

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19030

研究課題名(和文) 上皮間葉転換(EMT)を制御する長鎖非コードRNAの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of long noncoding RNAs that regulate epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

寺島 農(Terashima, Minoru)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80507434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： これまでのがん悪性化機構として上皮間葉転換(EMT)に着目し、エピジェネティック制御因子であるポリコム抑制複合体(PCRC2)が、上皮系遺伝子の発現を抑制することで、EMTを誘導することを示した。本研究では、PCRC2が標的遺伝子座へ近づく際に、長鎖非コードRNA(タンパク質をコードしない200塩基以上のRNA)の1つであるMEG3がガイドとして機能することを示唆する結果を得た。本研究成果は、長鎖非コードRNAが関わるがん悪性化機構の理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： We have focused on epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a mechanism of cancer progression and reported that polycomb repressive complex 2 (PCRC2), which is one of epigenetic regulators, induces EMT by repressing the expression of epithelial genes. In this study, we proposed that MEG3 long noncoding RNA guides PCRC2 to its target gene loci. These results contribute to understanding of long noncoding RNA involved in cancer progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：上皮間葉転換 EMT 長鎖非コードRNA lncRNA ポリコム抑制複合体 PCRC2

1. 研究開始当初の背景

がん悪性化機構として上皮間葉転換 (EMT; 可動性の低い上皮細胞が上皮性を失い、浸潤・転移しやすい間葉系細胞の性質を獲得すること) に着目し、TGFβの添加により EMT を引き起こす EMT モデル細胞を用いて、エピジェネティック制御因子であるポリコム抑制複合体 (PRC2) および PRC2 結合タンパク質の 1 つである JARID2 が、上皮系遺伝子の発現を抑制することで、EMT を誘導することを示した。研究開始当初、PRC2-JARID2 複合体が E-カドヘリンなどの上皮系遺伝子座を認識し結合する際に、長鎖非コード RNA (タンパク質をコードしない 200 塩基以上の RNA) の 1 つである MEG3 がガイドとして機能する可能性を示唆する結果を得ていた (図 1)。

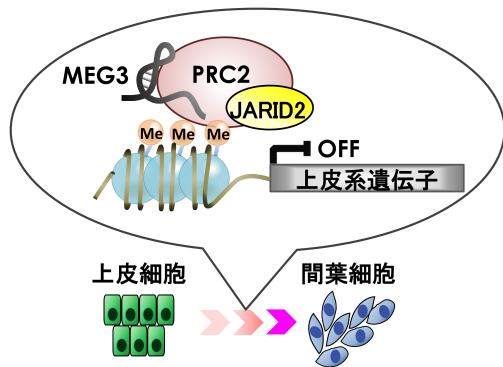


図1.(作業仮説)MEG3は、PRC2複合体を上皮系遺伝子座へ案内し、それら遺伝子の発現抑制に関与することによって、EMTの制御に関与する。

MEG3 は悪性化がんでの発現異常が多数見つかっていたものの、その機能は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、EMT における MEG3 の機能を調べ、新しい EMT 制御因子としての長鎖非コード RNA の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 定量 PCR 法

MEG3 や、E-カドヘリンなどの上皮マーカーの RNA 発現量を、定量 PCR によって検出する。

(2) ウェスタンブロット法

上皮マーカー、間葉マーカーのタンパク質発現レベルを、それぞれの抗体を用いたウェスタンブロットにより検出する。

(3) クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

E-カドヘリンなどの遺伝子座におけるヒストンのメチル化レベル、PRC2 や JARID2 のリクルートメントレベルを、ChIP アッセイによって確かめる。

(4) RNA 免疫沈降 (RIP) 法

JARID2 に対する MEG3 の相互作用の有無を確かめる。FLAG 抗体を用いて JARID2-FLAG を免疫沈降し、一緒に共沈してくる MEG3 長鎖非コード RNA を cDNA に変換後、定量 PCR により測定する。

(5) RNA 精製によるクロマチン分離 (ChIRP) 法

E-カドヘリンなどの遺伝子座における MEG3 のリクルートメントレベルを確かめる。MEG3 特異的に結合できるビオチン化したオリゴにより MEG3 をプルダウンし、一緒に共沈してくるゲノム領域を定量 PCR により測定する。

4. 研究成果

まず、MEG3 が EMT プロセスに関わる可能性があるかどうかを確かめるために、EMT モデル細胞における MEG3 の発現を調べた。モデル細胞が TGFβによって間葉細胞へ移行する際に、MEG3 は顕著に発現上昇していた (図 2)。

