

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07977

研究課題名(和文) 大腸癌進展に関与するエピゲノムおよびlncRNAの同定と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of epigenetic alteration and lncRNA involved to colon cancer development

研究代表者

新沼 猛 (Ninuma, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60708113

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)：本研究においてはTCGAデータなどのデータベースを用いて、消化管癌の正常と腫瘍部におけるlncRNAの発現比較を行った。様々な抽出方法により数個のlncRNAに着目し解析を行った。特にlncXにおける解析においては、そのノックダウンが腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する事や遺伝子発現マイクロアレイ解析やqRT-PCR解析、ウエスタンブロット法により細胞周期関連遺伝子群の発現が低下することが明らかとなった。細胞周期遺伝子群の発現を制御するCDEドメインを用いたレポーターアッセイからはlncXがDREAM complexによる発現抑制ではなく、転写活性化に関連してい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

本研究では消化管がんの増殖を抑制するノンコーディングRNA分子を発見しています。この分子を抑制することで腫瘍細胞の細胞死が誘導される事や、細胞分裂に関連する遺伝子群を制御していることが明らかとなりました。詳細なメカニズムについてはこれからさらに解析する必要があるが、この分子は正常では発現が低いために、この分子を標的とする治療はがんに特異的なものになる可能性があると考えられます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the expression of lncRNA in gastrointestinal tumors by using publicly available TCGA database and compared that in normal tissues or tumors. We tested several methods to select the prospective lncRNA genes and analyzed the function of selected lncRNAs. Among them, we assessed the function of lncX gene. Depletion of lncX by using specific siRNA reduced cell viability and induced apoptosis in several cancer cells. To investigate the effects on gene expression profiles by knockdown of lncX, we performed gene expression microarray analysis. Accordingly, we found that a number of genes regulating cell cycle were significantly downregulated. We confirmed the reduction of AURKA, cyclin B1, and survivin. Then, we performed luciferase reporter assay by using promoter of AURKA gene. We assessed the effects of lncX with WT CED or Mut CED reporter. Consequently, results of reporter assay suggest that lncX is involve to the activation of cell cycle genes.

研究分野：消化器がん

キーワード：消化器がん エピジェネティクス noncoding RNA

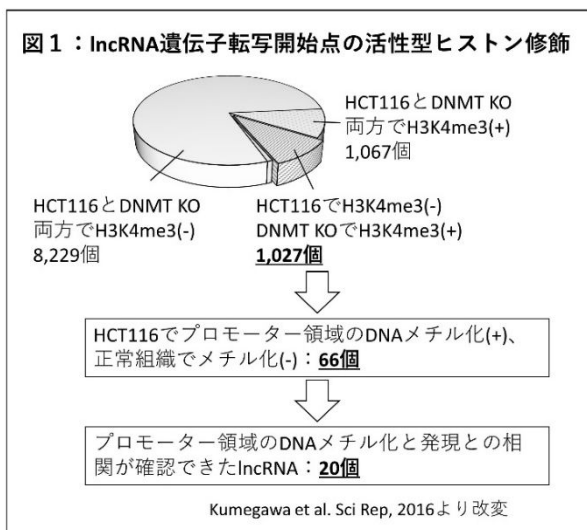
1. 研究開始当初の背景

現在、消化管癌の治療として内視鏡的あるいは外科的切除、化学療法、放射線治療が行われており、進行度や病期により最適な治療法が決定されている。消化管内視鏡などの技術進歩により早期発見・早期治療による根治が望める症例は確実に増えているが、切除不能例や遠隔転移例の治療成績向上はいまだに解決すべき課題である。そのためにも上皮間葉転換、浸潤、転移などの分子機構のさらなる解明が望まれている。

近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA が、腫瘍の発生および進展に重要な役割を担うことが明らかにされつつある。これまでに我々は、消化管腫瘍における miRNA や lncRNA 発現とエピゲノム異常との関連を解析することで、診断・治療への応用を目指してきた。まず miR-196a と lncRNA である HOTAIR の過剰発現が、消化管間質腫瘍(GIST)の悪性化の一因であり、重要な診断・治療標的となりうることを明らかにした(Cancer Res, 2012)。また GIST の進展・転移・再発に関わる複数の miRNA を同定した(PLOS ONE, 2015; Oncol Lett, 2017)。

また申請者らは、癌エピゲノムがきわめて多数の lncRNA 発現制御に関わることを見いだしている。DNA メチル化酵素 DNMT1、DNMT3B をノックアウトした大腸癌 HCT116 細胞を用いて、lncRNA 遺伝子転写開始点の転写活性型ヒストン修飾(ヒストン H3K4me3)を解析した結果、DNA 脱メチル化が 1000 種類以上の lncRNA の発現変化につながることを明らかにした(Sci Rep, 2016; 図1)。一方、プロモーターCpG アイランドのメチル化によって発現変化が説明できた lncRNA はそのうちの一部であった。このことはエピジェネティックな lncRNA 発現制御の複雑さを示唆しており、エピゲノムを標的とした癌薬物治療を考える上でも明らかにすべき重要な課題と考えられた。

また、近年スーパーエンハンサーの概念が提唱され、癌化に関わるスーパーエンハンサーの存在や、エンハンサーを標的とした癌治療法が注目されている。エンハンサー領域の標識としてヒストン H3 リジン 27 のアセチル化(H3K27ac)が知られているが、大腸癌細胞のスーパーエンハンサー領域は H3K27ac と DNA メチル化が共存した bivalent 状態にあることが報告された。しかしながら、プロモーター領域以外の DNA メチル化や癌特異的エンハンサーが lncRNA の発現制御にどのように関わっているか、また癌の発生と進展においてどのような意味があるのかは不明な点も多い。



2. 研究の目的

我々は、消化管腫瘍における non-coding RNA とエピゲノム異常との関連を解析しており、消化管腫瘍細胞の遺伝子発現アレイと次世代シーケンサーを用いた ChIP シーケンスのデータを統合し、癌関連 lncRNA の同定解析などを行っている。この結果から、エピゲノムデータとトランスクリプトームデータの統合解析は癌関連 non-coding RNA の同定に有用な手法であると考えられた。これに DNA メチル化とヒストン修飾のクロストークやスーパーエンハンサーなど新たな概念を統合することで、大腸癌の進展、特に浸潤・転移に関わる non-coding RNA の同定に繋がると考えられた。

エンハンサーの指標となるエピジェネティックマークとして H3K4me1、H3K27ac が知られ、シーケンズ解析から細胞特異性を規定する領域であることが明らかにされた。また、大腸癌の Dukes 分類とスーパーエンハンサーの関連を示唆する報告があるが、non-coding RNA

制御については言及していない。大腸癌と関連する lncRNA は近年報告が相次いでおり、発展が期待される研究分野である。本研究は、大腸癌の臨床病理学的因子と相関するエピゲノム変化を指標とすることで、悪性度・転移に関連する non-coding RNA を同定し、診断・治療法開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

- ・大腸癌臨床検体のエピゲノム・トランスクリプトームデータの取得と解析を行う。
- ・癌の進展や転移と相関するエピゲノム異常を有する lncRNA を抽出する。
- ・同定した lncRNA の機能および相互作用する分子を明らかにし、治療標的としての有用性を明らかにする。
- ・ lncRNA 発現とエピゲノム異常のバイオマーカーとしての有用性を検証する。

大腸癌臨床検体のエピゲノム・トランスクリプトームデータの解析

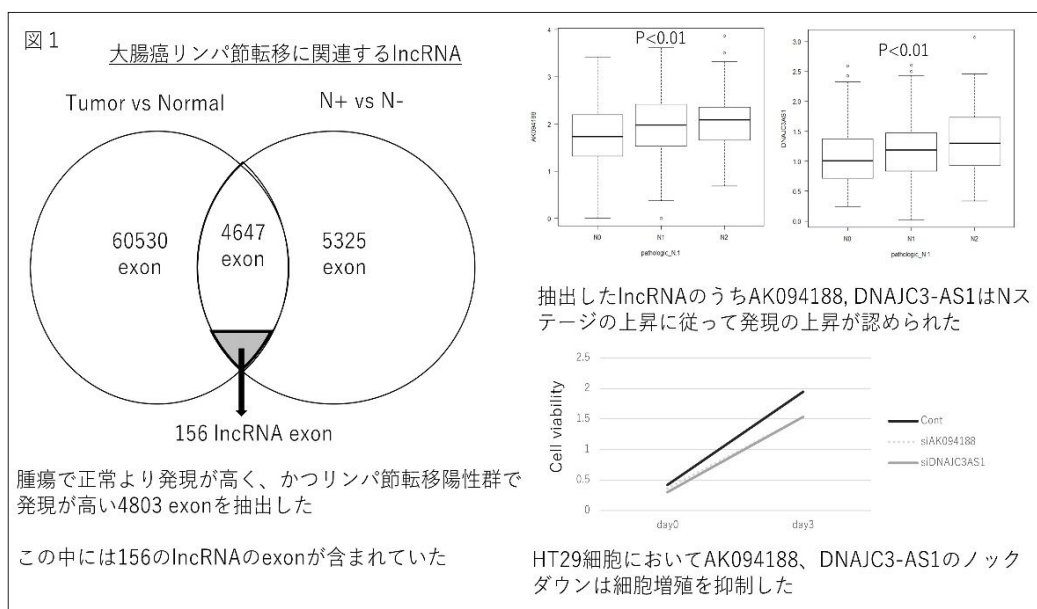
内視鏡的あるいは外科的に切除された大腸腫瘍組織について Infinium Methylation EPIC BeadChip を用いて網羅的な DNA メチル化解析を行い、バイサルファイトパイロシーケンスで検証する。転写開始点 (H3K4me3) とエンハンサー領域のヒストン修飾 (H3K4me1、H3K27ac) は、クロマチン免疫沈降シーケンスにより解析する (ChIP-seq)。また遺伝子発現を RNA-seq あるいはマイクロアレイで解析する。

癌の進展・転移と関連するエピゲノム異常・ lncRNA 発現変化の統合解析

前癌病変、粘膜内癌、リンパ節転移の各病期の DNA メチル化やヒストン修飾が変化する領域を抽出する。また発現プロファイルデータから、各病期で発現変化する lncRNA を抽出する。これらを統合解析し、癌の進展や転移と相関するエピゲノム変化と lncRNA を同定する。とくに本研究では特異的なエンハンサーを同定し、その近傍の lncRNA の発現変動に着目する。同定したエンハンサー領域の活性をレポーターアッセイで検証し、さらに CRISPR/Cas9 システムでエンハンサー領域に変異を導入して lncRNA 発現への影響を検証する。

同定した lncRNA の機能解析

同定した lncRNA を大腸癌細胞株で過剰発現あるいはノックダウンし、増殖、遊走、浸潤、アポトーシス、細胞周期などに与える影響を解析する。また遺伝子発現変化をマイクロアレイによって解析し、GO、GSEA、pathway 解析などにより機能を解析する。また大腸癌細胞株を用いて lncRNA の安定発現あるいは安定ノックダウン株を作成し、ヌードマウスに移植して、in vivo での腫瘍形成能、浸潤・転移能に与える影響を検証する。



lncRNAと相互作用する分子の探索

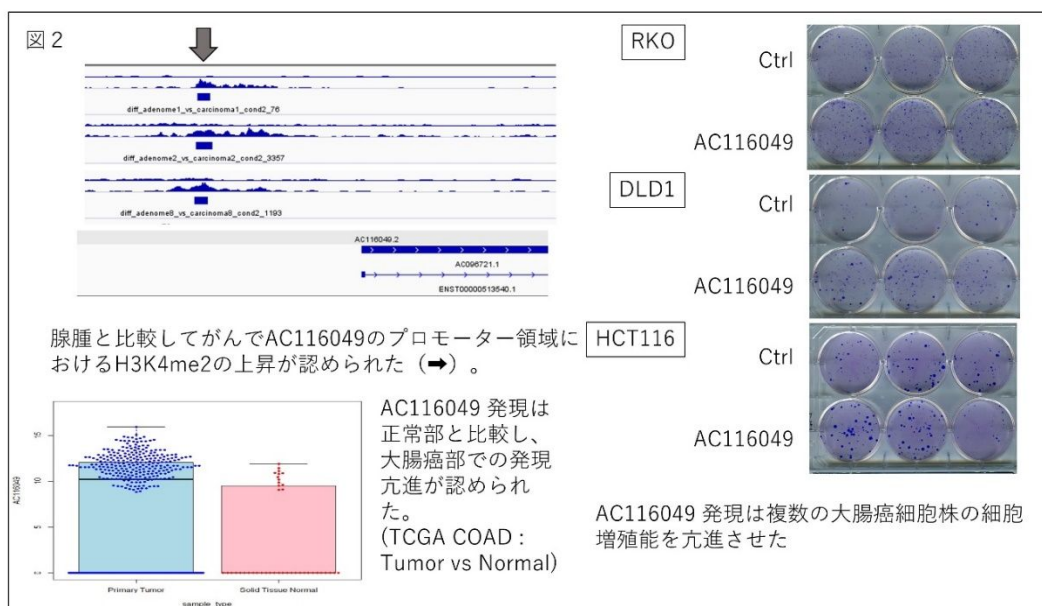
RNA プルダウン法により RNA・タンパク複合体を抽出し、質量分析法で結合タンパクを同定する。また miRNA に対する competing endogenous RNA (ceRNA) としての機能している可能性を考え、lncRNA の発現変化に伴って発現変動する miRNA を網羅的に探索する。

