

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14397

研究課題名(和文) 双方向性に転写されるmRNAと長鎖非コードRNAの機能的連関の検証

研究課題名(英文) Functional relationship between mRNA and divergently transcribed lncRNA

研究代表者

丸山 玲緒 (Maruyama, Reo)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・プロジェクトリーダー

研究者番号：60607985

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)：たんぱく質をコードしない長鎖非コードRNA(lncRNA)の重要性の認識に伴い、がんにおいて発現の異常を認めるlncRNAが次々と報告されてきているが、個々のlncRNAの分子機構の解明が進んでいない。本研究ではゲノム上に多数存在する双方向性に転写されるlncRNAとmRNAに焦点を絞り、それらに機能的な関連がありうるかどうか検証を行った。データ解析等からがんにおいてともに発現が亢進しているlncRNAとmRNAのペアを同定し、そのうちの1組に関して機能解析を施行した。両者ともがんの増殖や免疫応答に関わる機能を有していたが、現時点では両者に直接的な機能的関連は認められていない。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNA (lncRNA) has gained much attention due to its importance in every aspect of cellular and molecular processes. Recently, a lot of studies have reported a list of lncRNA genes whose expressions are dysregulated in cancer, however functions of these lncRNAs are largely unknown. In this study, we focused on pairs of mRNA and divergently transcribed lncRNAs in the same genomic region, and investigated whether there is a functional relationship between mRNA and divergently transcribed lncRNA. We first analyzed public and original expression dataset and finally selected one pair of mRNA and lncRNA for further functional analysis. We found that both the mRNA and the lncRNA have a function related to immune response, however at this point, we haven't have a evidence of functional relationship between them.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：長鎖非コードRNA

## 1. 研究開始当初の背景

長鎖非コード RNA (lncRNA) の重要性の認識、アノテーション情報の普及、そして次世代シーケンサーによる解析の一般化により、癌において発現の異常を認める lncRNA のリストは増加の一途をたどっている。しかし個々の lncRNA の分子機構の解明が全く追いついておらず、今後はそれらの解明が急務である。現在機能が明らかとなっている lncRNA としては、大きく核内で作用するものと細胞質内で作用するものの2種類に分類できる。また核内で作用するものとしては XIST のように lncRNA が転写されるそのゲノム領域で作用するもの、すなわち cis に作用するものと、転写される領域とは別の領域で trans に作用するものの2種類に大別できる。ヒトゲノム上にはプロモーター領域を共有し lncRNA と mRNA が互いに逆方向に転写される領域が多数存在している。その場合、lncRNA が反対側の mRNA の発現を制御する、つまり cis に作用する報告が複数認められている。本研究ではその概念とは異なる仮説を提唱しそれを検証したい。「双方向性に転写される lncRNA と mRNA が、cis にではなく trans に作用し合うことはないか」という仮説である。lncRNA が反対方向の mRNA から翻訳される protein の機能に関与する可能性もある。つまりプロモーターを共有し同じ制御を受けている両者が、より高次のレベルで互いに機能を相互補完する可能性もあるのではないかと考え、これを検証することとした。本研究では特にゲノム上に多数存在する双方向性に転写される lncRNA と mRNA に焦点を絞り、それらに機能的な関連がありうるかどうかという点から解析を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では双方向性に転写される mRNA と lncRNA のペアに着目し、lncRNA が反対方向の mRNA から翻訳される protein の機能に関与する例はあるか、あるとすればそれはどのような分子機構によるものかを明らかにすることを目的とする。もしこのような例が存在するならば、lncRNA の役割に対する新しい視点を提供することになり、基礎・臨床医学に大きな影響を与えうるものである。

## 3. 研究の方法

初めに TCGA 等で利用可能な RNA-seq データを取得・解析し、癌で特異的に高発現している lncRNA と mRNA のペア(プロモーターを共有し双方向性に転写されるペア)を同定する。次に siRNA を用いた発現抑制の実験を行い、lncRNA と mRNA が cis に作用しあうかどうかを検証する。さらに両者の発現抑制が細

胞機能にどのような影響を与えるかの機能的スクリーニングを施行し、lncRNA を抑制した場合と mRNA を抑制した場合で同じような影響を示した場合は、両者に機能的な関連がある可能性があると考え、さらなる機能解析を行う。機能解析の最終段階としては、各 protein 固有の機能をモニターできるようなアッセイを行い、lncRNA の発現抑制が隣接する protein の機能を抑制しうるかどうかの検証を行う。