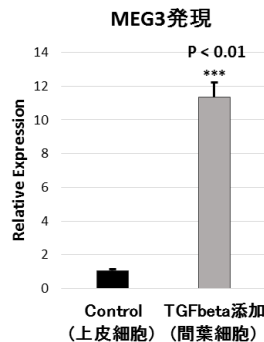


図 2; TGFβによって誘導される EMT において、MEG3 の発現は上昇する。Control (上皮細胞) とそれに、TGFβを添加して間葉転換した細胞における MEG3 の発現レベルを定量 PCR によって、調べた。

次に、EMT における MEG3 の影響を確かめるために、モデル細胞の MEG3 をノックダウンし、マーカータンパク質の発現を調べた。コントロール細胞では、TGFβ添加によって、上皮マーカー (E-cadherin) の発現は抑制され、間葉マーカー (Fibronectin、Vimentin、ZEB1、ZEB2) の発現は誘導されるが、MEG3 をノックダウンした細胞では上皮マーカーの発現は抑制されず、間葉マーカーの発現は誘導されなかった (図 3)。

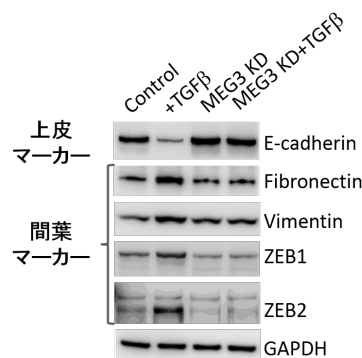


図3; MEG3のノックダウン(KD)によりEMTの進行が阻害される。Control、それに TGFβを添加した細胞 (+TGFβ) MEG3 ノックダウン細胞 (MEG3 KD) それに TGFβを添加した細胞 (MEG3 KD+TGFβ) における上皮マーカー、間葉マーカーの発現レベル。

さらに、MEG3を大量発現させると、TGFβを添加しなくても、E-カドヘリンの発現が抑制された(図4)。

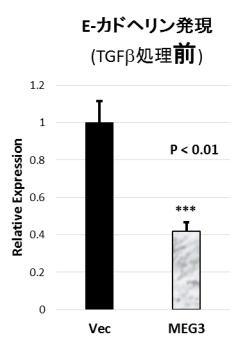


図4 ; MEG3を大量発現させるだけで、E-カドヘリンの発現を抑制できる。Vec (コントロール) 細胞、および MEG3 (MEG3 大量発現) 細胞における E-カドヘリンの発現を、TGFβを添加しない状態で、測定。

以上より、MEG3 は上皮マーカーの発現を抑制することにより EMT の進行に関与することが示唆された。

これまでに、E-カドヘリンなどの上皮マーカーの発現抑制にはPRC2-JARID2複合体が関わることが分かっていたので、それら遺伝子座におけるPRC2リクルートメント、およびPRC2によって引き起こされるH3K27のメチル化レベルを、PRC2を構成するタンパク質であるEZH2、およびH3K27me3抗体を用いたChIP法によって調べた。Control細胞では、TGFβ添加によって、EZH2を含むPRC2がE-カドヘリン遺伝子座へリクルートされ、H3K27のメチル化レベルが上昇するが、MEG3を大量発現させた細胞では、TGFβを添加しなくてもPRC2がリクルートされ、H3K27のメチル化レベルが上昇した(図5)。

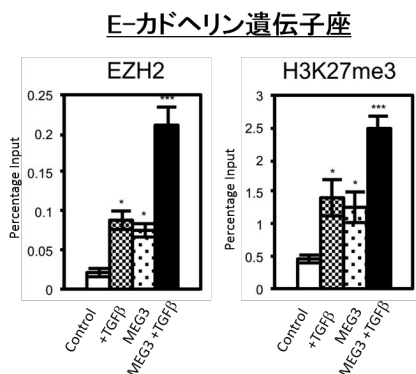


図5; MEG3の大量発現により PRC2 が E-カドヘリン遺伝子座にリクルートされ、H3K27me3 のレベルが上昇する。Control、それに TGFβを添加した細胞 (+TGFβ)、MEG3 大量発現細胞 (MEG3)、それに TGFβを添加した細胞 (MEG3 KD+TGFβ) における E-カドヘリン遺伝子座の PRC2 リクルートメントおよび H3K27 のトリメチル化レベル。

