

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02704

研究課題名(和文) Inc162によるDNA脱メチル化剤感受性増強の分子機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of Inc162 on sensitivity to DNA demethylating agents

研究代表者

牛島 俊和 (Ushijima, Toshikazu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90232818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA脱メチル化剤(5-aza-dC)の高感受性と関連するlong-noncoding RNA linc00162 (Inc162)の分子機構の解明と、他の固形腫瘍における役割を解析した。Inc162と相互作用する因子としてHNRNP1を同定した。HNRNP1はアポトーシス関連遺伝子のスプライシングを調節し、5-aza-dC感受性を制御していた。Inc162はin vivoにおいても5-aza-dC治療の感受性に関与した。脂肪肉腫においては5-aza-dC投与でInc162の発現が誘導され、その普遍性が示された。本研究成果を原著論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、固形腫瘍へのDNA脱メチル化剤治療の効果予測マーカーであるInc162が同定された。また、今回明らかとなった作用機序を考慮すると、Inc162を標的とすることによって、DNA脱メチル化剤を増強する治療戦略の開発につながる可能性も示された。この研究成果によって、停滞している固形腫瘍へのDNA脱メチル化剤治療が促進すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA demethylation therapy is now expanding from hematological tumors to solid tumors. Previously, we have identified a long noncoding RNA, linc00162 (Inc162), as highly and frequently expressed in gastric cancer cell lines sensitive to 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC). Here, we aimed to reveal the molecular mechanisms how Inc162 is involved in 5-aza-dC sensitivity and the function of Inc162 in other solid tumors. In vivo experiments showed that Inc162 overexpression increased the sensitivity. Mechanistically, Inc162 interacted with an RNA splicing protein, HNRNP1, and decreased splicing of an anti-apoptotic splicing variant, BCL-XL. In liposarcomas cell lines, Inc162 expression was induced by the treatment of 5-aza-dC, meaning that the involvement of Inc162 in 5-aza-dC sensitivity is universally applicable to solid tumors. Inc162 may have translational value to predict patients who will respond to 5-aza-dC. We have published these findings as an original paper.

研究分野：分子生物学、エピジェネティクス

キーワード：DNA脱メチル化治療 効果予測マーカー lincRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 脱メチル化治療は特定の固形腫瘍にも重要

DNA メチル化異常は遺伝子機能の非可逆的な変化を誘発し、圧倒的に多くの成人腫瘍では突然変異と DNA メチル化異常とが存在する。特に、胃がんなど慢性炎症の関与が深いがんでは、全ゲノム解析によってもドライバー変異が見つからない症例も多い[Wang, Nat Genet 46:573, 2014]。一方で、DNA メチル化異常によるドライバーパスウェイの変化は高頻度に認められる(申請者の成果) [Yoda, Gastric Cancer, 18:65, 2015]。

DNA メチル化は DNA 脱メチル化剤 (5-azacitidine 及び 5-aza-2'-deoxycytidine: 5-aza-dC) により取り除くことが可能である。これら薬剤は血液腫瘍においては既に臨床導入されている(我が国では 5-azacitidine のみ)。また、固形腫瘍でも多くの臨床試験が実施され、有望な成績が報告され始めている [Juergens, Cancer Discov, 1:598, 2011; Schneider, Clin Cancer Res, 23:2673, 2016]。

固形腫瘍に応用する際には DNA 脱メチル化作用を最大にすることが必要で、そのためには低濃度処理・長期休薬が重要であることが知られるようになってきている [Tsai, Cancer Cell, 21:430, 2012; Jones, Nat Rev Genet, 17:630, 2016]。

(2) DNA 脱メチル化治療の効果予測と機序解明は重要

DNA 脱メチル化剤が実用化されている血液腫瘍では一次・二次の耐性を示す症例が存在する。また、固形腫瘍の細胞株も様々なレベルの感受性を示す(図 1)。従って、DNA 脱メチル化剤の有用性向上のために効果予測マーカーが重要となるが、既報マーカーは再現性に乏しい。

DNA 脱メチル化治療の機序には未だ不明の点が多い。最近、I 型インターフェロン産生誘導(内在性レトロウイルスの活性化による)が報告された [Chiappinelli, Cell, 162:974, 2015]。申請者は間質細胞での DNA メチル化異常も見いだしており、間質への効果が重要な可能性もある。新たな作用機序解明は重要な課題である。

