

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09285

研究課題名(和文) 癌関連転写因子の標的非コードRNA解析による消化器癌病態の解明

研究課題名(英文) The analysis of non-coding RNA induced by cancer-associated transcriptional factors in gastrointestinal cancers

研究代表者

井戸川 雅史 (Idogawa, Masashi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00404749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、蛋白に翻訳されないRNAである長鎖非コードRNA(lncRNA)の役割が注目されており、消化器癌関連転写因子の標的となるlncRNAの網羅的な同定を試みた。癌抑制遺伝子p53のゲノムDNA上の結合部位の探索により新規標的遺伝子としてlncRNA NEAT1を同定した。NEAT1はp53により発現誘導され腫瘍抑制を補助し、遺伝子発現ネットワークの変化を引き起こした。またNEAT1の低発現はp53正常の癌でのみ予後不良因子であった。近年の癌の網羅的な変異解析ではNEAT1の変異が高頻度に報告されており、今後、癌の診断や治療への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は死因の第一位であり新たな診断治療法の開発が急務である。これまでの研究は蛋白を中心に行われてきたが、近年、蛋白にならない非コードRNAが重要な役割を果たしていることが分かってきた。本研究では癌で最も高頻度に変異している癌抑制遺伝子p53の標的となる非コードRNAを新たに見出した。これによりp53による発癌の抑制機構の一端が明らかになると共に、新たな癌の診断治療への端緒となる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：p53 is one of the most important tumor suppressor genes and the direct transcriptional targets of p53 must be explored to elucidate its functional mechanisms. Thus far, the p53 targets that have been primarily studied are protein-coding genes. In this study, analysis of next-generation chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) data for p53 revealed that the lncRNA NEAT1 is a direct transcriptional target of p53. The suppression of NEAT1 induction by p53 attenuates the inhibitory effect of p53 on cancer cell growth and also modulates gene transactivation, including that of many lncRNAs. Furthermore, low expression of NEAT1 is related to poor prognosis in several cancers. These results indicate that the induction of NEAT1 expression contributes to the tumor-suppressor function of p53 and suggest that p53 and NEAT1 constitute a transcriptional network contributing to various biological functions and tumor suppression.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌 非コードRNA p53 NEAT1 lncRNA non-coding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な転写因子が、癌をはじめとして、炎症、代謝、免疫など種々の疾患における病態形成に重要な働きをしていることが良く知られている。転写因子は、ゲノム DNA 上の各転写因子固有の応答配列に結合し、その下流に存在する標的遺伝子の転写を制御することで機能する。このことから、疾患における転写因子の機能、役割を明らかにする上で、その標的遺伝子の同定と機能解析が必須である。これまで mRNA として転写され蛋白に翻訳される遺伝子のみが、標的遺伝子として重要であると考えられてきた。しかし近年、蛋白に翻訳されない非コード RNA (non-coding RNA, ncRNA) の役割が注目されつつある。中でも、長さが 20 塩基前後と短いマイクロ RNA (miRNA) が、その標的 mRNA の翻訳を阻害することが明らかとなり、様々な疾患で解析が進められている。更に、non-coding RNA の一つである長鎖非コード RNA (long non-coding RNA, lncRNA) が、発生、分化、幹細胞性などの様々な生物学的現象や、癌をはじめとして、心筋梗塞などの冠動脈疾患、アルツハイマー病、自己免疫性疾患などにおいて重要な働きを持つことが明らかになりつつある。また、エキソソームと呼ばれる小胞により非コード RNA が血中に放出されていることも明らかとなっている。

2. 研究の目的

そこで、消化器癌関連転写因子の標的となる non-coding RNA、特に lncRNA を網羅的に同定したい。次に、同定された標的 lncRNA に結合する蛋白や RNA、ゲノム DNA 領域を同定し、その機能を明らかにすることで未知の消化器癌病態の解明を目指したい。また、同定された lncRNA が消化器癌の診断マーカーとなることが想定され、非コード RNA ネットワークの臨床応用へ向けての基盤構築を行いたい。

3. 研究の方法

(1) ChIP-seq による癌関連転写因子のゲノム結合部位の同定

消化器癌細胞を用いて癌抑制遺伝子 p53 および、その変異体についてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行う。

次世代シーケンサーを用いて、免疫沈降された DNA を網羅的にシーケンスし (ChIP-seq)、得られた塩基配列をヒトゲノム配列と比較照合して、マッチする位置にマッピングする。

結合領域には多数の配列がマッピングされピークを形成する。このピークを、専用アルゴリズム (MACS など) を用いて検出することで、転写因子のゲノム上の結合領域を網羅的に決定する。

(2) 転写因子による lncRNA の発現応答性の確認

データベースに登録されている lncRNA のゲノム上の位置情報を用いて、近傍 (上流もしくは下流 10000 塩基以内) に A で同定された転写因子結合領域が含まれる lncRNA を抽出する。

抽出された lncRNA に対して PCR プライマーを設計し、転写因子の活性化前後の発現量の変化をリアルタイム PCR で定量する。また、次世代シーケンサーによる RNA 解析 (RNA-seq) を用いて、網羅的な発現解析も並行して行う。

発現が有意に変化した lncRNA を標的遺伝子として選択する。

(3) 転写因子標的 lncRNA の結合分子の同定と機能解析

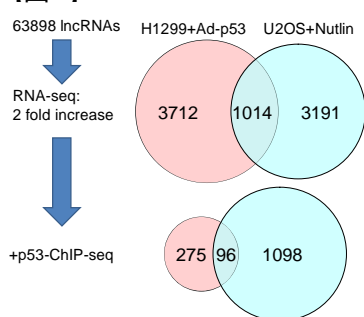
転写因子標的 lncRNA について、siRNA を用いた発現抑制 (ノックダウン) を行い、細胞生物学的影響について解析を行う。

The Cancer Genome Atlas (TCGA)などの公共データベースを用いて、発現の差と予後の関係について解析を行う。

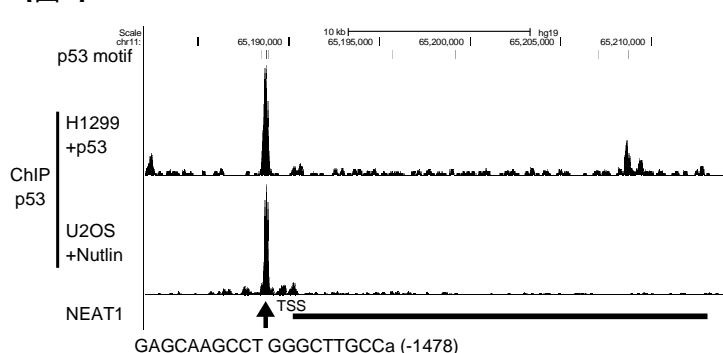
4. 研究成果

癌の約半数で変異が認められる癌抑制遺伝子である p53 の標的長鎖非コード RNA (long non-coding RNA, lncRNA) を探索するために、FLAG タグのついた正常型 p53 および癌において高頻度に認められる 8 種類の変異型 p53 を発現するアデノウイルスベクターを用いて、p53 欠失の癌細胞 H1299 に対して過剰発現させ、抗 FLAG 抗体によるクロマチン免疫沈降後、沈降産物の次世代シーケンサー解析 (ChIP-seq) を行った。その結果、正常型 p53 では多数の結合ピークを認めたが、変異型 p53 においては、ほとんどピークを認めなかった。変異型 p53 が変異によって新規機能を獲得し通常とは違う結合パターンを示すことを想定したが、DNA 結合領域に変異を持つものが多く、今回の実験系では結合自体がほとんど検出できなかった。そこで、正常型 p53 発現による mRNA 発現の変化を次世代シーケンサーによる mRNA 発現解析 (RNA-seq) により定量した。更に p53 正常型である U2OS 細胞を、p53 を分解する MDM2 を阻害する薬剤である Nutlin-3a で処理し、内因性の p53 を活性化させた系でも ChIP-seq, RNA-seq を行った。その結果、U2OS と H1299 細胞でそれぞれ、4205, 4726 の lncRNA が 2 倍以上の発現上昇を認めた。更に ChIP-seq のデータと比較したところ、U2OS で 2 倍以上発現上昇を認めた lncRNA のうち 1194 (28.4%), H1299 では 371 (10.0%) において、lncRNA 遺伝子近傍に p53 の結合が認められた (図 1)。このうち、両者に共通のものが 96 あり、特に p53 の直接標的 lncRNA である可能性が高いと考えられた。

