

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08007

研究課題名（和文）超保存領域のRNA修飾を介した細胞周期制御と大腸がん悪性化メカニズム

研究課題名（英文）RNA methylation of T-UCRs regulates colon cancer progression

研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：00563454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：高等生物ゲノムにのみ保存された超保存領域（ultraconserved region: UCR）はヒトゲノムに481か所存在するが、その生理機能は未だ不明である。

UCRより作り出されるRNA群（Transcribed-UCRs: T-UCRs）の一部ががん細胞に蓄積しがん細胞の増殖や浸潤性の獲得に寄与する。T-UCRが何故がん細胞の核にのみ発現するのか、大腸がん特異的なm6A RNAメチル化修飾の分子基盤を検討した。本研究成果により、がん細胞に特異的なm6A RNAメチル化修飾が、中途ストップコドンを持つ異常RNAの生成及び核内蓄積に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したT-UCRは中途ストップコドンを持ちタンパク質には翻訳されず、従来速やかに分解されるRNAであるため、T-UCRの蓄積は疾患特異的なバイオマーカーと成り得る。

本研究成果によって、T-UCRががん細胞核に蓄積するメカニズムの一端として、がん細胞に特徴的なm6A RNAメチル化修飾パターンと関連するRNA結合タンパク質を見出した。今後、がん細胞のみで認められるメチル化修飾配列を標的とした、正規タンパク質発現に影響を与えない、新しいコンセプトの核酸医薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：RNA methylation at adenosine N6 (m6A) is one of the most common RNA modifications which affects RNA processing, transport, and translation. Ultraconserved regions (UCRs) are 481 genomic sequences with 100% identity across humans, rats, and mice. Increasing evidence suggests that non-coding RNAs transcribed from UCRs are involved in various diseases, especially cancers.

Overexpression of T-UCR in colon cancer cells promoted cell proliferation by changing the expression of G2/M-related cell cycle regulators. m6A methylation of T-UCR was upregulated in cancer cells, compared with that of normal colon epithelial cells. We found m6A methylated RNA preferentially bound to several cancer-related RNA-binding proteins. Inhibition of m6A methylation decreased T-UCR levels and cell growth of colon cancer cells. These results suggest that m6A modification plays a pathogenic role in cell proliferation of cancer cells and may become a potential biomarker and therapeutic target for colon cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA修飾 RNAメチル化 選択的スプライシング 大腸がん 超保存領域

1. 研究開始当初の背景

(1) ultraconserved region (超保存領域: UCR) は、マウスからヒトまでの高等生物に種を超えて 100%保存された領域であり、ゲノム上に 481 か所存在する。UCR の大部分は、転写因子や選択的スプライシング調節因子をコードする遺伝子領域に分布しているが、その生理学的意義は未だわかっていない。進化の過程で、限られた遺伝子数から、高等生物の遺伝子の多様性の獲得に寄与したと考えられるが、同時に、癌や神経変性疾患、高度免疫機能を含む複雑な疾患の発症リスク経路に関与する可能性がある。

(2) UCR より転写される転写産物 RNA 群 (Transcribed-UCRs: T-UCRs) のいくつかは、ヒトにおいて発生段階・組織特異的及び疾患依存的な発現パターンを示すことが報告されている。

(3) スプライシング調節因子 SR (Ser/Arg) タンパク質 (SRSF) ファミリー (*SRSF1-10*) の遺伝子領域より転写された T-UCRs は、中途ストップコドン (PTC) を含むが、RNA 品質管理機構であるナンセンス RNA 分解 (NMD) により分解を受けず、がん細胞の核内に異常蓄積することを見出している。さらに、これまでの研究において、T-UCR のひとつ uc. 138 RNA は大腸がん組織に高発現し、細胞増殖と浸潤能に寄与すること、マウス腫瘍移植モデルにて腫瘍形成を有意に促進することを見出している (Kuwano et. al., Sci Rep. 2021)。

2. 研究の目的

スプライシング因子 SR(Ser/Arg) タンパク質ファミリー (*SRSF1-10*) の遺伝子領域から転写される T-UCR 群は中途ストップコドンを持つため、タンパク質に翻訳されず、「ジャンク RNA」として速やかに分解されると考えられた。しかしながら、SRSF ファミリー由来の T-UCR RNA は正常組織にはほとんど発現しないが、なぜがん細胞では分解を受けずに蓄積されるのか、メカニズムは分かっていない。

そこで、DNA 障害やストレスに応答しリバーシブルな RNA 修飾であるアデノシン N6 位のメチル化 (Methyl-6-adenosine (m^6A)) に着目した。UCR を含む RNA はステムループやグアニン四重鎖 (G-quadruplex : G4) 構造などユニークな機能配列を持ち、RNA の修飾が T-UCR の二次構造と細胞内局在を調節する可能性は十分に考えられる。RNA 転写後調節による超保存領域の活性化の報告は未だなく、本研究の目的として、「高等生物のみが有する T-UCR の RNA メチル化スイッチを介した新しい大腸がん制御メカニズム」の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞におけるメチル化 RNA の次世代シーケンスによる網羅的解析 (MeRIP-seq):