(3) DNA 脱メチル化治療効果を規定する *lnc162*

申請者は、胃がん細胞株について 5-aza-dC 長期処理に対する感受性を検討、高発現と感受性が関連する遺伝子として *linc00162* (*lnc162*)を見いだした。この遺伝子のノックダウンは感受性を低下、過剰発現は感受性を増加させ、*lnc162* の高発現は DNA 脱メチル化剤への感受性を増強させることが確認された(図 2)。

2. 研究の目的

DNA 脱メチル化治療は血液腫瘍で実用化され、米国では固形腫瘍での臨床研究も盛んである。一方、効果予測マーカーで信頼性が高いものではなく、DNA 脱メチル化剤の作用機序にも不明の点が数多く残る。

申請者は、予備的解析により、DNA 脱メチル化効果が低い低濃度・長期休薬により胃がん細胞株を処理した際の高感受性と関連する long-noncoding RNA *linc00162* (*lnc162*)を同定した。*lnc162* の過剰発現は 5-aza-dC に対する感受性を増強、ノックダウンは低下させることも確認した。

本研究では、下記 2 つの Specific Aim のもと遂行した。

【Aim 1】 *lnc162* の高発現が 5-aza-dC に対する感受性を増強する分子機構の解明

【Aim 2】 他の固形腫瘍における DNA 脱メチル化作用機序の解明。

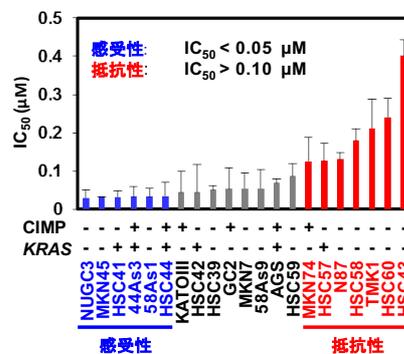


図 1 胃がん細胞株 21 個の 5-aza-dC 感受性
胃がん細胞株を 4 日間処理、4 日間休薬した際の感受性。

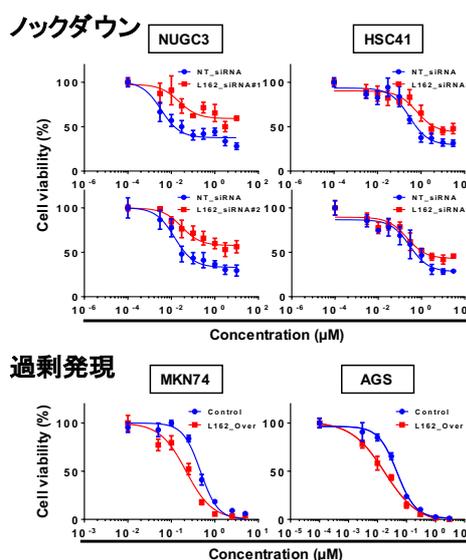


図 2 *lnc162* の 5-aza-dC 感受性への影響
2 種類の siRNA によるノックダウン(赤線)により感受性が低下、過剰発現(赤線)により増加した。

3. 研究の方法

【Aim 1】 *lnc162* の高発現が 5-aza-dC に対する感受性を増強する分子機構の解明

lnc162 は主に核に存在することが判明しているため、一般的に lncRNA の作用標的として知られている 1) タンパク質、2) miRNA、及び、3) ゲノム DNA との相互作用に関し、それぞれの可能性を検討していく。

(1) *lnc162* と相互作用するタンパク質の同定

BrdU でラベルした *lnc162* の sense 鎖及び anti-sense 鎖と、細胞から抽出した核及び細胞質分画を反応させ、抗 BrdU 抗体により免疫沈降する。Sense 鎖に特異的に結合したタンパク質を質量分析により同定する。同定したタンパク質の sense 鎖への特異的な結合を Western blot により確認する。

(2) *lnc162* と相互作用する miRNA の解析

lnc162 の sense 鎖及び anti-sense 鎖の免疫沈降物から RNA を回収し、RNA-seq 解析を行う。Sense 鎖に特異的に結合をする miRNA を同定する。

(3) *lnc162* と相互作用する DNA の解析

lnc162 の cis の調節機構の有無を解析するために、*lnc162* (21q22.3) 近傍の *ITGB2*, *FAM207A*, *ADARB1* について、*lnc162* のノックダウン及び過剰発現細胞株での発現変化を定量する。これらの変化が認められた場合、局所ゲノムと相互作用している可能性がある。

(4) 5-Aza-dC 感受性への関与の機構の解明

研究項目(1)-(3)で有力と思われた *lnc162* の相互作用の対象 (タンパク質、miRNA または、ゲノム DNA) について、5-aza-dC 感受性への関与の機構を明らかにする。タンパク質の場合は、その発現抑制により *lnc162* 高発現による 5-aza-dC 感受性増加がキャンセルされるか否かを明らかにする。miRNA の場合はその標的遺伝子が 5-aza-dC 感受性に関与するか否か、*lnc162* との結合が細胞内局在等により変化するかを解析する。*lnc162* 近傍の特定遺伝子の場合、その発現増加 (または低下) が *lnc162* 高発現による 5-aza-dC 感受性増加に影響を与えるか否かを解析する。いずれの場合も、培養細胞での評価に加え、nude マウスへの胃がん細胞株移植系を用いて 5-aza-dC 治療への感受性の変化を明らかにする。

【Aim 2】 他の固形腫瘍における DNA 脱メチル化作用機序の解明。

lnc162 を介した DNA 脱メチル化剤の作用機序が他の固形腫瘍においても普遍的であるかの検討を進める。当該研究者自身の他の研究で、神経芽腫・骨肉腫に対する 5-aza-dC 治療の有効性を示したため、脂肪肉腫等を標的とする。まず、細胞株の 5-aza-dC の感受性と *lnc162* の発現との相関を明らかにする。

4. 研究成果

【Aim 1】 *lnc162* の高発現が 5-aza-dC に対する感受性を増強する分子機構の解明

(1) *lnc162* と相互作用するタンパク質の同定 (図 3)

HSC41 及び NUGC3 細胞株を用いた RNA pull-down assay の結果から、*lnc162* の sense 鎖と核抽出産物を反応させた時に現れるバンドを検出した。このバンドは、*lnc162* の anti-sense 鎖を用いた時及び細胞質抽出産物を用いた時は検出されなかった。バンドを単離し質量分析を行ったところ、候補タンパク質として HNRNPH1 (HNRH1), PRP19, RBM34 が同定された。

Western blotting から、RBM34 は胃がん細胞株で発現していないこと、PRP19 は anti-sense *lnc162* との結合することが示された。一方、HNRH1 は HSC41

及び NUGC3 細胞において sense *lnc162* と結合していることが確認された。

lnc162 と HNRH1 との相互作用をさらに詳細に調べるために、*lnc162* の deletion mutant を作製し RNA pull-down assay を行なった。5'領域欠損 mutant では HNRH1 との結合が弱まったが、3'領域欠損 mutant では全長と比較して変化がなかった。よって、*lnc162* の 5'領域が HNRH1 との結合に重要であることが示された。

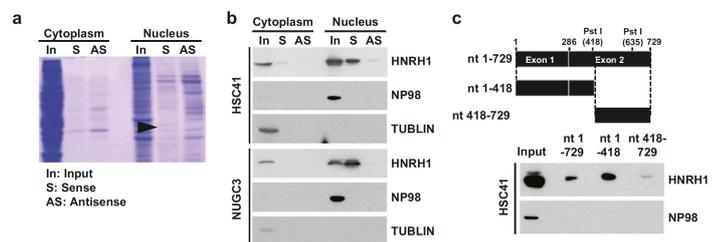


図 3 *lnc162* と相互作用するタンパク質 HNRH1 の同定

(a) BrdU でラベルした *lnc162* の抗 BrdU 抗体により、核分画との免疫沈降でのみ検出されるバンドを見出した。(b) 質量分析及び Western blot の結果、HNRH1 を同定した。(c) *lnc162* の 5'末領域が HNRH1 と結合している。

(2) 5-Aza-dC 感受性への関与の機構の解明 (図 4)

lnc162 の相互作用の対象として、核内でスプライシングに関わる HNRP1 が同定されたことから、HNRP1 の 5-aza-dC 感受性への関与の機構を解析した。

まず、胃癌細胞 20 株における HNRP1 の発現を解析したところ、どの細胞株でも均一に発現しており、5-aza-dC 感受性との相関は見出されなかった。5-Aza-dC 高感受性の MKN74 及び AGS 細胞株を用いて、HNRP1 をノックダウンすると、薬剤添加無しでも細胞増殖が減少した。このことから、HNRP1 は細胞の生存に関わることが示された。また、通常は *lnc162* 過剰発現によって上昇する 5-aza-dC への感受性が、HNRP1 ノックダウンによりキャンセルされた。これらの結果から、HNRP1 は *lnc162* による 5-aza-dC 感受性機構に関わっていることが示された。

HNRP1 と *lnc162* の相互作用がいかに 5-aza-dC 感受性に関わるのかを検討するために、HNRP1 タンパク質安定性に着目した。*lnc162* を過剰発現させた細胞株においても、HNRP1 タンパク質の発現が変化しなかった。次に HNRP1 のスプライシング機能に関して、その標的である BCL-XL の variant 発現の解析を行った。*lnc162* ノックダウン HSC44 細胞株において、抗アポトーシス関連の variant である BCL-XL の発現が上昇し、過剰発現 AGS 及び MKN74 細胞において、BCL-XL の発現が減少した。このことから、*lnc162* は、HNRP1 のスプライシング機能を制御することにより、アポトーシス関連遺伝子のスプライシング variant の発現を調節し、5-aza-dC 感受性に関与していることが明らかとなった。

(3) *in vivo* における 5-aza-dC 治療への感受性の変化 (図 5)

最後に、*in vivo* での *lnc162* の効果を解析するために、*lnc162* 過剰発現 MKN74 細胞を nude mouse に移植し、5-aza-dC による治療を行った。*lnc162* 過剰発現細胞は、コントロール細胞と比較して、5-aza-dC に反応し、腫瘍増殖抑制効果が観察された。また、腫瘍重量も有意に減少した。副作用としては若干の体重減少及び白血球減少が観察された。これらの結果から、*in vivo* における 5-aza-dC 治療の感受性にも *lnc162* が関与していることが示された。

【Aim 2】他の固形腫瘍における DNA 脱メチル化作用機構の解明。

脂肪肉腫細胞株 LP6 と LPS12 を用いて 5-aza-dC 治療への感受性を検討した。未処理細胞では *lnc162* は発現が抑制されていたが、5-aza-dC 処理によって LP6 では 26 倍、LPS12 では 61 倍と顕著な発現上昇が観察された。脂肪肉腫においては、DNA 脱メチル化剤の投与で感受性増強因子 *lnc162* が発現し、効果が発揮されることが示唆された。このことから、*lnc162* の 5-aza-dC 感受性関与はがん細胞の種類を問わず普遍的であることが示された。

まとめ：

lnc162 は、固形腫瘍への DNA 脱メチル化剤治療の効果予測マーカーとして有望である。また、本研究で明らかとなった作用機序を考慮すると、*lnc162* を標的とすることによって、DNA 脱メチル化剤を増強する治療戦略の開発につながる可能性もあることが示された。

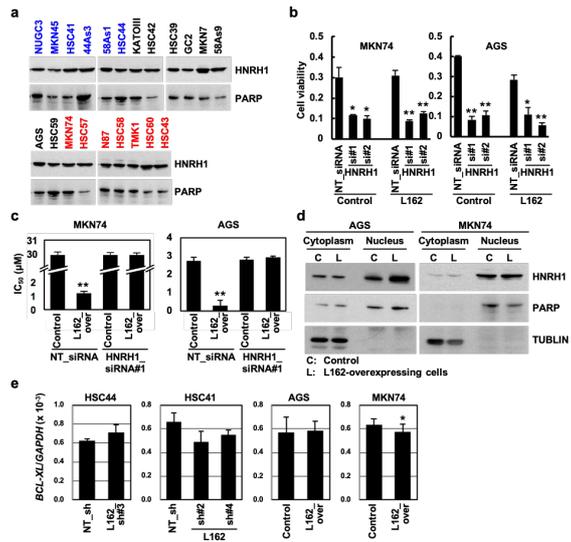


図 4 HNRP1 の 5-Aza-dC 感受性への関与 (a) HNRP1 タンパク質は 5-aza-dC 高感受性細胞株 (青字) においても低感受性細胞株 (赤字) においても同程度に発現していた。(b) *HNRP1* ノックダウンによって細胞増殖が抑制された。(c) *lnc162* 過剰発現によって上昇する 5-aza-dC への感受性が、HNRP1 ノックダウンによりキャンセルされた。(d) *lnc162* 過剰発現細胞株においても、HNRP1 タンパク質の発現が変化しなかった。(e) *lnc162* ノックダウン細胞株において、抗アポトーシス関連 variant である *BCL-XL* の発現が上昇し、過剰発現細胞において減少した。