## 4. 研究成果

まず自検例ならびに公共データベースを用いてデータ解析を行い、がんにおいて発現がともに上昇している双方向性の mRNA と lncRNA のペアのリストを作成した。次に種々のがん細胞株におけるそれらの発現を quantitative RT-PCR により確認し、実際に複数のがん細胞株で発現の上昇を認める mRNA と lncRNA のペア 4 組同定し、さらなる解析の対象とした。種々のがん細胞株においてこれらの発現を siRNA を用いてノックダウンしたところ、mRNA 単独あるいは lncRNA 単独のノックダウンでどちらも細胞増殖を抑制するペアを 2 組同定した。そのうちの 1 組は、それぞれの単独のノックダウンで細胞増殖以外の表現型にも同様の変化が認められ、機能的に関連している可能性が考えられたため、その 1 組をさらなる機能的な解析の対象とした。

この mRNA がコードする protein は膜タンパク質であり、これまでの研究からすでにがんや免疫応答との関連が示唆されている。はじめに lncRNA が cis に作用し mRNA や protein の発現に影響を与えうるかどうかに関して、lncRNA のノックダウンや過剰発現の系を用いて確認した。qRT-PCR やウェスタンブロットによる確認を行ったが、いずれの場合においても mRNA や protein の発現への影響は認めなかった。同様に mRNA 側のノックダウンや過剰発現の系による確認も行ったが、lncRNA の発現には影響を与えなかった。次に lncRNA が膜タンパクの局在に影響を与えうるか、フローサイトメトリーや細胞蛍光免疫染色にて確認を行ったが、こちらも影響は認めなかった。以上の結果より lncRNA の発現の増減は少なくともそのペアとなる mRNA や膜タンパクの発現には影響を与えないと考えられた。

この lncRNA は単独で機能を有している可能性が考えられたため、その機能を解明すべく、まず lncRNA と相互作用するたんぱく質の同定を試みた。RNA pull-down 実験と質量分析を複数回施行し、最終的に 3 種類のたんぱく質(ProteinX, Y, Z)を lncRNA と結合しているたんぱく質として同定した。

さらに lncRNA の機能を類推すべく、lncRNA のノックダウンあるいは過剰発現が

細胞の遺伝子発現全体に与える影響を、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、この lncRNA が免疫応答遺伝子群の発現を誘導することが明らかとなった。さらにその発現誘導は lncRNA と結合している ProteinX のノックダウンにより減弱したことから、lncRNA と ProteinX の複合体が免疫応答に関与していると思われた。

反対側に発現する mRNA がコードする膜たんぱく質も前述の通り免疫応答に関与する遺伝子である。lncRNA がより高次のレベルで、すなわち膜タンパクの機能に直接影響を与える可能性はないか、免疫応答や下流シグナルの活性化に与える影響を検証しているが、今のところはっきりとした関連を示す結果は出ていない。今後さらなる検証を行っていく予定であるが、現時点ではこの双方向性に発現する lncRNA と mRNA (ならびに翻訳される膜タンパク質) はどちらも免疫応答に関与しているが、両者には直接的な機能的関連はなく、独立した機能や生理学的意義を有しているものと考えている。

#### 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 20 件)

- 1) Kumegawa K, Maruyama R\*, Yamamoto E, Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Yamano HO, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Suzuki H\*. A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Sci Rep.* 2016;6:26699 \*co-corresponding author. 査読有
- 2) 丸山玲緒. 長鎖非コード RNA と癌 医学のあゆみ 2016; 257: 16323-7. 査読無
- 3) Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Niinuma T, Kai M. Relationship Between Noncoding RNA Dysregulation and Epigenetic Mechanisms in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;927:109-35. 査読有
- 4) Kurihara H, Maruyama R, Ishiguro K, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Mitsuhashi K, Igarashi H, Ito M, Tanuma T, Sukawa Y, Okita K, Hasegawa T, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y, Noshio K. The relationship between EZH2 expression and microRNA-31 in colorectal cancer and the role in evolution of the serrated pathway. *Oncotarget.* 2016;7:12704-17. 査読有
- 5) Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima

M, Harada T, Maruyama R, Ashida M, Aoki H, Matsushita HO, Yoshikawa K, Harada E, Tanaka Y, Wakita S, Niinuma T, Kai M, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H. Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations. *Oncotarget.* 2016;7:35106-18 査読有

- 6) Mitsuhashi K, Yamamoto I, Kurihara H, Kanno S, Ito M, Igarashi H, Ishigami K, Sukawa Y, Tachibana M, Takahashi H, Tokino T, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Yamamoto H, Noshio K. Analysis of the molecular features of rectal carcinoid tumors to identify new biomarkers that predict biological malignancy. *Oncotarget.* 2015;6:22114-25 査読有
- 7) Huh SJ, Clement K, Jee D, Merlini A, Choudhury S, Maruyama R, Yoo R, Chytil A, Boyle P, Ran FA, Moses HL, Barcellos-Hoff MH, Jackson-Grusby L, Meissner A, Polyak K. Age- and pregnancy-associated DNA methylation changes in mammary epithelial cells. *Stem Cell Reports.* 2015;4:297-311 査読有
- 8) Su Y, Subedee A, Bloushtain-Qimron N, Savova V, Krzystanek M, Li L, Marusyk A, Tabassum DP, Zak A, Fackler MJ, Li M, Lin JJ, Sukumar S, Suzuki H, Long H, Szallasi Z, Gimelbrant A, Maruyama R\*, Polyak K\*. Somatic cell fusions reveal extensive heterogeneity in basal-like breast cancer. *Cell Reports.* 2015;11:1549-63 \*co-corresponding author 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 丸山玲緒、北嶋洋志、山本英一郎、新沼猛、桑川昂平、萬頭、津矢田明泰、鈴木亮、甲斐正広、篠村恭久、鈴木拓。慢性胃炎から胃癌への発癌過程に関与する長鎖 ncRNA の網羅的探索と機能解析の試み。第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター 一橋講堂、(東京都・千代田区)
- 2) Reo Maruyama, Hiroshi Kitajima, Yuri Sato, Eiichiro Yamamoto, Takeshi Niinuma, Kohei Kumegawa, Masahiro Kai, Yasuhisa Shinomura, Hiromu Suzuki. Identification and functional analysis of a novel long non-coding RNA involved in gastric tumorigenesis. 第 17 回 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15 日、ホテルライフオー ト札幌 (北海道・札幌市)

- 3) 丸山玲緒、原田拓、糸川昂平、山本英一郎、山野泰徳、新沼猛、野島正寛、篠村恭久、今井浩三、鈴木拓。大腸がんにおける non-coding RNA 遺伝子のエピゲノム解析と臨床への応用。第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会、2015 年 10 月 7 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
- 4) Sato Yuri, Maruyama Reo, Kitajima Hiroshi, Yamamoto Eiichiro, Niinuma Takeshi, Yoroazu Akira, Kumegawa Kohei, Kai Masahiro, Tokino Takashi, Shinomura Yasuhisa, Suzuki Hiromu. Identification and functional analysis of long non-coding RNAs involved in gastric tumorigenesis. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
- 5) Maruyama Reo, Yamamoto Eiichiro, Suzuki Hiromu. Epigenomic changes and long non-coding RNAs in gastric tumorigenesis. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
- 6) Maruyama Reo, Kitajima Hiroshi, Yamamoto Eiichiro, Sato Yuri, Kumegawa Kohei, Niinuma Takeshi, Kai Masahiro, Shinomura Yasuhisa, Tokino Takashi, Suzuki Hiromu. Systematic identification and functional analysis of long non-coding RNAs involved in gastric tumorigenesis. 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
- 7) 丸山玲緒。慢性胃炎から胃癌への発癌過程に関与しうる長鎖非コード RNA の網羅的探索と病的意義の解明。がん支援活動公開シンポジウム 2016 年 2 月 8 日 学術総合センター 一橋講堂(東京都・千代田区)

[図書] (計 1 件)

Maruyama R. Identification of Long Non-Coding RNAs Involved in Chronic Inflammation in Helicobacter Pylori Infection and Associated Gastric Carcinogenesis. Chronic Inflammation (Springer) 2016; 627-638.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

丸山 玲緒 (MARUYAMA, Reo)  
公益財団法人がん研究会・がん研究所・がんエピゲノムプロジェクト・プロジェクトリーダー  
研究者番号：60607985

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし