

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15475

研究課題名(和文)長鎖ノンコーディングRNAエピジェネティック制御機構の解明とその癌治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of epigenetic modification mechanisms of long non-coding RNAs

研究代表者

工藤 敏啓 (Kudo, Toshihiro)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：20593859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：RNA分子に起こる化学修飾は、その機能を大きく変化させる可能性がある。この研究では、長鎖ノンコーディングRNAにおこるメチル化を始めとした化学修飾が、その機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。研究手法としては、まず、低酸素刺激などがん特異的な微小環境において発現変化の見られる長鎖ノンコーディングRNAの網羅的プロファイリングを行い、がん進展に關与する可能性のある分子を探索、あらかじめ治療標的候補を複数同定することに成功した。さらに癌細胞株においてメチル化アデニン抗体によるRNA免疫沈降を行うことで、長鎖ノンコーディングRNA上の部位特異的なm6A修飾を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chemical modifications on long non-coding RNA (lncRNA) molecules potentially alter their biological functions. In this study, we have demonstrated functional alterations of lncRNAs upon induction of chemical modifications, such as methylations and acetylations. We have started with a comprehensive profiling of hypoxia-induced long lncRNAs, which could be good candidates for key oncogenic molecules in cancer microenvironment. By using PCR-based microarray method, we identified several candidate lncRNAs. In vitro functional assays revealed these lncRNAs could play an important role in cancer progression. Knockdown of RNA methylation enzyme reduced methylation levels of lncRNA transcripts and lead to functional alterations including growth inhibition, resistance to chemotherapeutic agents. These findings suggest that chemical modifications on lncRNAs is crucially involved in cancer progression and that the methylation enzyme could be a crucial therapeutic target.

研究分野：消化器癌化学療法

キーワード：癌 核酸 臨床

「長鎖ノンコーディング RNA エピジェネティック制御機構の解明とその癌治療への応用」

### 1. 研究開始当初の背景

近年の RNA 脱メチル化機構に関する研究成果により、RNA は DNA やヒストン同様そのメチル化状態をダイナミックに変換させ、これが遺伝子発現の重要な調節因子として機能していることが知られるようになった。さらに RNA メチル化は ES 細胞における幹細胞性の維持や、分化細胞における mRNA の核外輸送、選択的スプライシングなど多くの重要な細胞機能に関わる事が次々と明らかになっていく (X. Wang et al., Nature 2014 など)。一方で長鎖ノンコーディング RNA (以下 lncRNA) のメチル化に関してはいまだその生物学的意義が系統的に理解されていない。また、lncRNA はがんにおいて重要な治療標的と考えられているが、その機能発現に関しては不明な点が多い。lncRNA が機能的な分子として作動するためには、塩基配列はもとより、その 3 次元構造やタンパク結合性を規定する化学修飾が適切に制御されている必要があることがわかってきた。つまり、lncRNA 分子に起こるダイナミックな RNA メチル化が lncRNA の機能発現に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。これらの知見から、この研究では、lncRNA におこる化学修飾に着目し、そのメカニズムの解明と、疾患への関わりを調べることにした。

### 2. 研究の目的

この研究では、lncRNA におこるメチル化を始めとした化学修飾が、細胞機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。特にがんを始めとする疾患との関わりにおいて、lncRNA のメチル化に関わる RNA メチル化酵素が、細胞の悪性形質獲得にどのように関わるかを系統的に明らかにすることを目指した。各種メチル化 RNA に対する抗体を用いた、メチル化 RNA 免疫沈降シーケンス (MeRIP-seq) を行うことで、lncRNA 上のメチル化の正確な位置と種類を把握、網羅的なメチル化 lncRNA プロファイリングを行い、lncRNA におけるメチル化の意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

がん進展に関わる可能性が高い lncRNA を同定するため、低酸素刺激などがん特異的な微小環境において発現変化の見られる lncRNA の網羅的プロファイリングを行い、がん進展に関与する可能性のある分子を探索、あらかじめ治療標的候補を複数同定することに成功した。また、消化器がん細胞株を用いてメチル化アデニン (m6A) 抗体による RNA 免疫沈降シーケンスを行うことで、転写産物上の部位特異的な m6A 修飾を網羅的に検出、lncRNA におこる m6A 修飾の特色を調べた。また、lncRNA メチル化に関わるメチル化酵素の

機能解析を行い、一連の反応が、がん進展に与える影響に関して検討した。

### 4. 研究成果

lncRNA のエピゲノムを調べる前段階として、がん進展に関わる lncRNA を同定するために、がん微小環境において重要と考えられる低酸素環境に着目、実験系としては、低酸素環境 (O<sub>2</sub> 1%) で培養したがん細胞株において定常酸素下で培養した場合に比べ、高発現する lncRNA を PCR-based microarray の手法を用いて網羅的に検出した。その結果、一部の lncRNA において、低酸素下で、大きな発現変化のあることが明らかとなった (図 1)。

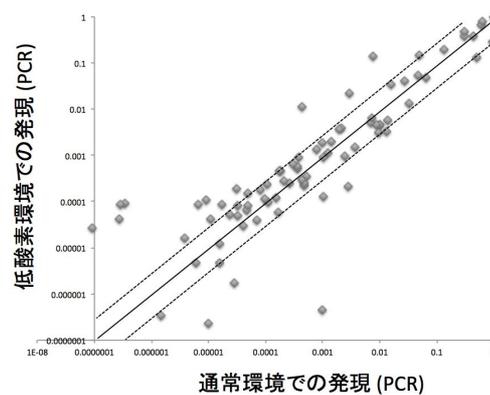


図1 常酸素環境と低酸素環境下における lncRNA の発現

次に注目する lncRNA に関して、培養細胞株から抽出した RNA を用いて、m6A 抗体による免疫沈降を行い、これを次世代シーケンサーで解析 (メチル化 RNA 免疫沈降シーケンス: meRIP-seq) することで、注目する lncRNA 上のメチル化の分布を調べ、これを既存のデータベースなどとも比較を行なうことで、転写産物上のどの位置にメチル化が分布しているのかを確認することができた (図 2)。

