

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07113

研究課題名(和文) エピトランスクリプトーム解析による新規がん治療標的の探索

研究課題名(英文) Epitranscriptome analysis of cancer cells

研究代表者

蝉 克憲 (Semi, Katsunori)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：90633058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化修飾は、遺伝子発現制御機構として知られるエピジェネティクス機構の1つであるが、RNAも同様にメチル化を受けることが知られている。本研究課題ではRNAメチル化関連遺伝子に着目し、ノックダウンを誘導した結果、腫瘍形成能が抑制されることが明らかとなった。現在、網羅的発現解析によりスプライシングパターンの変化する遺伝子群の探索と、腫瘍形成能に関わる遺伝子群の探索を行うと共に、発がん過程に見られる代謝経路の変化に関わる遺伝子群の同定を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、スプライシングを標的とした抗がん剤に注目が集まっている。抗がん活性を持つスプライソタチンAやブラジエノライドBが、スプライソソームの構成因子を抑制していることが明らかになるなど、がんの生存において、スプライシングが重要な役割を占めていることが明らかになりつつある。がん細胞特異的なスプライシング変化とその誘導メカニズムを明らかにすることは、新規の抗がん剤治療標的の探索にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is one of the epigenetic modifications known as the regulator of gene expression, but RNA is also known to be methylated. In this study, we focused on RNA methylation related genes and found that the knockdown of RNA methylation related genes suppressed the ability of tumor formation in vivo. Currently, we are searching for genes with altered splicing patterns and genes related to tumorigenicity by RNA-seq analysis, as well as identifying genes related to metabolic pathway observed in oncogenic processes.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：がん エピトランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子変異の蓄積によって発症する疾患であるが、近年の研究から、遺伝子変異の解析だけでなく、エピゲノム異常の解析が極めて重要であることが明らかになりつつある。しかしながら、mRNA は転写後修飾を介したプロセッシング過程において、その配列が変化することが知られている。既報では mRNA のスプライシングを介した発がんや薬剤耐性機構が示されている。これらの点は、複雑な生命現象を解析するためにはエピゲノム解析だけでは不十分であることを示している。特に、mRNA のプロセッシング機構の1つであるスプライシングは、同一の転写産物から様々なスプライシングバリエーションを産生することで、異なる機能を有するタンパク質を産生することが可能である。これまで、このスプライシングパターンがどのように制御されているか、その詳細なメカニズムは明らかにされていなかった。近年、mRNA のメチル化修飾がスプライシングパターンの形成に影響を与えることが示された。RNA メチル化(N6 メチルアデニン)は、1974 年に肝がん細胞において初めて報告された RNA 化学修飾の1つである。近年の報告から、RNA メチル化は mRNA に対する RNA 結合たんぱく質の結合能を変化させることが報告されている。さらに、RNA メチル化酵素 METTL3 のノックダウン実験により、30%程度の RNA メチル化レベルの低下でも、体細胞リプログラミングの抑制や未分化性の破綻など、細胞の機能に様々な影響を与えることが知られている。がん細胞においても同様で、ヒト肝がん細胞における METTL3 のノックダウンは、p53 の活性化によるアポトーシスを誘導することが知られている。これは、p53 の不活性化に働く MDM4 のスプライシングパターンを変化させ、p53 結合ドメインを欠失した MDM4 を産生することが原因であり、スプライシングパターンのコントロールががん治療に応用できる可能性を示していると考えられる。

2. 研究の目的

がんにおける RNA メチル化の役割を探索するとともに、スプライシングとの関連性について検討することで、がんに特徴的なスプライシングパターンを構築するメカニズムを明らかにする。さらに、RNA メチル化解析から、がん治療に向けた新規標的遺伝子の同定を試みる。また、ヒトプライム型、及びナイーブ型多能性幹細胞を用いて、発がん過程に見られる代謝様式の変化に関わる遺伝子群の同定とスプライシングパターンの変化を観察する。

3. 研究の方法

幾つかのがん細胞株(肺がん、乳がん、腎がん、血液腫瘍)に対して、RNA メチル化酵素の機能阻害を誘導するために、RNA メチル化酵素複合体に関連する因子群に対するノックダウンを行なった。また、ノックダウンの影響を観察するために、*in vitro*における細胞増殖試験、また *in vivo*における腫瘍形成能の検討を行った。また、幾つかのがん細胞種についてはマイクロアレイ解析、及び RNA-seq による網羅的発現解析を行い、発現変動遺伝子やスプライシングパターンの同定を行っている。スプライシングパターンの同定には過去に報告されているツール(rMATS: <http://rnaseq-mats.sourceforge.net/>, leafcutter: <https://github.com/davidaknowles/leafcutter>)を使用し、比較検討を行った。さらに、がん細胞の代謝経路が変化するメカニズムを解析するために、ヒトプライム型多能性幹細胞、及びヒトナイーブ型多能性幹細胞を用い、RNA-seq による網羅的発現解析を行った。ヒトナイーブ型多能性幹細胞の誘導は、Guo et al., *Development* 2017 に記載されている方法に従った。

