epithelial-mesenchymal transition via TGF- $\beta$ -Smad pathway
3. 学会等名 BIT's 10th Annual World Cancer Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masatoshi Kitagawa, Tatsuya Ohhata, Satoshi Sakai
2. 発表標題 A novel lncRNA binding to Smad3 promotes TGFbeta-Smad signaling and epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 EMBO-WS Cellular signaling and cancer therapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川雅敏, 酒井聡, 大畑樹也
2. 発表標題 新規 lncRNA ELIT-1 は Smad3 コファクターとして TGF $\beta$ 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 TGF $\beta$ によって誘導され、TGF $\beta$ -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 M.Kitagawa, S.Sakai
2. 発表標題 A novel lncRNA ELIT-1 promotes Snail induction and EMT via TGF $\beta$ 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 M.Kitagawa, T.Ohhata, S.Sakai
2. 発表標題 Long noncoding RNA ELIT-1 act as a Smad3 cofactor to promotes TGF $\beta$ -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〕

浜津医科大学 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
研究協力者	酒井 聡  (Sakai Satoshi)  (50566081)	浜松医科大学・医学部・助教    (13802)	
研究協力者	大畑 樹也  (Ohhata Tatsuya)  (80616459)	浜松医科大学・医学部・助教    (13802)	