

令和元年5月29日現在

機関番号：32666
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K18411
 研究課題名(和文) 前立腺がんにおけるアンドロゲン応答性マイクロRNAのエピゲノム作用機構の解明

 研究課題名(英文) Analysis of epigenetic regulation of androgen responsive miRNAs in prostate cancer

 研究代表者
 三沢 彩 (Misawa, Aya)

 日本医科大学・医学部・講師

 研究者番号：20598453
 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)：本研究では石灰化において、タンパクをコードしない RNA (ncRNA) の発現及び機能解析を行った。ヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞株 SaOS-2 を用いて、機能的な lncRNA, HOTAIR の発現解析を行い、骨芽細胞の石灰化における役割を見出した。HOTAIR は石灰化を誘導する ALPL 遺伝子の転写開始点領域の DNA のヒストンのメチル化状態を変化させ、エピジェネティクに遺伝子発現を抑制し、石灰化を負に制御していることを石灰化 アッセイ、定量的 PCR 法、ChIP アッセイ法、及び Reporter Gene アッセイ法で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の石灰化において中心的な役割を果たす ALPL は転移性前立腺がんの増殖に関与していることが報告されている。従って、HOTAIR が ALPL を制御することによって骨の石灰化のみならず、前立腺がんの骨転移にも関与している可能性がある。実際、骨転移した前立腺がんより樹立された VCaP 細胞株は ALPL を発現しており、石灰化することを確認した。前立腺がん細胞は転移巣である骨に到達すると骨特有の性質を示すことが示唆され、本研究は前立腺癌及び骨に転移する他の癌の骨転移のメカニズムに関して新たな手掛かりを与える研究となった。

研究成果の概要(英文)：HOTAIR is a lncRNA that plays critical role in gene regulation and chromatin dynamics through epigenetic mechanisms. In this work we studied the physiological role of HOTAIR during the process of mineralization using osteoblastic osteosarcoma cells focusing in ALPL Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase), a pivotal gene that controls bone formation. HOTAIR knockdown resulted in upregulation of ALPL, increase of alkaline phosphatase (ALP) activity and enhance d mineralization in osteoblastic SaOS-2 cells cultured in mineralizing medium. Luciferase assays using reporter vectors containing ALPL promoter showed that HOTAIR repression increases ALPL promoter activity. Furthermore, HOTAIR knockdown increased histone H3K4 methylation levels at ALPL promoter region, suggesting that ALPL repression by HOTAIR is regulated by epigenetic mechanisms. This work supports that physiological bone formation is epigenetically regulated by a lncRNA.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：lncRNA 転移 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

長鎖非コード RNA (long non-coding RNA, lncRNA) はタンパク質をコードしない 200 塩基以上の転写産物であり、DNA やヒストンの化学修飾、クロマチンの構造変化などのエピジェネティックな機構によって標的遺伝子の発現を制御していることが知られている。

哺乳類の硬組織形成の際に起こる石灰化 mineralization とは細胞外基質であるコラーゲンへのハイドロキシアパタイト結晶の沈着である。組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNAP) はハイドロキシアパタイト形成の阻害物質である無機ピロリン酸を加水分解し、更に無機リン酸を供給するという、石灰化においてきわめて重要な役割を果たしている。

臨床的には、TNAP の遺伝的欠損により石灰化障害を起こす低ホスファターゼ症 Hypophosphatasia (HPP)、石灰化の抑制因子である NPP1 や ANKH の遺伝的欠損により過剰な石灰化に伴う関節や大血管の異所性石灰化が生じることが知られている。しかし、TNAP をコードする *ALPL* 遺伝子の発現制御機構については未解明なところが多い。

2. 研究の目的

本研究では *ALPL* の発現制御機構を明らかにするため、エピジェネティックな制御に関わる lncRNA との関係性を調べた。大動脈弁の異所性石灰化においては、lncRNA HOTAIR が WNT/ β CATENIN 経路を通して *ALPL* を抑制することが示された。HOTAIR はターゲット遺伝子のプロモーターに結合し、ヒストン H3K27 のメチル化、ヒストン H3K4 の脱メチル化によって遺伝子の発現を抑制することが知られている。そこで、骨の石灰化において HOTAIR がエピジェネティックな機構によって *ALPL* の発現を調整しているか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

HOTAIR をターゲットとした siRNA (siHOTAIR) を骨芽細胞様骨肉腫細胞株 SaOS-2 細胞に挿入して定量 PCR 法で HOTAIR の発現が抑制されることを確認した。siHOTAIR を細胞に挿入して HOTAIR の発現を抑制し、石灰化が変化するか石灰化アッセイによって検証を行った。また、石灰化誘導した細胞において *ALPL* の発現変化を定量 PCR 法で解析した。同様に、siHOTAIR を細胞に挿入して TNAP の酵素活性が変化するか、アルカリホスファターゼアッセイによって調べた。