T-UCR 群の一部は正常細胞ではほとんど発現しないにも関わらず、がん細胞の核内に高発現することを見出している。メチル化 RNA を特異的に認識する抗体及び IgG 磁気ビーズを用いたメチル化 RNA 免疫沈降によって、大腸がん細胞における高メチル化 RNA を抽出し、イルミナ社の次世代シーケンスによる網羅的解析 (MeRIP-seq) を行った。得られた結果はリアルタイム PCR によりバリデーションを行った。

(2) oncogenic RNA uc. 138 のメチル化配列の特定と結合タンパク質の同定:

ヒト大腸がん組織組織パネルを用い、 m^6A RNA メチル化関連因子 (メチル化酵素、脱メチル化酵素、 m^6A 結合タンパク質) の発現スクリーニングを行い、正常組織と比較し、がん細胞で発現変動するがん関連因子を同定した。その中で uc. 138 のメチル化特異的に結合するタンパク質をビオチン化 RNA-pulldown アッセイにより同定した。

(3) METTL3 の特異的 RNA メチル化阻害剤 (STM_2457) によるがん細胞の RNA 発現プロファイル:

がん細胞において RNA メチル化酵素 Mettl3 を選択的に阻害し、メチル化依存的に発現調節を受ける RNA を次世代シーケンスによる網羅的解析 (RNA-seq) によって同定した。得られたデ

ータはパスウェイ解析により生理的意義のクラス化を行った。

(4) RNA メチル化阻害剤を使用した m⁶A 阻害によるがんのフェノタイプへの影響：

RNA メチル化酵素活性をもつ METTL3 を選択的に阻害し、大腸がん細胞における細胞周期関連因子の発現変動、細胞老化、細胞増殖、浸潤能等のフェノタイプを比較し、RNA メチル化によるがん悪性化調節を検討した。

(5) がん組織中の m⁶A メチル化 RNA 量の検出：

m⁶A RNA dot blot を用い、ステージの異なるがん検体の RNA メチル化量を比較し、新規バイオマーカーとしての可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 大腸がん細胞における m⁶A メチル化 RNA の網羅的解析 (MeRIP-seq)

先行研究より、メチル化 m⁶A 特異的抗体(図 1a)と lncRNA カスタムマイクロアレイを用い、大腸がん細胞株における T-UCR の RNA メチル化ステータスを解析した。その結果、メチル化ステータスが変動する数種類のがん関連 lncRNA と T-UCR の候補を抽出できた。

今回は新たに、RNA シークエンスを用い、大腸がんが高メチル化されている RNA を網羅的に解析し、大腸がん特異的メチル化 RNA がセルサイクルシグナルに有意に関連していることを明らかにした (図 1 b)

図 1a 抗メチル化 RNA 抗体によるメチル化 RNA の抽出

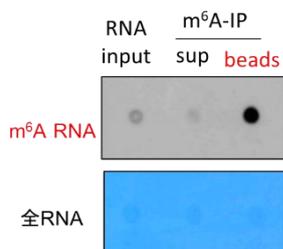
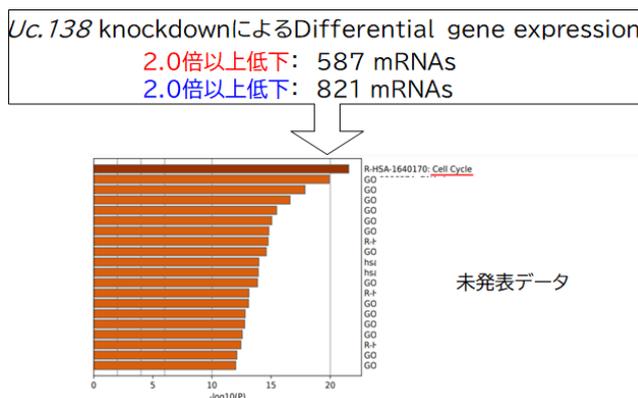


図 1b インプット RNA に比較し有意にメチル化されている RNA のパスウェイ

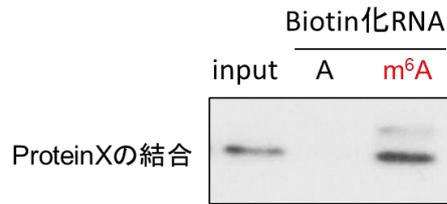


(2) oncogenic RNA uc.138 のメチル化配列の特定と標的として結合するメチル化 RNA 結合タンパク質のスクリーニング (RNA-protein pulldown アッセイ)