臨床病理学的所見との比較検討によるバイオマーカー検証

同定した領域のヒストン修飾・DNA メチル化・lncRNA 発現と、TNM ステージ、分化度、浸潤、転移、予後などの臨床病理学的因子との相関を、多数の臨床検体や公開データベースを用いて解析し、バイオマーカーとしての有用性を評価する。

4. 研究成果

大腸癌進展に伴う lncRNA の探索の始めとしてまず、TCGA の大腸癌遺伝子エクソン発現データを用いた解析を行った。正常部と腫瘍部の遺伝子発現を比較し、腫瘍部で発現の高い遺伝子抽出。更にリンパ節転移の有無で発現比較を行い、リンパ節転移陽性群で発現が亢進している遺伝子群を抽出した。それぞれの遺伝子群には 60530 エクソン、5325 エクソンが含まれており、共通するエクソンは 4803 個存在していた。その中には 156 の lncRNA のエクソンが含まれており、それらの lncRNA の中から、複数のエクソンを有する lncRNA、リンパ節転移と有意に相関するも



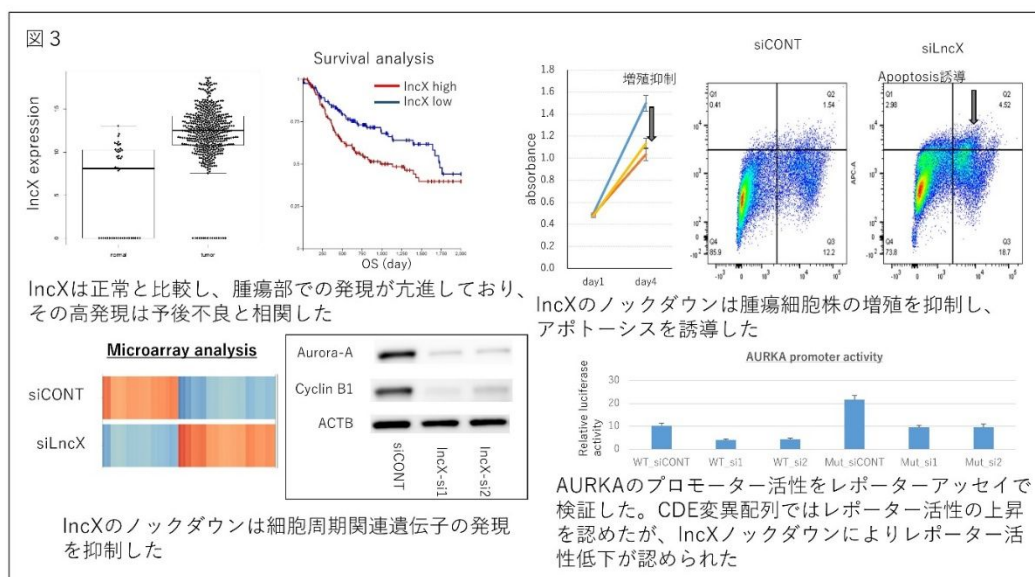
のを選択した。その中から AK094188、DNAJC3-AS1 に着目して大腸癌細胞株を用いた機能解析を行った。結果として HT29 細胞において AK094188、DNAJC3-AS1 のノックダウンは細胞増殖を抑制することが確かめられた (図 1)。これらの lncRNA は大腸癌リンパ節転移に関連する lncRNA 候補となり得ると考えられた。

次に大腸腺腫から大腸癌への進展に関連する lncRNA についてエピゲノムデータから探索を行った。大腸腺腫とその対となる大腸癌の H3K4me3 の ChIP-seq データ (GSE66216) を取得し、それぞれのシーケンスリードを Bowtie2 で hg38 へとマッピングし、MACS2 でピークコールを行い、MACS2 bdgdiff で腺腫と癌で異なるピークを検出した。解析した lncRNA の内、複数の検体において癌で腺腫に比較してプロモーター領域の H3K4me2 が上昇している lncRNA を抽出した。その中から AC116049 を選択し更なる解析を行う事とした。TCGA 大腸癌遺伝子発現データを用いた解析では AC116049 の発現は大腸癌部で正常部に比較して亢進していることが確かめられた。AC116049 をクローニングし発現ベクターに導入後、複数の大腸癌細胞株において AC116049 の発現が細胞増殖に与える影響を検討したところ、RKO、DLD1、HCT116 細胞において AC116049 の発現が細胞増殖を亢進させることが明らかとなった。以上から AC116049 は大腸腺腫から大腸癌への進展に関連する lncRNA 候補となり得ると考えられた (図 2)。

さらに TCGA のデータセットを用い、腫瘍部で正常より発現亢進が認められ、高発現と予後不良が相関する lncRNA を 8 遺伝子抽出した。スクリーニングの結果抽出した lncRNA の中から lncX

に着目し機能解析を行った。IncX のノックダウンにより細胞増殖が抑制され、ノックダウン 72 時間後には複数の細胞株でのアポトーシス誘導作用が認められた。ノックダウンによる遺伝子変化を網羅的に解析するために遺伝子発現マイクロアレイを行い、変動遺伝子群の GO 解析、Pathway 解析を行ったところ IncX のノックダウンは細胞周期群の遺伝子を変動させることが明らかとなった。

IncX ノックダウン後の qRT-PCR では CyclinB1、AURKA、survivin などの細胞周期関連遺伝子群の低下が認められた。細胞周期に関連する遺伝子群はその発現時期が周期毎に厳密に制御されており、AURKA はプロモーター上の CDE、CHR ドメインと遺伝子発現を抑制する転写因子複合体である DREAM complex による制御を受けることが知られている。そこで AURKA のプロモーター領域を pGL3 basic に組み込み CDE ドメインの WT、Mut を作成し IncX をの影響を調べる目的にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。CED WT においては IncX のノックダウンによりレポーター活性の低下が認められた。一方 CDE Mut においては DREAM complex による抑制が機能せず、CDE WT に比べレポーター活性の上昇が認められたが、IncX のノックダウンレポーター活性の低下を認めた。よって IncX は細胞周期遺伝子群の転写活性化に関連すると考えられた(図 3)



結果：本研究においては、大腸癌遺伝子発現、エピゲノムデータから、消化管癌の正常と腫瘍部における IncRNA の発現比較を行った。様々な抽出方法により数個の IncRNA に着目し解析を行った。大腸癌のリンパ節転移の有無による遺伝子発現比較解析により、AK094188、DNAJC3-AS1 が大腸癌リンパ節転移に関連する IncRNA 候補として抽出された。大腸腺腫・大腸癌のプロモーター領域における H3K4me2 の解析からは AC116049 が腺腫から癌進展に関連する IncRNA 候補として抽出された。また、IncX における解析においては、そのノックダウンが腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する事や遺伝子発現マイクロアレイ解析や qRT-PCR 解析、ウエスタンブロット法により細胞周期関連遺伝子群の発現が低下することが明らかとなった。細胞周期遺伝子群の発現を制御する CDE ドメインを用いたレポーターアッセイからは IncX が DREAM complex による発現抑制ではなく、転写活性化に関連していることが示唆された。今後は IncX の作用機序の更なる解明を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新沼 猛
2. 発表標題 UHRF1 depletion and HDAC inhibition synergistically reactivate epigenetically silenced genes in colorectal cancer cells.
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新沼 猛
2. 発表標題 UHRF1 depletion and HDAC inhibition synergistically reactivate epigenetically silenced genes in colorectal cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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	鈴木 拓 (SUZUKI Hiromu) (20381254)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

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