よって、MEG3 は PRC2-JARID2 複合体のリクルートメントに関与することによって、EMT を制御している可能性が示唆された。そこで、MEG3 が直接 PRC2-JARID2 複合体と相互作用することによって、複合体のリクルートメントに関与しているかどうかを、RIP法により調べた。JARID2-FLAG を FLAG 抗体により免疫沈降すると、MEG3

が共沈されたので、JARID2 および MEG3 は相互作用することが示唆された(図6)。

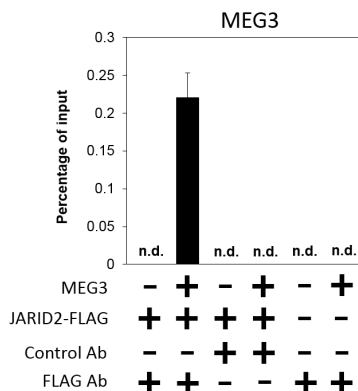


図6; MEG3 は JARID2 と相互作用する。JARID2-FLAG および MEG3 を大量発現させた細胞(左から2レーン目)から FLAG 抗体によって JARID2 を免疫沈降し、一緒に沈降してくる MEG3 を定量 RT-PCR によって検出した。

最後に、MEG3 自体が E-カドヘリン遺伝子座へリクルートされているかを ChIRP 法により確かめた。MEG3 は TGFβ を添加した時、および MEG3 を大量発現させたときに E-カドヘリン遺伝子座へリクルートされた(図7)。

#### E-カドヘリン遺伝子座

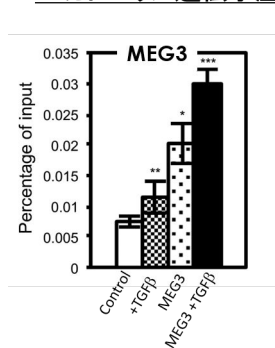


図7; MEG3 は E-カドヘリン遺伝子座にリクルートされる。Control、それに TGFβ を添加した細胞 (+TGFβ)、MEG3 大量発現細胞 (MEG3)、それに TGFβ を添加した細胞 (MEG3+TGFβ) における E-カドヘリン遺伝子座の MEG3 リクルートメントレベル。

以上より、MEG3 は PRC2-JARID2 複合体と共に E-カドヘリンなどの上皮系遺伝子座へリクルートされ、それらの遺伝子発現制御に関与することにより、EMT の進行に寄与することが示された。これらの結果を含んだ成果を、2017 年 JBC 誌へ報告した。

#### 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)

Terashima M, Ishimura A, Wanna-Udom S, Suzuki T.

Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by KDM6A histone demethylase in lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490, 1407-1413 (2017) 査読有り。

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.048.

Terashima M, Tange S, Ishimura A, Suzuki T.  
MEG3 Long Noncoding RNA Contributes to the Epigenetic Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cell Lines. *J Biol Chem.* 292, 82-99 (2017) 査読有り。  
DOI: 10.1074/jbc.M116.750950.

Oktyabri D, Ishimura A, Tange S, Terashima M, Suzuki T.  
DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines. *Biochimie* 123, 20-31 (2016) 査読有り。  
DOI: 10.1016/j.biochi.2016.01.005.

〔学会発表〕(計 5 件)

寺島 農.  
「MEG3 長鎖ノンコーディングRNA による上皮間葉転換のエピジェネティック制御機構。」  
TGF- $\beta$ によって誘導される上皮間葉転換のエピジェネティクス制御機構」 HOKURIKU RNA CLUB (金沢、2017 年 12 月)

寺島 農、丹下 正一朗、Sasithorn Wanna-udom、石村 昭彦、鈴木 健之。  
「TGF- $\beta$ によって誘導される上皮間葉転換のエピジェネティクス制御機構。」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸、2017 年 12 月)

Terashima M, Ishimura A, Tange S, Suzuki T.  
「 Epigenetic Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells.」 The 12th International Symposium of Institute Network (東京、2017 年、11 月)

Terashima M, TangeS, Ishimura A and Suzuki T.  
「上皮間葉転換における PRC2 遺伝子発現抑制メカニズム。」 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜、2016 年 12 月)

Minoru Terashima.  
「上皮間葉転換におけるポリコーン抑制複合体 PRC2 を介したエピジェネティック制御機構」 第 3 回北陸エピジェネティクス研究会 (福井、2016 年 11 月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/Genomics/index.html>

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
寺島 農 (TERASHI MINORU)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
研究者番号 : 80507434

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし

(4)研究協力者  
該当なし