HOTAIR が *ALPL* 遺伝子の転写開始点領域に直接作用して遺伝子発現を制御しているか明らかにするため、*ALPL* のプロモーターを介して作用する Luciferase ベクターを構築し、siHOTAIR と共に細胞に挿入して Reporter Gene Assay を行った。

HOTAIR による *ALPL* の制御がエピジェネティックな機構によって行われているか、*ALPL* のプロモーター領域のヒストンのメチル化状態を ChIP アッセイ法で調べた。

4. 研究成果

HOTAIR を抑制した細胞において石灰化を誘導した結果、コントロールの siRNA を挿入した細胞と比較して石灰化が亢進することが認められた。同様に、HOTAIR を抑制した細胞においてアルカリホスファターゼアッセイを行った結果、*ALPL* の酵素活性の上昇が認められた。定量的 RT-PCR 法により、石灰化を誘導した SaOS-2 細胞において HOTAIR の抑制による *ALPL* の発現誘導が認められ、HOTAIR は *ALPL* を介して石灰化を負に制御していることが示唆された。

ALPL のプロモーターでドライブされる Luciferase ベクターを用いて Reporter Gene Assay を行った結果、siHOTAIR による Luciferase 活性の上昇が認められた。この結果より、HOTAIR が *ALPL* のプロモーターに作用することによって遺伝子の発現を抑制していることが示唆された。

ALPL のプロモーター領域においてヒストンがメチル化を受ける領域を調べるため、公開データベース ChIP Atlas より *ALPL* のプロモーター付近のヒストンのメチル化状態を調べた。Integrative Genome Viewer (IGV) ソフトを用いて ChIP Atlas のデータを可視化した結果、*ALPL* の第一エクソンと第一イントロン間でヒストン H3K4 ジメチル及び H3K4 トリメチルのシグナルが認められた。この領域内に設計した PCR プライマーを用いて ChIP Assay を行った結果、siRNA で HOTAIR を抑制した細胞ではコントロール細胞と比較して、*ALPL* のプロモーター領域のヒストン H3K4 ジメチル化及びトリメチル化が上昇した。

これまでの研究より、SaOS-2 細胞の石灰化において HOTAIR がヒストンのメチル化を介したエピジェネティックな機構により *ALPL* の発現を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 10 件）

1. Misawa A. and Orimo H. lncRNA HOTAIR Inhibits Mineralization in Osteoblastic Osteosarcoma Cells by Epigenetically Repressing ALPL. *Calcif Tissue Int.* 103(4):422-430. 2018.
2. Misawa A., Takayama KI, Inoue S. Long Non-coding RNAs and Prostate Cancer. *Cancer Sci.* 108(11):2107-2114. 2017. Review.
3. Takayama KI, Misawa A., Inoue S. Significance of microRNAs in Androgen Signaling and Prostate Cancer Progression. *Cancers (Basel).* 9 (8). 2017. Review.
4. Misawa A., Takayama KI, Fujimura T, Homma Y, Suzuki Y, Inoue S: Androgen-induced lncRNA *POTEF-AS1* regulates apoptosis related pathway to facilitate cell survival in prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 108(3):373-379, 2017.
5. Misawa A #, Takayama KI#, Urano T, Inoue S (#co-first author): Androgen-induced Long Noncoding RNA (lncRNA) *SOCS2-AS1* Promotes Cell Growth and Inhibits Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem.* 291(34):17861-80, 2016.
6. Takayama KI#, Misawa A #, Suzuki T, Takagi K, Hayashizaki Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S, Urano T, Inoue S (#co-first author): *TET2* repression by androgen hormone regulates global hydroxymethylation status and prostate cancer progression. *Nat Commun.* 6:8219, 2015.
7. Misawa A., Inoue S: Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 26;6:83, 2015.
8. Ohta S, Misawa A., Fukaya R, Inoue S, Kanemura Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M.: *Macrophage migration inhibitory factor (MIF)* promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells. *J Cell Sci.* 125(Pt 13); 3210-3220, 2012.
9. Misawa A., Katayama R, Koike S, Tomida A, Watanabe T, Fujita N: AP-1-Dependent *miR-21* expression contributes to chemoresistance in cancer stem cell-like SP cells. *Oncol Res* 19(1), 23-33, 2010.
10. Kamoi KI, Yamamoto K, Misawa A., Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, Mochizuki M, Watanabe T: SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology.* 3; 5, 2006.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 第 12 回 ALPS 研究会 「ヒト骨肉腫細胞における lncRNA による ALPL のエピジェネティック制御機構の解析」
2. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 「ヒト骨肉腫細胞における HOTAIR による ALPL のエピジェネティックな制御機構の解析」
3. 第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 「ヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞における HOTAIR による ALPL のエピジェネティックな制御機構の解析」

〔図書〕（計 1 件）

1. Misawa A., Takayama K, Inoue S: MicroRNAs in Prostate Cancer, microRNAs in cancer, (edited by César López-Camarillo, Laurence Annie Marchat) *Science Publishers*, Jersey, British Channel Islands, GB, (pp 128-155), 2012.

〔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。