4. 研究成果

RNA メチル化関連遺伝子のノックダウンを誘導するために、shRNA ベクターを構築した。その結果、高効率に目的の遺伝子をノックダウン可能なベクターの開発に成功した(図1)。

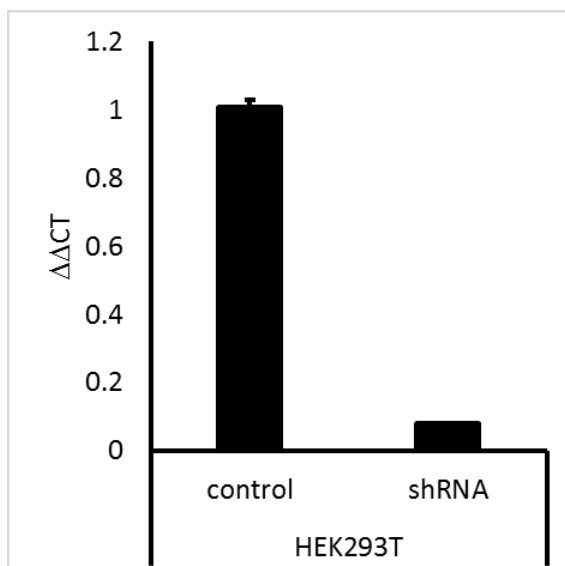


図 1. shRNA を用いた標的遺伝子のノックダウン効率の検討

このノックダウンベクターを用いて、複数種類のがん細胞株でノックダウンを誘導し、RNA メチル化阻害を誘導した結果、既報とは異なり *in vitro* における細胞増殖に影響が認められなかった。しかし、ノックダウンを誘導したがん細胞株を用いた *in vivo* での腫瘍形成能の確認により、ノックダウン細胞株は腫瘍形成能が著しく抑制されていることが明らかとなった(図2)。

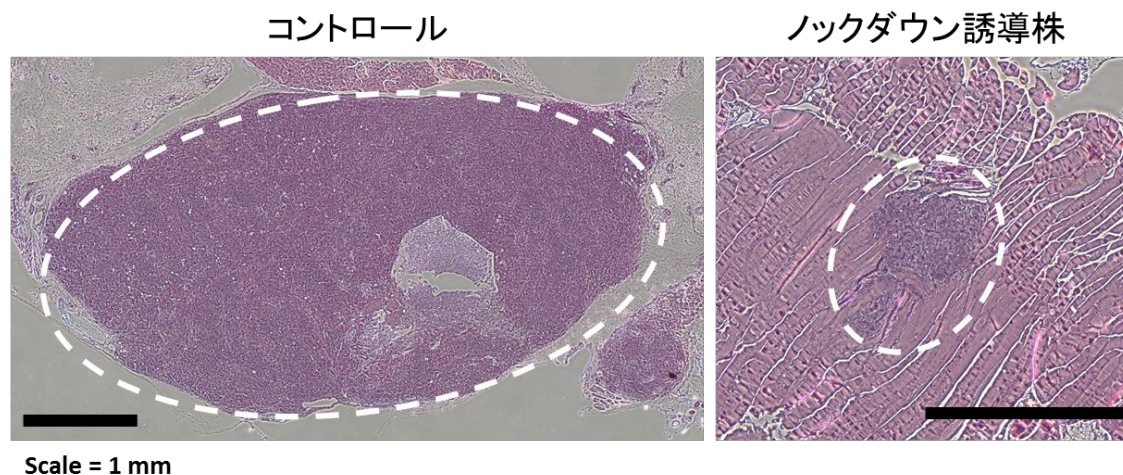


図2. ノックダウン誘導がん細胞株を用いた腫瘍形成能実験
破線部は腫瘍を示す。

この腫瘍形成能の変化がどのようにして誘導されているかを検討するために、マイクロアレイ、及び RNA-seq を行い発現解析により標的遺伝子の絞込みを行っている。RNA-seq の結果から、RNA 結合たんぱく質、及びがん関連遺伝などに着目し、スプライシングパターンの変化の同定を行っている。残念ながら、前所属研究室が移転したため所属を変える必要に迫られた、そのため、今回得られた結果を論文としてまとめることができなかったが、既に腫瘍形成能に大きな影響を与えることが明らかになっていることから、将来的に機会が得られた際に論文をまとめ投稿する予定である。さらに、がん細胞の代謝に影響を与える因子を同定するために、がん細胞と同様の代謝様式を示すヒトプライム型多能性幹細胞、さらにプライム型多能性幹細胞から誘導された着床前胚と類似した性質を有するヒトナイーブ型多能性幹細胞の RNA-seq を行い、発現解析を行っている。興味深いことに、ナイーブ型多能性幹細胞は、正常体細胞と同じくクエン酸回路を介した代謝経路により ATP 産生を優位に行っていることが知られている(図3)。

