

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06191

研究課題名(和文) 内在性レトロエレメントLINE-1のDNA損傷誘導性選択的転移による発がん機構

研究課題名(英文) Role of DNA damage-induced directional LINE-1-retrotransposition in tumor progression.

研究代表者

飯島 健太 (IIJIMA, Kenta)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・研究技術職員

研究者番号：20565626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：内在性レトロトランスポゾンの1つであるLINE-1の動きが種々の刺激により活性化されることが報告されているが、その活性化機序、および生物学的な意義は不明である。ゲノム解析技術の進展により、がん細胞で高頻度にLINE-1の新規挿入が検出されることが示され、LINE-1と発がんとの関連が注目されている。本研究では、LINE-1がDNA損傷応答して選択的な領域に転移する可能性を見出した。この分子機構として、DNA損傷に応答してLINE-1タンパク質がDNA損傷応答性転写調節因子に結合し、転写調節因子の標的ゲノム領域に集積することで、転移反応を惹起することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではDNA損傷により誘導される部位特異的なLINE-1転移誘導機構、および選択的な細胞形質変化の可能性を明らかにした。本研究成果は基礎生物学のみにとどまらず、医薬学領域にも広範な影響をもたらす。すなわち、LINE-1の活性化状態により疾患のリスク評価に応用できる可能性、あるいはLINE-1活性の適切な制御を可能とする新規薬剤の開発により、がんをはじめとした疾患の予防・治療が可能となると期待され、本研究によりもたらされる知見は今後の医療・創薬分野における新たな創造的基盤をもたらすものと予想される。

研究成果の概要(英文)：Retrotransposition of Long interspersed element-1 (LINE-1) is induced by various stimuli, however, the precise mechanism and its biological roles remain unknown. The improvement of analysis to comprehensively identify the de novo integrations of LINE-1 showed the unexpectedly higher frequencies in tumor tissues, implying the intimate association of tumor progression and LINE-1 retrotransposition. In this study, we found that LINE-1-integration directed to a specific region was provoked by DNA damage induction. The interaction between LINE-1 protein complex and transcriptional factors, which response to DNA damage and accumulate on the target genes underlay the region directional LINE-1 retrotransposition.

研究分野：ウイルス学

キーワード：LINE-1 DNA損傷 がん化

1. 研究開始当初の背景

私たちの細胞ゲノム中には転移因子が全ゲノムの～45%も存在しており、近年これらの転移因子が細胞のストレス応答や細胞分化など細胞の多様な表現型の発現に寄与していることが明らかとなってきている。転移因子の中でも内在性レトロエレメント LINE-1 (Long interspersed element-1) は全ゲノムの約 17%を占めており、現在でも約 100 コピーの LINE-1 はゲノム中を動き回り得る能力を保持し、ゲノム構造の再編成、および真核細胞生物のゲノム進化において重要な役割を果たしてきたと考えられている。LINE-1 は 2 つの ORF (ORF1 と ORF2) をコードしており、ORF1 は RNA シャペロン活性を持ち自身の RNA との複合体形成に要求され、ORF2 はエンドヌクレアーゼ活性、および逆転写酵素活性を持つことから、LINE-1 の発現自体がゲノム不安定性に寄与するものと考えられている。LINE-1 発現の制御異常は発がん過程の促進に寄与することが示唆されているが、LINE-1 の転移自体が実際ががん化を促進させているのか、さらに選択的に細胞のがん化を誘導し得るのかは全く明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では DNA 損傷ストレスにより、LINE-1 転移が特定のゲノム領域、具体的にはがん抑制遺伝子群において指向的に誘導され、細胞がん化という一定の細胞表現型への形質変化に寄与し得るのかを明らかにする。すなわち、“①特定の刺激、②LINE-1 転移部位、③細胞表現型、という 3 者の間に直接的な対応関係が存在するのか？”という問いについて明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では①LINE-1 の挿入部位の指向性、および ②LINE-1 の選択的挿入がもたらす細胞形質変化を明らかにするために、DNA 損傷誘導性の LINE-1 挿入部位と発がんとの関連について解析を行う。これまでの研究において申請者は LINE-1 タンパクが DNA 損傷に応答して p53 や NFκB 標的遺伝子のプロモーター領域に集積することを明らかにしており、また人工的に LINE-1 タンパクを特定のクロマチン領域にリクルートすることにより、当該領域への LINE-1 の新規挿入が惹起されることを明らかにしている。上記の事象に加えて、本研究で提示を目指す、“DNA 損傷誘導性の選択的 LINE-1 挿入による発がん機構”を明らかにするために以下 2 つの実験系を稼働させた。

① DNA 損傷誘導時の LINE-1 新規挿入部位の網羅的解析。

LINE-1 挿入部の網羅的解析には LINE-1 転移成立時にブラストサイジン (Bsd) 耐性をもたらず LINE-1 転移レポーター (pL1-Bsd) を使用する。X 線照射により誘導された Bsd 耐性コロニーのゲノム DNA について次世代シーケンサーにより網羅的に新規挿入部位を同定することで、各種転写因子標的遺伝子と LINE-1 挿入部位の重複度について解析を行う。この際、既に明らかにしている DNA 損傷で誘導される LINE-1 タンパク質のゲノム上での分布パターンから、LINE-1 新規挿入部位として、p53 の標的となるがん抑制遺伝子群の割合が増加することが期待され、DNA 損傷誘導性の LINE-1 転移の細胞がん化促進への積極的な寄与を明らかにできる。

② LINE-1 転移を介したがん遺伝子誘導性細胞老化の解除。

X 線による DNA 損傷誘導では、アポトーシス、一過的細胞周期停止、および細胞老化など多様な細胞応答が誘導されるため、そのような細胞群を対象として、LINE-1 挿入部位と細胞表現型の関連付けを行うのは複雑度が高く困難である。従って、LINE-1 選択的挿入の発がん過程への関与を明らかにするために、2 段階発がんモデル (1. がん遺伝子誘導性細胞老化の惹起、2. 発がんプロモーターによる刺激) により細胞がん化を促進する。即ち、1. として Ras がん遺伝子 (Ras-V12G) によるがん遺伝子ストレスによって DNA 損傷応答シグナル伝達経路を活性化し、がん抑制機構として機能する細胞老化 (恒久的な細胞周期停止) を誘導する。次に 2. として非遺伝毒性発がん促進因子である TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) の反復処理により、Ras がん遺伝子誘導性の細胞老化は解除され (細胞老化シグナル非応答性の獲得)、細胞増殖を再開する。

申請者の研究グループではマウス個体、および培養細胞への TPA 処理が LINE-1 の転移を強く誘導することを報告しており (Okudaira et al. 2011, Cancer science)、本研究では、Ras-G12V 誘導性老化細胞の TPA 処理により増殖を再開した細胞群を取得し、LINE-1 新規挿入部位について明らかにする。また LINE-1 転移により破壊された遺伝子については、発現ベクターによる相補を行い、細胞老化状態が再誘導されることを確認することで、LINE-1 挿入の直接的な細胞老化解除への寄与を裏付ける。さらに上記の過程においては、細胞老化の解除に寄与する遺伝子が

無作為に抽出されるため、未知のがん抑制遺伝子群の同定も期待される。一方で、LINE-1 転移が陽性且つ、細胞老化の解除された細胞群が得られない場合には、LINE-1 転移反応過程で誘導される DNA 二重鎖切断部位を網羅的に解析し、LINE-1 転移過程での損傷遺伝子群を探索することにより、LINE-1 の発がん過程への寄与を明らかにする。

4. 研究成果

① DNA 損傷誘導時の LINE-1 新規挿入部位の網羅的解析。

LINE-1 転移レポーター (pL1-Bsd) を使用し、DNA 損傷による LINE-1 転移頻度の顕著な増加を認めた。さらに X 線照射により誘導された Bsd 耐性コロニーのゲノム DNA に対し、Bsd 遺伝子に対し設計したビオチン化プライマーを用いて、nrLAM (nonrestrictive linear amplification-mediated PCR) -PCR を行い、次世代シーケンサーにより網羅的に新規挿入部位を同定した。すでに解析済みの X 線照射後の LINE-1 タンパク質結合ゲノム領域との比較を行ったが、新規 LINE-1 挿入部位の数が 100 部位以下 (その内遺伝子近傍領域は 10%以下) と少なく、両ゲノム領域の重複度について統計的に有意な差を見出すためには、さらに多くの LINE-1 挿入部位を得る必要があり、今後、実験回数を重ね、再解析を行う予定である。

② LINE-1 転移を介したがん遺伝子誘導性細胞老化の解除。

テトラサイクリン誘導性活性型 Ras 発現細胞 (HT1080+TRE-GFP-Ras) を作成し、ドキシサイクリン添加後、2 日時点ではほぼすべての細胞で細胞老化が誘導されることを確認した。次に HT1080+TRE-GFP-Ras 細胞に対し、pCMV-Bsd (コントロール)、あるいは pL1-Bsd (LINE-1 転移誘導) を導入後にドキシサイクリンにより、細胞老化を誘導し、ドキシサイクリン、および Bsd 存在下において、1 か月間の培養を行った。その結果、コントロールの pCMV-Bsd 導入細胞群ではコロニーの形成は見られなかったが、pL1-Bsd 導入群では GFP 陽性の Bsd 耐性コロニーが再現良く複数得られた。①と同様に GFP 陽性かつ Bsd 耐性の細胞について LINE-1 の挿入部位を解析したが、同定された LINE-1 挿入部位が少なく、Ras がん遺伝子による細胞老化解除に寄与した遺伝子群、および遺伝子ネットワークの同定に至らなかった。また今回は pL1-Bsd の導入のみで細胞老化が解除されたクローンが得られたが、マウスでの 2 段階発がんモデルでプロモーターとして用いられる TPA 処理の追加が、LINE-1 転移による細胞老化解除誘導に対し相乗的な効果をもたらすのかについても検証する必要がある。今後はさらに解析サンプルを蓄積し、LINE-1 挿入部位と細胞老化解除の関連を明らかにするとともに、LINE-1 が誘導する DNA 損傷部位についても網羅的な解析を進め、LINE-1 の新規挿入、LINE-1 転移過程における遺伝子変異誘導の両可能性について検証してゆく。

③ LINE-1 APEX による LINE-1 複合体相互作用因子の同定。

研究を進める過程で、これまでに行ってきた LINE-1 タンパク質を標的とした ChIP (クロマチン免疫沈降) や co-IP (免疫共沈) による解析は非特異的な結合による影響を大きく受けていることが示唆された。そのため、近年急速に開発が進んでいる近位依存性ビオチン化標識法を利用し、LINE-1 が結合するタンパク質、DNA、および、RNA を同定することを試みた。そのために LINE-1 ORF1 タンパク質に APEX (Engineered ascorbate peroxidase) を融合したコンストラクト (pL1-APEX-Bsd) を作成し、ORF1 タンパク質が自身の RNA 近傍に存在し、複合体を形成していることを示唆するデータが得られた。現在、pL1-APEX-Bsd を用いて、X 線照射後の LINE-1 複合体相互作用生体分子 (ゲノム DNA、タンパク質、RNA) について解析を進めており、LINE-1 複合体の局在・相互作用因子のより高精度なデータの取得が期待できる。

現在、以上のデータについて、さらに解析を追加し論文の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenta Iijima, Yutaka Kondo, Yukihiro Ishizaka
2. 発表標題 The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotransposon
3. 学会等名 Abcam Epigenetics Conference and 14th Asia Epigenome Meeting / 3rd Taipei Epigenetics and Chromatin Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島健太、石坂幸人
2. 発表標題 内在性レトロエレメントLINE-1の選択的転移による発がん制御機構
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島健太、近藤豊、石坂幸人
2. 発表標題 内在性レトロエレメントLINE-1のDNA損傷による転移活性化機構
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------