先行研究により、HCT116 大腸がん細胞に *TRA2B* 遺伝子から転写される T-UCR uc.138 を導入した安定過剰発現を樹立した (Kuвано et. al., Sci Rep. 2021)。Uc.138 過剰発現細胞では、細胞増殖の亢進及びヌードマウス移植時の腫瘍形成能の獲得が認められた。uc.138 の機能配列としてステムループ部分に変異を加え、ループ構造を特異的に破壊した変異株では、腫瘍形成能が有意に低下したため、T-UCR はステムループ構造を介してマウスの腫瘍形成を促進することを見出した。そこで、ステムループ内に存在するメチル化サイトに着目し、人工的に m⁶A 化したビオチン化 RNA フラグメントを合成し、メチル化付加の有無による結合タンパク質を同定した (図

2)。さらに、大腸がん関連メチル化 RNA 認識タンパク質 X は、uc. 138 の核内局在及び安定化に寄与する可能性が示唆された。

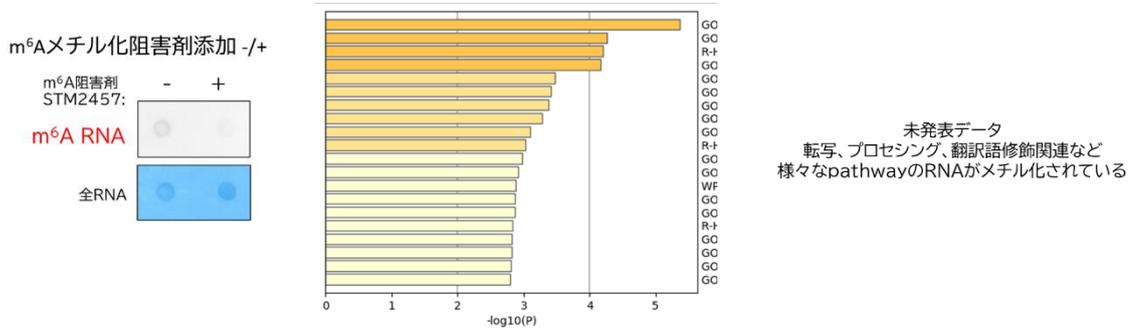
図2 uc. 138 のメチル化 RNA に結合するタンパク質 X



(3) RNA メチル化阻害剤による RNA 発現変化の網羅的解析 (RNA-seq)

RNA メチル化酵素活性をもつ METTL3 を選択的に阻害し、メチル化依存的に発現調節を受ける RNA を次世代シーケンスによる網羅的解析 (RNA-seq) によって同定し、遺伝子がメチル化修飾を受け、GO 解析により RNA メタボリズムに関与する遺伝子群が DNA メチル化の有無により転写後発現調節を受けている可能性が示唆された (図3)。

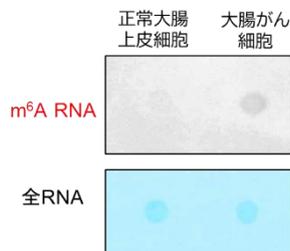
図3 STM2457 による RNA メチル化阻害効果



(4) RNA メチル化酵素 Mett13 の特異的阻害による大腸がんのフェノタイプへの影響

大腸がん細胞及び正常大腸上皮細胞で RNA メチル化ステータスを比較すると、大腸がんにおいて全般の RNA メチル化の更新が認められた (図4)。そこで、RNA メチル化酵素活性をもつ METTL3 を選択的に阻害すると、大腸がん細胞における細胞周期関連因子の発現変動、細胞老化、細胞増殖、浸潤能等の大腸がんフェノタイプが阻害されることを見出した。

図4 細胞抽出 RNA 間のメチル化 RNA 量の比較



以上のことから、RNA メチル化は大腸がんにおいて、T-UCR の発現増加及び核内局在に関与している可能性が示唆された。本研究では、大腸がんで 亢進するメチル化 RNA の同定と、細胞周期依存的な細胞内 RNA 動態を捉えるという目的の一端が期間内に明らかにできたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kubota N, Suzuki S, Kuwano Y, Kakiyama S, Harima-Mizusawa N, Nishida K.	4. 巻 -
2. 論文標題 IDO1 and FOXP3: Possible immune-regulating genes alleviating cedar pollinosis via <i>L. plantarum</i> YIT 0132	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Allergy.	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.16039	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 Shoda Katsutoshi, Kuwano Yuki, Ichikawa Daisuke, Masuda Kiyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 circRNA: A New Biomarker and Therapeutic Target for Esophageal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1643 ~ 1643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10071643	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 Nishikawa Tatsuya, Kuwano Yuki, Nakata Mayu, Rokutan Kazuhito, Nishida Kensei	4. 巻 1864
2. 論文標題 Multiple G-quadruplexes in the LMNA promoter regulate LMNA variant 6 transcription and promote colon cancer cell growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms	6. 最初と最後の頁 194746 ~ 194746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagr.2021.194746	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑野由紀, KEYOUMU NAZERE, 西田憲生, 森野豊之
2. 発表標題 抗老化RNA uc.138 のm6Aメチル化修飾を介した大腸がん悪性化メカニズム
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑野由紀、西田憲生、森野豊之
2. 発表標題 RNA修飾を介した大腸がん細胞の抗老化スイッチの解明.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------