

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06057

研究課題名（和文）上皮間葉転換を制御するlncRNAの探索とその機能の解明

研究課題名（英文）Search and function elucidation of lncRNAs that regulate epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

寺島 農 (Terashima, Minoru)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80507434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らはこれまでに、がん悪性化機構の1つとして考えられている上皮間葉転換（EMT）に着目し、エピジェネティクス制御因子であるポリコム抑制複合体（PRC2）が、上皮系遺伝子の発現を抑制することで、EMTを誘導すること、さらに、長鎖非コードRNA（lncRNA）の1つであるMEG3が、PRC2が標的遺伝子座へ近づく際のガイドとして機能することを示した。本研究では、ゲノム上でMEG3と隣接するlncRNAであるRIAN（MEG8）が、MEG3とは異なる機構でEMTに関わることを示唆する結果を得た。本研究成果は、lncRNAが関わるがん悪性化機構の理解につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、EMTの制御に関与するlncRNAの探索・同定とその機能解析から、EMTのエピジェネティック調節を司る新しい機能性分子としてのlncRNAの役割を明らかにする。これは、腫瘍の悪性進展を導くlncRNAの機能を解明するものであり、この成果を基盤として、lncRNAの新しいがん治療標的としての可能性を開拓できる。

研究成果の概要（英文）：We have focused on epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a mechanism of cancer progression and reported that polycomb repressive complex (PRC2), which is one of epigenetic regulators, induces EMT by repressing the expression of epithelial genes. Furthermore, MEG3 long noncoding RNA contributes to epigenetic regulation of EMT by guiding PRC2 to its target gene loci. In this study, we proposed that RIAN (MEG8) long noncoding RNA, which shares the DLK1-DIO3 locus with MEG3, is involved in EMT in a different manner from MEG3. These results contribute to understanding of long noncoding RNA involved in cancer progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：上皮間葉転換 EMT 長鎖非コードRNA lncRNA ポリコム抑制複合体 PRC2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の悪性化機構の1つである EMT (上皮間葉転換; 上皮細胞が上皮性を失い、浸潤、転移しやすい間葉系細胞の性質を獲得すること) が引き起こされる際に、エピジェネティクス制御がどのようにして行われているかに着目して研究を行っている。研究開始当初、TGF β (トランスフォーミング増殖因子) を添加することにより EMT を引き起こす EMT モデル細胞を用いて、以下の事を示唆する結果が得られていた。

- エピジェネティック制御因子であるポリコーム抑制複合体 (PRC2) および PRC2 結合タンパク質の1つである JARID2 が上皮系遺伝子の発現を抑制することにより EMT を誘導すること。
- PRC2-JARID2 複合体が E-カドヘリンなどの上皮系遺伝子座を認識して結合する際に、lncRNA (長鎖非コード RNA; タンパク質をコードしない 200 塩基以上に RNA) の1つである MEG3 がガイドとして機能する可能性があること。
- ゲノム上で MEG3 と隣接する lncRNA である RIAN (MEG8) も MEG3 と同様、EMT 誘導時に発現が上昇し、RIAN をノックダウンすると EMT が阻害されることから、EMT に重要な役割を果たす可能性があること。一方で、RIAN をノックダウンした時の細胞形態や、上皮・間葉系遺伝子の発現への影響から、RIAN の作用点は MEG3 と異なっており、EMT における機能は MEG3 とは異なっている可能性があること。

2. 研究の目的

本研究では、EMT における RIAN (MEG8) の機能を調べ、EMT プロセスにおける上皮・間葉系遺伝子の発現スイッチを司る制御因子として、RIAN の作用機序と、MEG3 との機能分担を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) (定量 PCR 法) RIAN (MEG8) などの lncRNA および、E-カドヘリンなどの上皮マーカーの RNA 発現量を、定量 PCR によって検出する。
- (2) (ウエスタンブロット法) 上皮マーカー、間葉マーカーのタンパク質発現レベルを、それぞれの抗体を用いたウエスタンブロットにより検出する。
- (3) (クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法) E-カドヘリンなどの遺伝子座におけるヒストンのメチル化レベル、PRC2 や JARID2 のリクルートメントレベルを、ChIP アッセイによって確かめる。
- (4) (RNA 免疫沈降 (RIP) 法) PRC2 や JARID2 に対する RIAN (MEG8) の相互作用の有無を確かめる。
- (5) (RNA 精製によるクロマチン分離 (ChIRP) 法) E-カドヘリンなどの遺伝子座における RIAN (MEG8) のリクルートメントレベルを確かめる。RIAN (MEG8) 特異的に結合できるビオチン化したオリゴにより RIAN (MEG8) をプルダウンし、一緒に共沈してくるゲノム領域を定量 PCR により測定する。

4. 研究成果

まず、RIAN (MEG8) が EMT プロセスに関わる可能性があるかどうかを確かめるために、EMT モデル細胞における発現を調べた。モデル細胞が TGF β によって間葉細胞へ移行する際に、RIAN (MEG8) は顕著に発現上昇していた (図 1)。

次に、EMT における RIAN (MEG8) の影響を確かめるために、モデル細胞の RIAN (MEG8) をノックダウンし、上皮、間葉マーカーの発現を調べた。コントロール細胞では、TGF β 添加によって、上皮マーカー (E-カドヘリン) や miR-34a、miR-203 (SNAI1、SNAI2 を標的とするマイクロ RNA) の発現は抑制され、間葉マーカー (ファイブロネクチン、ビメンチン、SNAI1、SNAI2、ZEB1) の発現は誘導されるが、RIAN (MEG8) をノックダウンした細

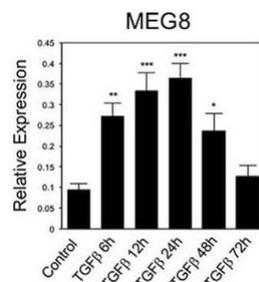


図 1; TGF β によって誘導される EMT において、RIAN (MEG8) の発現は上昇する。Control (TGF β 添加前) とそれに、TGF β を添加して間葉転換した細胞における RIAN (MEG8) の発現レベルを定量 PCR によって、調べた。

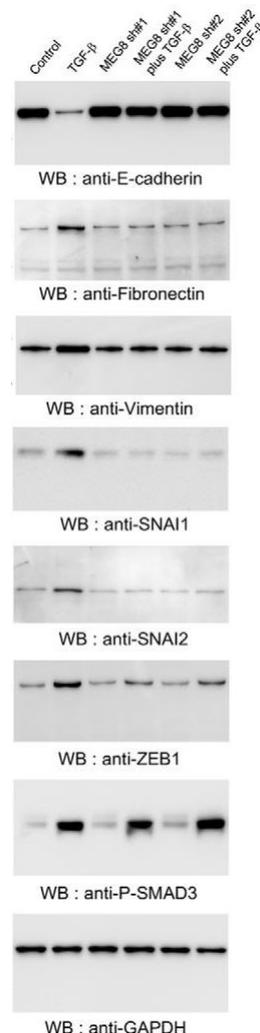


図 2; RIAN (MEG8) のノックダウン (KD) により EMT の進行が阻害される。Control、それに TGF β を添加した細胞 (+TGF β)、RIAN (MEG8) ノックダウン細胞 (MEG8 KD)、それに TGF β を添加した細胞 (MEG8 KD+TGF β) における上皮マーカー、間葉マーカーの発現レベル。

胞では上皮マーカーの発現は抑制されず、間葉マーカーの発現は誘導されなかった(図2)。さらに、RIAN(MEG8)を大量発現させると、TGFβを添加しなくても、E-カドヘリンやmiR-34a、miR-203の発現が抑制されたことから、RIAN(MEG8)は上皮マーカーやmiR-34a、miR-203の発現を抑制することによりEMTの進行に関わることが示唆された(データ省略)。

これまでに、miR-200ファミリーなどの発現抑制には、PRC2-JARID2複合体が関わることが分かっていたので、miR-34a、miR-203の遺伝子座におけるPRC2リクルートメント、およびPRC2によって引き起こされるH3K27のメチル化レベルを、PRC2を構成するタンパク質であるEZH2、およびH3K27me3抗体を用いたChIP法によって調べた。Control細胞では、TGFβ添加によって、EZH2を含むPRC2がmiR-34a、miR-203遺伝子座へリクルートされ、H3K27のメチル化レベルが上昇するが、RIAN(MEG8)を大量発現させた細胞では、TGFβを添加しなくてもPRC2がリクルートされ、H3K27のメチル化レベルが上昇した(図3)。よって、RIAN(MEG8)はPRC2-JARID2複合体をmiR-34a、miR-203の遺伝子座へリクルートすることに関わることによって、EMTを制御している可能性が示唆された。

そこで、RIAN(MEG8)が直接PRC2-JARID2複合体と相互作用することによって、複合体のリクルートメントに関わっているかどうかを、RIP法により調べた。JARID2-FLAGをFLAG抗体により免疫沈降すると、RIAN(MEG8)はほとんど検出されなかったが、EZH2抗体により免疫沈降すると、RIAN(MEG8)が検出されたので、EZH2およびRIAN(MEG8)は相互作用することが示唆された(図4)。

最後に、RIAN(MEG8)自体がmiR-34a、miR-203遺伝子座へリクルートされているかをChIRP法により確かめた。RIAN(MEG8)はTGFβを添加した時、およびRIAN(MEG8)を大量発現させたときにmiR-34a、miR-203遺伝子座へリクルートされた(図5)。

以上より、RIAN(MEG8)はPRC2-JARID2複合体と共にmiR-34a、miR-203の遺伝子座へリクルートされ、それらの遺伝子発現制御に関わることにより、EMTの進行に寄与することが示された。研究開始当初に発見していたMEG3は、PRC2-JARID2複合体と共にE-カドヘリン、miR-200などの遺伝子座へリクルートされ、それらの遺伝子発現を制御することによってEMTに関わるが、RIAN(MEG8)はPRC2-JARID2複合体をMEG3とは異なる遺伝子座へのリクルートに寄与することによってEMTに関わることが明らかになった。これらの結果を含んだ成果を、2018年JBC誌へ報告した。

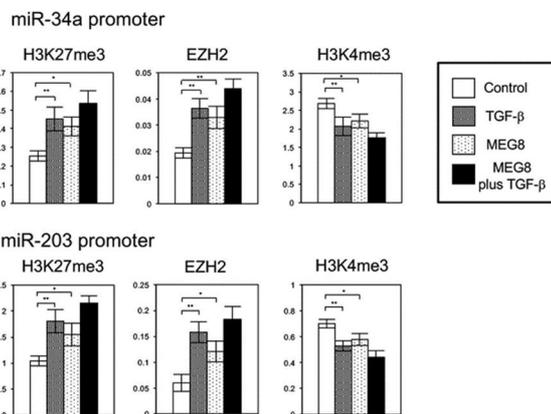


図3;RIAN(MEG8)の大量発現によりPRC2がmiR-34a、miR-203遺伝子座にリクルートされ、H3K27me3のレベルが上昇する。Control、それにTGFβを添加した細胞(TGFβ)、RIAN大量発現細胞(MEG8)、それにTGFβを添加した細胞(MEG8 plus TGFβ)におけるmiR-34a、miR-203遺伝子座のPRC2リクルートメントおよびH3K27のトリメチル化レベル。