【図 1】



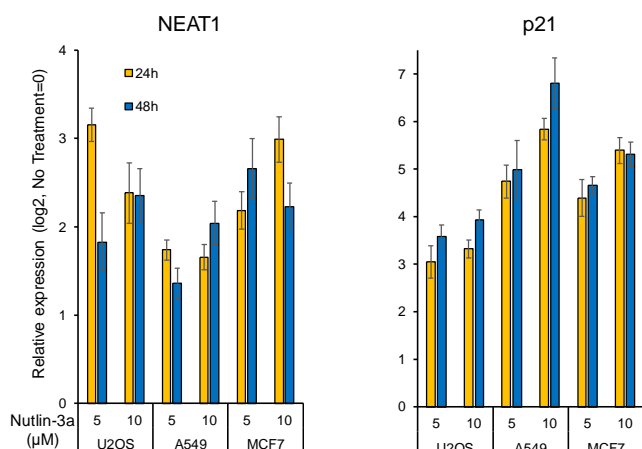
【図 2】



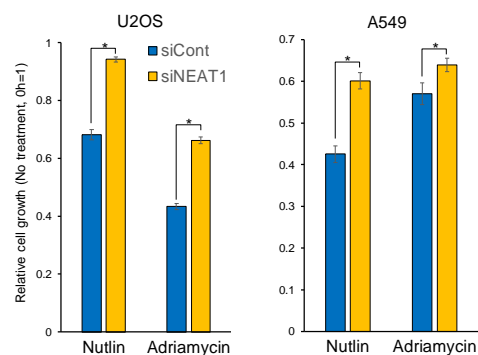
これらの中で、NEAT1 という lncRNA に着目して、更に解析を進めた。ChIP-seq では、NEAT1 遺伝子の転写開始点上流約 1500bp に p53 結合を示すピークを認め、その領域に重なる p53 結合モチーフを認めた (図 2)。その部分の配列を用いたレポーターアッセイでは、p53 による転写活性の上昇が引き起こされた。p53 正常型の 3 種類の癌細胞に Nutlin-3a 処理を行い内因性 p53 を活性化したところ、定量 PCR で既知の p53 標的遺伝子 p21 と同様に NEAT1 の発現が強く誘導されることが判明した (図 3)。また、p53 活性化時に NEAT1 をノックダウンしたところ、p53 によって引き起こされる増殖抑制が減弱した (図 4)。その際の遺伝子発現を RNA-seq を用いて網羅的に解析したところ、NEAT1 のノックダウンにより特定の遺伝子群の発現変化が認められた。また、NEAT1 の発現と予後の関係について、TCGA (The Cancer Genome Atlas) のデータセットを用いて解析を行ったところ、胃癌のほか乳癌、卵巣癌、肉腫において p53 正常の場合には NEAT1 の低発現が予後不良と関連していた一方で、p53 変異の場合には逆に NEAT1 高発現が予後不良となった (図 5)。以上の結果から、p53 による NEAT1 の発現誘導が p53 の腫瘍抑制に寄与すると共に、NEAT1 は p53 依存的に腫