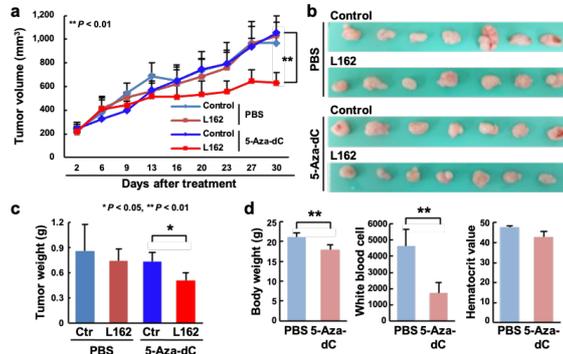


図 5 *lnc162* の *in vivo* における 5-aza-dC 治療への効果 (a, b, c) *lnc162* 過剰発現細胞は、5-aza-dC に反応して腫瘍増殖抑制効果が観察された。(d) 副作用としては若干の体重減少及び白血球減少が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita Satoshi, Nanjo Sohachi, Rehnberg Emil, Iida Naoko, Takeshima Hideyuki, Ando Takayuki, Maekita Takao, Sugiyama Toshiro, Ushijima Toshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct DNA methylation targets by aging and chronic inflammation: a pilot study using gastric mucosa infected with Helicobacter pylori	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0789-8	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 Zong Liang, Hattori Naoko, Yasukawa Yoshimi, Kimura Kana, Mori Akiko, Seto Yasuyuki, Ushijima Toshikazu	4. 巻 38
2. 論文標題 LINC00162 confers sensitivity to 5-Aza-2'-deoxycytidine via modulation of an RNA splicing protein, HNRNPH1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5281 ~ 5293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0792-8	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 Ishihara Hiroki, Yamashita Satoshi, Liu Yu Yu, Hattori Naoko, El Omar Omar, Ikeda Takashi, Fukuda Hironori, Yoshida Kazuhiko, Takagi Toshio, Taneda Sekiko, Kondo Tsunenori, Nagashima Yoji, Tanabe Kazunari, Ushijima Toshikazu	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic and epigenetic profiling indicates the proximal tubule origin of renal cancers in end stage renal disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4276 ~ 4287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14633	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 Yasukawa Yoshimi, Hattori Naoko, Iida Naoko, Takeshima Hideyuki, Maeda Masahiro, Kiyono Tohru, Sekine Shigeki, Seto Yasuyuki, Ushijima Toshikazu	4. 巻 42
2. 論文標題 SAA1 is upregulated in gastric cancer-associated fibroblasts possibly by its enhancer activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 180 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa131	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 Ueda Sho, Yamashita Satoshi, Watanabe Shun-ichi, Wakabayashi Mika, Motoi Noriko, Noguchi Masayuki, Sekine Shigeki, Sato Yukio, Ushijima Toshikazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Influence of degree of DNA degradation in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples on accuracy of genome-wide DNA methylation analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epigenomics	6. 最初と最後の頁 565 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/epi-2020-0431	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 牛島俊和	4. 巻 -
2. 論文標題 エピジェネティック変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 入門腫瘍内科学 改訂第3版	6. 最初と最後の頁 36 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 服部奈緒子、牛島俊和	4. 巻 78
2. 論文標題 エピジェネティクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床 増刊号「肉腫」	6. 最初と最後の頁 95 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 牛島俊和
2. 発表標題 Epigenetic field: Discovery to A Clinical Application
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部奈緒子、丹羽透、大河内(高田)江理子、今井俊夫、牛島俊和
2. 発表標題 Identification of environmental factors that induce aberrant DNA methylation
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 牛島俊和、茂呂浩史、中村能章、服部奈緒子
2. 発表標題 Gastric Cancer is Heavily Influenced by Aberrant DNA Methylation and Shows Sensitivity to DNA Demethylating Therapy
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasukawa Yoshimi, Zong Liang, Hattori Naoko, Mori Akiko, Kimura Kana, Seto Yasuyuki, Ushijima Toshikazu
2. 発表標題 LINC00162 Confers Sensitivity to 5-Aza-2'-deoxycytidine via Modulation of an RNA Splicing Protein, HNRNPH1
3. 学会等名 Post-A3 Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安川佳美、宗亮、服部奈緒子、瀬戸泰之、牛島俊和
2. 発表標題 LINC00162 Confers Sensitivity to 5-Aza-2'-deoxycytidine via Modulation of an RNA Splicing Protein, HNRNPH1
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshima Hideyuki、Yoda Yukie、Watanabe Naoko、Ushijima Toshikazu
2. 発表標題 Low-dose DNA demethylating therapy induces reprogramming of specific cancer-related pathways at the single-cell level
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	服部 奈緒子 (Hattori Naoko)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員	
	(30611090)	(82606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------