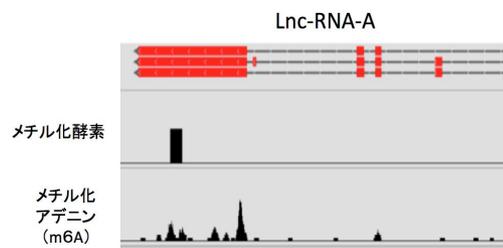


図2 lncRNA 上のメチル化酵素結合と、メチル化アデニンの分布

これまでの報告から、タンパクコーディング遺伝子における m6A の分布は、翻訳領域 (CDS) と、3' 側非翻訳領域 (3' UTR) の境界付近で頻度が高いことが知られていたが (Dominissini et al., Nature 2012 他)、今回の解析で、タンパクに翻訳されない lncRNA

に関しては、この領域でのピーク頻度上昇は確認されなかった(図3: Metagene plot)。このことは、転写産物上のメチル化アデニン修飾が、タンパクへの翻訳と何らかの関わりがある可能性を示唆するとともに、lncRNA上に豊富に存在するメチル化アデニン修飾は、他の生物学的意義を有していることを意味すると考えられた。また、一部の lncRNA は、複数のタンパク分子をつなぎとめる scaffold の働きをしていることがわかってはいるが、われわれが着目する lncRNA に関しても、メチル化が認められる箇所が、相互作用するタンパクの結合部位に近いことを確認している。さらに、これらの解析に並行して、lncRNA メチル化機構の、がん進展への関わりを明らかにするため、lncRNA メチル化に関わる RNA メチル化酵素の機能解析を行ってきた。注目するメチル化酵素に対して、レンチウイルスによる強制発現・ノックダウンした細胞株を樹立し、これらの細胞の造腫瘍性の変化、ならびに抗がん剤に対する薬剤耐性の変化を明らかにした。これらの所見は、メチル化 RNA が、がん進行度判定のためのバイオマーカーとして有用である可能性を示すのみならず、一連の反応に関わる RNA メチル化酵素群が、がん抑制や治療抵抗性改善のための重要な治療標的となりうることを示唆している。さらに、データベースの解析から、注目する RNA メチル化酵素は、正常組織に比べがん組織で高発現し、がん進展に関わる重要なパスウェイを制御している可能性が示唆された。これらの所見から、この RNA メチル化酵素は、正常細胞のホメオスタシス維持に加え、がん病態下でがん進展に重要な役割を果たす可能性が示された。

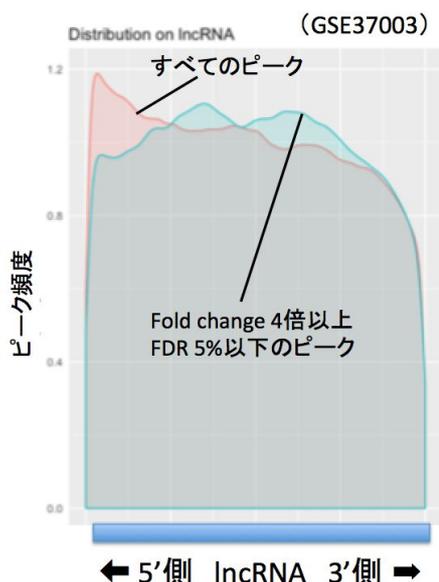


図3 lncRNA上のm6Aの分布

## 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3件)

- 1) Hata, T., Kudo, T., Sakai, D., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Mizushima, T., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Satoh, T. Impact of capecitabine and S-1 on anticoagulant activity of warfarin in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 78(2):389-396, 2016.
- 2) Sueda, T., Sakai, D., Kudo, T., Sugiura, T., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Hayashi, T., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Satoh, T. Efficacy and Safety of Regorafenib or TAS-102 in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Refractory to Standard Therapies. *Anticancer Res.*, 36(8):4299-4306, 2016.
- 3) Nishimura, J., Satoh, T., Fukunaga, M., Takemoto, H., Nakata, K., Ide, Y., Fukuzaki, T., Kudo, T., Miyake, Y., Yasui, M., Morita, S., Sakai, D., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Ohno, Y., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Nezu, R., Doki, Y., Mori, M. Combination antiemetic therapy with aprepitant/fosaprepitant in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin-based chemotherapy (SENRI trial): a multicentre, randomised, controlled phase 3 trial. *Eur. J. Cancer*, 51(10):1274-1282, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

工藤 敏啓 (Kudo, Toshihiro)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号：20593859

### (2) 研究分担者

西田 尚弘 (Nishida, Naohiro)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50588118

今野 雅允 (Konno, Masamitsu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号：80618207

川本 弘一 (Kawamoto, Koichi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：30432470

小関 準 (Koseki, Jun)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)  
研究者番号：20616669

(3)連携研究者

石井 秀始 (Ishii, Hideshi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授(常勤)  
研究者番号：10280736

森 正樹 (Mori, Masaki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70190999