瘍抑制に寄与することが示唆された。

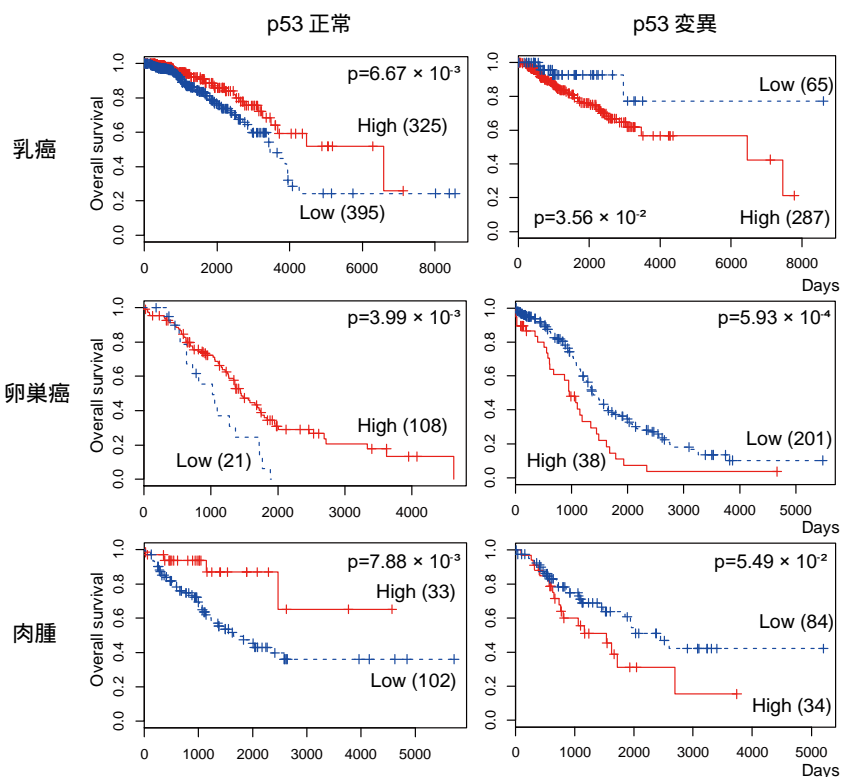
【図3】



【図4】



【図5】



近年、癌における NEAT1 の役割に関する報告が増加しているが、NEAT1 が癌に対して促進的に働くのか抑制的に働くのかについては、現在も議論のあるところである。本研究では NEAT1 が p53 の標的遺伝子として発現誘導されること、NEAT1 のノックダウンが p53 による増殖抑制を阻害することを示した。NEAT1 ノックダウン時の網羅的遺伝子発現解析では、p53 と NEAT1 は腫瘍抑制に寄与するような転写ネットワークを形成していることが判明した。更に、NEAT1 は p53 正常の癌においてのみ高発現群で予後良好となることから、p53 の正常機能に依存して癌抑制的に働くことが示唆され、癌における NEAT1 の役割を考える際に p53 の変異の有無を考慮に入れる必要があると考えられた。近年の癌の網羅的な変異解析では NEAT1 の変異が高頻度に報告されており、今後、癌の診断や治療への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Idogawa Masashi, Nakase Hiroshi, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Prognostic Effect of Long Noncoding RNA NEAT1 Expression Depends on p53 Mutation Status in Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4368068	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 Kamil Muhammad, Shinsato Yoshinari, Higa Nayuta, Hirano Takuro, Idogawa Masashi, Takajo Tomoko, Minami Kentaro, Shimokawa Michiko, Yamamoto Masatatsu, Kawahara Kohichi, Yonezawa Hajime, Hirano Hirofumi, Furukawa Tatsuhiko, Yoshimoto Koji, Arita Kazunori	4. 巻 120
2. 論文標題 High filamin-C expression predicts enhanced invasiveness and poor outcome in glioblastoma multiforme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 819 ~ 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0413-x	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 Nakagaki T, Tamura M, Kobashi K, Omori A, Koyama R, Idogawa M, Ogi K, Hiratsuka H, Tokino T, Sasaki Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Targeted next-generation sequencing of 50 cancer-related genes in Japanese patients with oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tumor Biology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1010428318800180.	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 Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Toyota M, Hatanaka Y, Igarashi T, Kobayashi JI, Ogi K, Dehari H, Miyazaki A, Yorozu A, Yamamoto E, Idogawa M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Hiratsuka H, Suzuki H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-0893-2.	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 Fujii K, Suzuki N, Jimura N, Idogawa M, Kondo T, Iwatsuki K, Kanekura T.	4. 巻 90
2. 論文標題 HSP72 functionally inhibits the anti-neoplastic effects of HDAC inhibitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 82-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.01.002.	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 -

1. 著者名 Idogawa Masashi, Ohashi Tomoko, Sasaki Yasushi, Nakase Hiroshi, Tokino Takashi	4. 巻 140
2. 論文標題 Long non-coding RNA NEAT1 is a transcriptional target of p53 and modulates p53-induced transactivation and tumor-suppressor function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2785 ~ 2791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.30689	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 -

1. 著者名 Koyama Ryota, Tamura Miyuki, Nakagaki Takafumi, Ohashi Tomoko, Idogawa Masashi, Suzuki Hiromu, Tokino Takashi, Sasaki Yasushi	4. 巻 108
2. 論文標題 Identification and characterization of a metastatic suppressor BRMS1L as a target gene of p53	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2413 ~ 2421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13420	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 Nakagaki Takafumi, Tamura Miyuki, Kobashi Kenta, Koyama Ryota, Fukushima Hisayo, Ohashi Tomoko, Idogawa Masashi, Ogi Kazuhiro, Hiratsuka Hiroyoshi, Tokino Takashi, Sasaki Yasushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Profiling cancer-related gene mutations in oral squamous cell carcinoma from Japanese patients by targeted amplicon sequencing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 59113-59122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.19262	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 Tokino Takashi, Idogawa Masashi, Sasaki Yasushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Fledglings in p53 signaling network	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 55768-55769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.19229	査読の有無 無
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 Ohashi T, Idogawa M, Sasaki Y, Tokino T.	4. 巻 390
2. 論文標題 p53 mediates the suppression of cancer cell invasion by inducing LIMA1/EPLIN.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 58-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2016.12.034.	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 -

1. 著者名 Sasaki Y, Tamura M, Takeda K, Ogi K, Nakagaki T, Koyama R, Idogawa M, Hiratsuka H, Tokino T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification and characterization of the intercellular adhesion molecule-2 gene as a novel p53 target.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 61426-61473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.11366	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 井戸川 雅史
2. 発表標題 新規p53標的遺伝子ARVCFはスプライシング変化を誘導し腫瘍抑制に寄与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Idogawa
2. 発表標題 Identification of hub-long non-coding RNAs (lncRNAs) by the network analysis of lncRNA expression in colorectal cancers.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井戸川 雅史
2. 発表標題 大腸癌における発現ネットワーク解析によるハブ長鎖非コードRNA (hub-lncRNA) の同定と機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Idogawa
2. 発表標題 The identification of p53 target genes and noncoding RNAs through the combined analysis of RNA-seq and CHIP-seq data
3. 学会等名 The 17th International p53 Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井戸川 雅史
2. 発表標題 癌におけるp53標的長鎖非コードRNA (lncRNA) の探索と発現ネットワーク解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井戸川 雅史
2. 発表標題 癌におけるp53および長鎖非コードRNA (lncRNA) による転写ネットワーク解析
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----