

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07196

研究課題名(和文) LncRNA解析による癌幹細胞の治療開発

研究課題名(英文) Development of therapy for the cancer stem cell by LncRNA

研究代表者

大塚 正久(Otsuka, Masahisa)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20597455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌幹細胞関連のLncRNAを検討するために、我々が開発したODC-degron濃縮システムを用いて、大腸癌細胞株から癌幹細胞分画を抽出、濃縮し、網羅的解析としてRNA-sequencingを行った結果、LINC01534が高発現を示していた。大腸癌臨床データを用いた解析にてLINC01534高発現群は有意に予後不良であった。また、LINC01534の発現をsiRNAによって抑制したところ、大腸癌細胞株において細胞増殖が有意に抑制され、細胞周期がG2/M期で停止した。さらに、LINC01534は小胞体ストレス・オートファジー関連遺伝子に影響を与える事を解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌幹細胞は癌治療抵抗性や再発・転移の原因としての関与が報告されており、癌幹細胞を標的とした治療法や新規バイオマーカーの開発が望まれている。本研究の成果は大腸癌幹細胞に特異的なLncRNAであるLINC01534を見出し、それが癌幹細胞に特異的なメカニズムにも影響していることを突き止めた。本研究で大腸癌幹細胞関連LncRNAとしてLINC01534を同定し、大腸癌の再発、転移のバイオマーカーとして、また、新規の治療ターゲットとしての可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To identify the LncRNA related to the cancer stem cells (CSCs), we separated the CSCs and non-CSCs in CRC using the ODC degron system and CSC fraction was augmented. Then, we performed comprehensive gene analysis using CSCs and found that LINC01534 showed high expression in CSCs. Using clinical samples from CRC patients, LINC01534 was associated with poor prognosis in CRC. Functional studies revealed that the LINC01534 knockdown suppressed the cell proliferation and arrested the cell cycle at G2-M phase in CRC cells. Furthermore, we showed that the knockdown of LINC01534 affected the expression of genes related to endoplasmic reticulum (ER) stress and autophagy. Together, we demonstrated the clinical and biological relevance of LINC01534 in association with CSCs, and discovered the effect of LINC01534 on ER stress and autophagy in CRC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸癌 幹細胞 Long non-coding RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、高齢化や食生活の欧米化等により増加傾向にある。その中でも、再発・転移や治療抵抗性に関わるとして、癌幹細胞 (Cancer Stem Cell: CSC) が注目されている。しかし、癌幹細胞は癌細胞集団の中で極めて少数しか存在しないために、その生物学的特性を解析することは困難であった。我々は、ZsGreen 蛍光タンパクとプロテアソーム認識部位である degron 配列を発現するレトロウィルスベクターを細胞に形質導入し、プロテアソーム活性の低い細胞では分解されず緑色に光るのに対してプロテアソーム活性の高い細胞では分解され gray になる事を利用し、緑色のプロテアソーム活性の低い細胞について解析したところ、それらの集団は癌幹細胞様性質をもつことを明らかにした。この低プロテアソーム活性を可視化する ODC-degron システムを用いて、大腸癌における癌幹細胞と非癌幹細胞を分離するシステムを構築した。一方、多くの研究を通じて、タンパクに翻訳されない RNA である non-coding RNA が注目されている。本研究ではその中で、200 塩基以上で構成される長鎖非コード RNA (Long non-coding RNA : LncRNA) に着目した。LncRNA は蛋白質と直接結合でき、クロマチンの構造を変化させる、あるいは microRNA に対するスポンジ効果によりエピジェネティクスを制御する。その結果、癌の悪性度や幹細胞性にも関与することが示されている。一方で、癌幹細胞と LncRNA との関連については未だに不明な点が多い。

2. 研究の目的

ODC-degron システムで抽出した癌幹細胞を用いて網羅的な検索を行うことで、大腸癌幹細胞に関連する LncRNA を見つけ出す。その LncRNA が大腸癌の予後に影響を与えるかを検証し、それとともに細胞実験において増殖や細胞周期などの癌の性質にどのように作用するかを調べる。さらに、その LncRNA が大腸癌幹細胞のどのようなメカニズムと関連しているかを検証し、同定した LncRNA の大腸癌幹細胞のバイオマーカーとしての有用性や新規治療薬のターゲットとしての可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 癌幹細胞濃縮法による癌幹細胞の分離と LncRNA の網羅的遺伝子発現解析

大腸癌細胞株 HCT116 を用いて、ODC-degron システムを利用した手法により癌幹細胞とそれ以外の癌細胞 (コントロール) に分離した。分離した細胞を RNA-sequencing によって網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) 手術検体、クリニカルデータベースを用いた LncRNA の発現解析

大阪大学 消化器外科で保管している手術検体から抽出した癌部の RNA 検体を用いて当該 LncRNA の遺伝子発現を qRT-PCR 法にて評価し、臨床病理学的因子および予後との相関を検証した。また、大規模ゲノムデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) データセットにより当該 LncRNA の臨床的意義を検索することで、多角的に臨床的に臨床評価を行った。

(3) LncRNA の細胞学的機能解析

RNA-sequencing、予後解析によって選出した LncRNA を対象に、siRNA によってノックダウンを行い、細胞学的機能解析を行った。また、ノックダウンした細胞とコントロール細胞のサンプルを用いて RNA-sequencing を行い、LncRNA が関連する遺伝子発現と pathway を検証した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌幹細胞に関連する LncRNA の検索

大腸癌細胞株 HCT116 を用いて、プロテアソーム活性の低い細胞が癌幹細胞様性質をもつことを利用した ODC-degron システムを用いて分離した大腸癌幹細胞とコントロール細胞における遺伝子発現を RNA-sequencing を用いて比較したところ、癌幹細胞分画において、34 種類の LncRNA で 2 倍以上発現が亢進していた。同定した 34 種類の LncRNA のうち、18 種類で大規模ゲノムデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) データセットから抽出した大腸癌臨床データを用いて予後解析を行うことができた。その結果、LINC01534 高発現群は有意に予後不良であることが明らかとなった。

(2) LINC01534 の臨床における意義の検討

大阪大学消化器外科に保管されていた大腸癌臨床検体 187 例(手術日期間; 2003 年 6 月~2005 年 9 月)を用いた検証でも、LINC01534 高発現群は低発現群と比較して Overall Survival (OS) ・ Disease Free Survival (DFS) のいずれにおいても予後不良であった。また多変量解析において、LINC01534 高発現は OS における独立予後不良因子であった。

(3) 大腸癌細胞株を用いた機能解析

siLINC01534 を用いて LINC01534 の発現を抑制したところ、大腸癌細胞株 HCT116/SW480 において細胞増殖能が低下した。また G2/M arrest の誘導、Cdc2、 Cyclin B1、 CDC25B、 CDC25C などの発現低下を認めた。

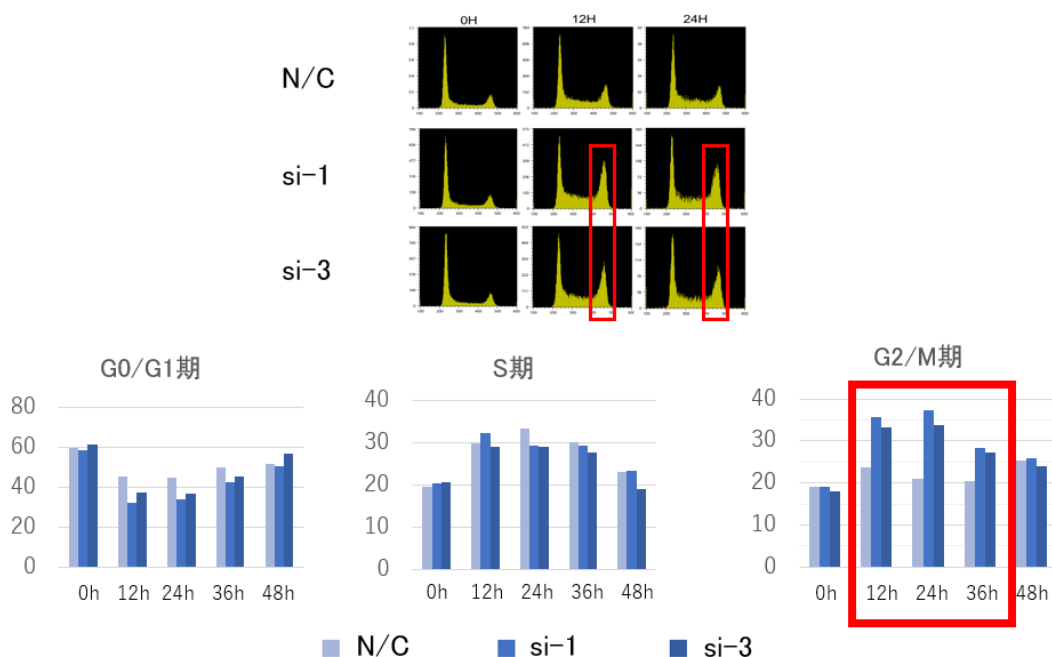


図1. LINC01534 ノックダウンによる G2/M arrest の誘導

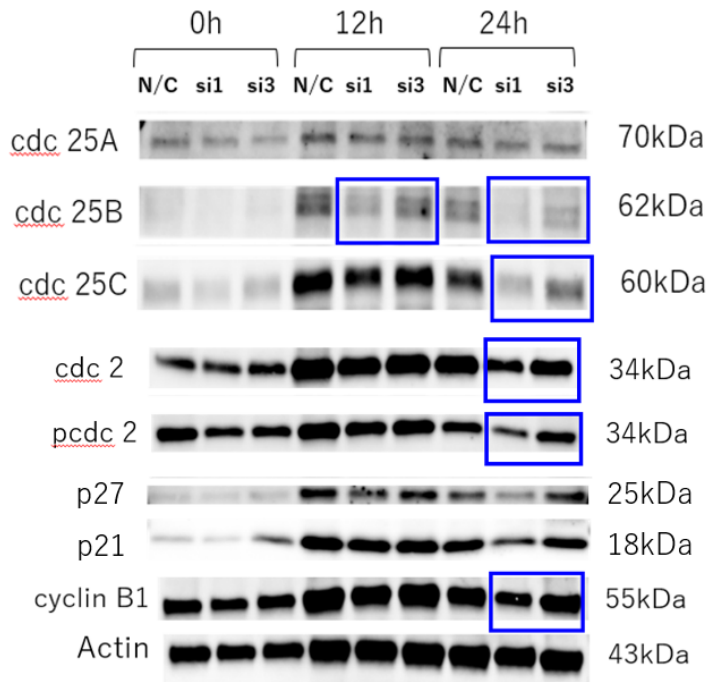


図 2. LINC01534 ノックダウンによる細胞周期制御因子の発現変化

LINC01534 ノックダウンにより発現亢進した遺伝子群を Ontology 解析による分析を行った結果、小胞体ストレス応答関連遺伝子群の発現亢進を認めた。小胞体ストレス応答とは不良タンパクが生じることにより働く応答であり、主に PERK pathway、IRE1 α pathway、ATF6 α pathway がある。LINC01534 ノックダウンにより発現亢進した遺伝子群を RNA-sequencing にて網羅的に解析した結果、PERK、ATF4、CHOP、HSPA5 の発現亢進を認めた。大腸癌細胞株 HCT116/SW480 を用いて、Western blotting で LINC01534 ノックダウンによる小胞体ストレス応答関連蛋白の発現変化を調べた結果、HSPA5、ATF4 の発現亢進を認めた。さらに飢餓状態においては、HSPA5、p-eIF2 α 、ATF4、ATF3、CHOP の発現亢進を認め、PERK pathway を主とした小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現亢進を確認した。



図 3. 飢餓状態下での LINC01534 ノックダウンによる小胞体ストレス応答関連タンパクの発現変化

以上の結果より、LINC01534 は癌幹細胞様集団で発現が上昇している予後不良因子であること、PERK pathway を主とした小胞体ストレス応答を介して細胞周期に影響を与えることで、大腸癌細胞の生存に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahisa Ohtsuka, Naotsugu Haraguchi, Norikatsu Miyoshi, Hidekazu Takahashi, Taishi Hata, Chu Matsuda, Masahiro Tanemura, Hiroki Akamatsu, Tsunekazu Mizushima, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hirofumi Yamamoto
2. 発表標題 Long Noncoding RNA Regulates Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 正久, 原口直紹, 池嶋 遼, 大原 信福, 三吉範克, 高橋秀和, 畑泰司, 松田 宙, 種村匡弘, 赤松大樹, 水島恒和, 土岐祐一郎, 森正樹, 山本 浩文
2. 発表標題 大腸癌における癌幹細胞関連長鎖非コードRNAについての検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 正久, 原口 直紹, 鈴木 陽三, 高橋 秀和, 種村 匡弘, 赤松 大樹, 水島 恒和, 土岐 祐一郎, 森 正樹, 山本 浩文
2. 発表標題 大腸癌における長鎖非コードRNAの機能解析
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	