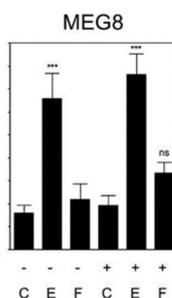


図4;RIAN(MEG8)はEZH2と相互作用する。JARID2-FLAGを大量発現細胞させた細胞(+)とさせていない細胞(-)から、マウスIgG(C)、EZH2(E)もしくはFLAG(F)抗体によってEZH2もしくはJARID2を免疫沈降し、一緒に沈殿してくるMEG8を定量PCRによって検出。

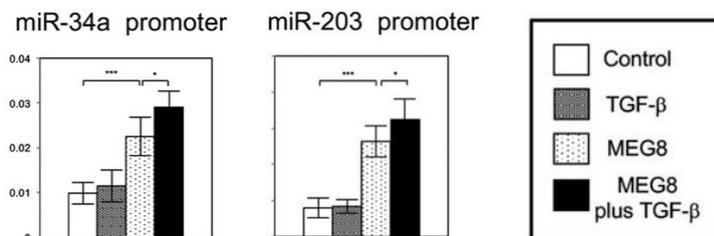


図5;RIAN(MEG8)はmiR-34a、miR-203遺伝子座へTGFβ依存的にリクルートされる。Control、それにTGFβを添加した細胞(TGFβ)、RIAN大量発現細胞(MEG8)、それにTGFβを添加した細胞(MEG8 plus TGFβ)におけるmiR-34a、miR-203遺伝子座のRIAN(MEG8)リクルートメントレベル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wanna-Udom Sasithorn, Terashima Minoru, Suphakhong Kusuma, Ishimura Akihiko, Takino Takahisa, Suzuki Takeshi	4. 巻 296
2. 論文標題 KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF- β -induced epithelial mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100213 ~ 100213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wang R, Yamada T, Kita K, Taniguchi H, Arai S, Fukuda K, Terashima M, Ishimura A, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yamashita K, Yamano T, Yoshimura A, Takayama K, Kaira K, Taniguchi Y, Atagi S, Uehara H, Hanayama R, Matsumoto I, Han X, Matsumoto K, Wang W, Suzuki T, Yano S	4. 巻 11
2. 論文標題 Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4607 ~ 4620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18442-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakai Katsuya, Nishiuchi Takumi, Tange Shoichiro, Suzuki Yoshinori, Yano Seiji, Terashima Minoru, Suzuki Takeshi, Matsumoto Kunio	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteasomal degradation of polycomb-group protein CBX6 confers MMP-2 expression essential for mesothelioma invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16678 ~ 16693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72448-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wanna-udom Sasithorn, Terashima Minoru, Hanbing Lyu, Ishimura Akihiko, Takahisa Takino, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara, Suzuki Takeshi	4. 巻 524
2. 論文標題 The m6A Methyltransferase METTL3 Contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Lung Cancer Cells Through the Regulation of JUNB	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 150-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Terashima Minoru, Ishimura Akihiko, Wanna-udom Sasithorn, Suzuki Takeshi	4. 巻 293
2. 論文標題 MEG8 long noncoding RNA contributes to epigenetic progression of the epithelial-mesenchymal transition of lung and pancreatic cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18016 ~ 18030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 1.Terashima M, Ishimura A, Nishimura T, Tange S, Hazawa M, Richard W Wong, Suzuki T.
2. 発表標題 The mechanism of transcriptional regulations controlling epithelial-mesenchymal transition in cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺島 農, 石村 昭彦, 西村 建徳, 丹下 正一朗, 鈴木 健之
2. 発表標題 Analysis of epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factor candidates in cancer cells.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺島 農, 石村 昭彦, 西村 建徳, 丹下 正一朗, 村田 翔, 角崎 景南, 鈴木 健之
2. 発表標題 がん細胞の上皮間葉転換を活性化する新たな転写因子の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺島 農
2. 発表標題 ヒストンメチル化を指標にした上皮間葉転換を活性化する新規転写因子の探索
3. 学会等名 第5回北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学がん進展制御研究所 機能ゲノミクス分野
<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/Genomics/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
研究分担者	鈴木 健之 (Suzuki Takeshi) (30262075)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------