プライム型多能性幹細胞

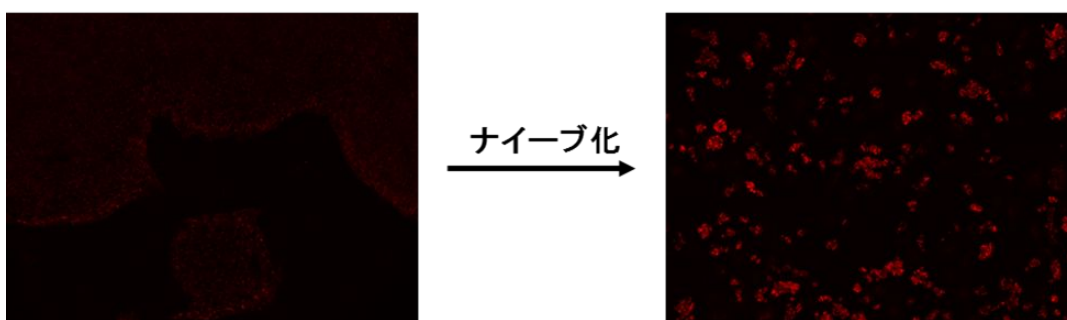


図3. TMRM 染色によるミトコンドリア膜電位の検討

よって、ヒト繊維芽細胞から樹立されたヒトプライム型 iPS 細胞、さらにプライム型 iPS 細胞から誘導されたヒトナイーブ型 iPS 細胞の発現比較を行うことで、代謝関連遺伝子の発現変化を詳細に観察することが可能となる。既にナイーブ型多能性幹細胞、プライム型多能性幹細胞の RNA-seq を行っており、ミトコンドリア関連遺伝子に着目し、現在解析を進めている。また、マウスでは体細胞から iPS 細胞へのリプログラミング時にスプライシングパターンの変化が重要であることが明らかとなっている。これを踏まえ、ナイーブ型多能性幹細胞へのリセットによるスプライシングパターンの変化を同時に解析している。さらに、ヒトと同じ霊長類であるマーモセットの多能性幹細胞を用いて、ナイーブ化の解析を進め、ヒト多能性幹細胞との比較を行っている。

参考文献

Desrosiers et al., *PNAS* 1974
Wei et al., *Cell* 1975
Chen et al., *Cell Stem Cell* 2015
Han et al., *Nature* 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yagi M, Kishigami S, Tanaka A, Semi K, Mizutani E, Wakayama S, Wakayama T, Yamamoto T, Yamada Y. Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature*. 2017 Aug 10;548(7666):224-227. (査読有り)

Takada S, Kambe N, Kawasaki Y, Niwa A, Honda-Ozaki F, Kobayashi K, Osawa M, Nagahashi A, Semi K, Hotta A, Asaka I, Yamada Y, Nishikomori R, Heike T, Matsue H, Nakahata T, Saito MK. Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN- γ -dependent inflammatory response in macrophages. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jan;141(1):339-349. (査読有り)

Arioka Y, Ito H, Hirata A, Semi K, Yamada Y, Seishima M. Behavior of leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5-expressing cells in the reprogramming process. *Stem Cell Res*. 2017 Apr;20:1-9. (査読有り)

Hashimoto K, Yamada Y, Semi K, Yagi M, Tanaka A, Itakura F, Aoki H, Kunisada T, Woltjen K, Haga H, Sakai Y, Yamamoto T, Yamada Y. Cellular context-dependent consequences of Apc mutations on gene regulation and cellular behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 24;114(4):758-763. (査読有り)

Komura S, Semi K, Itakura F, Shibata H, Ohno T, Hotta A, Woltjen K, Yamamoto T, Akiyama H, Yamada Y. An EWS-FLI1-Induced Osteosarcoma Model Unveiled a Crucial Role of Impaired Osteogenic Differentiation on Osteosarcoma Development. *Stem Cell Reports*. 2016 Apr 12;6(4):592-606. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

Katsunori Semi, Akiko Shimada, Yasuhiro Takashima, Analysis of the induction mechanisms for KLF4 expression in marmoset PSCs. マーモセット研究会, 2019/2/6-7, 東京、ポスター発表

Katsunori Semi, Oncogene Expression Stabilizes Cancer Cell Identity, Revealed by Cancer Cell Reprogramming. ISSCR Annual Meeting 2017, 2017/6/13-17, ボストン、アメリカ、ポスター発表

Katsunori Semi, Oncogene Expression Stabilizes Cancer Cell Identity, Revealed by Cancer Cell Reprogramming. 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会, 2017/2/6-7, 滋賀、ポスター発表

Katsunori Semi, Oncogene Expression Stabilizes Cancer Cell Identity, Revealed by Cancer Cell Reprogramming. The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016, 2016/6/24-25, 札幌、ポスター発表

Katsunori Semi, Ablation of critical driver oncogenic signals induces epigenetic plasticity and genetic diversity of cancer cell. The 31st NAITO CONFERENCE, 2016/6/5-8, 札幌、口頭発表

〔図書〕(計 2 件)

蝉 克憲、島田 亜樹子、高島 康弘, ES/iPS細胞, マーモセットラボマニュアル, 2018年10月

高島 康弘、上田 舞、蝉 克憲, ヒトナীব型 ES/iPS細胞の性質と展開、細胞 50(7) 2018年6月

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。