

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15220

研究課題名(和文)慢性炎症から発がんに関わる新規長鎖ncRNAの機能および分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Revealing the function and the molecular network of a novel lncRNA associated with gastric cancer and gastritis

研究代表者

北嶋 洋志 (Kitajima, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90777971

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)：ヘリコバクターピロリ菌感染による慢性胃炎は胃がんの進展に影響する。近年長鎖 non-coding RNA (lncRNA) とがんとの関連が注目されるが、胃がんの発症において lncRNA の役割は不明な点が多い。慢性胃炎・胃がん関連 lncRNA として同定した TM4SF1AS1 による腫瘍形成に関連したパスウェイや分子ネットワークおよび分子機序を明らかにするため、TM4SF1AS1 の結合タンパク質を網羅的に検索した。ストレス顆粒関連タンパク質を複数同定し、TM4SF1AS1 による顆粒構造の形成促進を見出した。また TM4SF1AS1 がストレス応答性 MAPK を介するアポトーシスを抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで lncRNA 研究において慢性炎症とがんに関わる lncRNA の報告は少なく、TM4SF1AS1 のようにストレス顆粒と発がんを結びつける lncRNA の報告はない。また、TM4SF1AS1 の阻害は胃がんのみならず他のがん細胞においても細胞増殖の抑制効果があることを確認している。TM4SF1AS1 のがん遺伝子的機能とその作用機序は、様々ながんに共通する可能性があり、新たながん治療標的分子となりうるものが今後期待される。以上より、本研究の成果は学術的にも社会的にも意義は高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancers (GCs) develop through Helicobacter Pylori-induced chronic gastritis. The involvement of long noncoding RNAs (lncRNAs) in inflammation-related carcinogenesis remains unclear. We have identified a lncRNA TM4SF1AS1, which promotes GC cell proliferation and tumor formation. To unravel pathways and molecular networks associated with TM4SF1AS1 in the tumorigenesis, we comprehensively screened a series of TM4SF1AS1-binding proteins. We identified many stress granule-associated molecules and found that TM4SF1AS1 promoted stress granule-like body formation in GC cells. Moreover, TM4SF1AS1 inhibited apoptosis mediated by stress-responsive MAPK. It suggested that TM4SF1AS1 might be a lncRNA link between tumorigenesis and stress granule and a potential therapeutic target.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胃がん 長鎖 non-coding RNA ストレス顆粒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は様々な臓器において発がんに関連しており、その分子機構の解明はリスク予測・超早期診断や予防方法の開発につながる事が期待される。また近年、タンパク質をコードしない長鎖 non-coding RNA (lncRNA)が、様々な生命現象、疾患、中でも腫瘍の発生や悪性度などに関わることが明らかにされつつある。

申請者は、これまで慢性胃炎から胃がんの発生に関わる lncRNA の同定を試みてきた。まず健常者の胃粘膜と胃がん患者の非がん部背景粘膜を対象に、転写活性化マーカーであるヒストン H3 リジン 4 トリメチル化(H3K4me3)を、クロマチン免疫沈降シーケンズ(ChIP-seq)により解析した。数万の遺伝子プロモーター領域における H3K4me3 レベルを網羅的に解析した結果、胃がん高リスク群の胃粘膜において転写が活性化する lncRNA 遺伝子を複数同定した。その中でも TM4SF1AS1 は胃がん細胞において高頻度に過剰発現し、細胞増殖、遊走・浸潤能を促進することから、がん遺伝子的に機能する lncRNA であると考えられた。また TM4SF1AS1 のノックダウンが免疫応答遺伝子の発現を抑制したことから、TM4SF1AS1 が何らかの免疫反応に関与する可能性が示唆された。さらに TM4SF1AS1 と結合するタンパクとして、転写制御・翻訳調節・RNA 輸送・ストレス応答などへの関与が知られる PUR- α 、PUR- β および YB1 を RNA pull-down 法により同定した。PUR- α 、PUR- β は一本鎖 DNA および RNA に結合するタンパクであり、YB1 と相互作用して p53 による Bax の転写制御に関与すること、PUR- α と PUR- β が Sp3 と共同し骨格筋の β ミオシン重鎖の発現制御に関わることなど、転写制御への関与が知られている(Kim K et al. J Biol Chem, 2008; Ji J et al. Mol Cell Biol, 2007)。これらの知見から TM4SF1AS1 が転写関連タンパクをリクルートし複合体を形成して、発がんや免疫応答の遺伝子の転写制御に関わるという仮説を立てるに至った。

これまでの解析から、TM4SF1AS1 が胃がん以外にも膵がん、乳がん、肝がんなど様々ながん細胞で発現亢進していること、そして TM4SF1AS1 のノックダウンが増殖を抑制することを見いだしている。このことから TM4SF1AS1 は様々ながん種において治療標的分子となりうる可能性が期待される。この知見をより確実なものにするためには、TM4SF1AS1 の機能、特に TM4SF1AS1 と相互作用する分子とシグナルネットワークを網羅的に明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

慢性胃炎から進展する胃がんをモデルに、健常者と胃がん患者の胃粘膜におけるエピゲノムの網羅的解析から、胃がんリスクと強く関連する lncRNA として TM4SF1AS1 を同定した。これまでの解析から、TM4SF1AS1 は胃がんで高発現し、がん遺伝的に機能すること、複数のタンパクと複合体を形成し免疫応答に関与することが示唆された。本研究では、がん予防・診断・分子標的治療法の開発につなげることを目指し、新規の慢性炎症・胃がん関連 lncRNA として同定した TM4SF1AS1 の機能、相互作用因子、関連するシグナルパスウェイや分子ネットワークを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン誘導系(tet-on) shRNA による TM4SF1AS1 安定ノックダウン胃がん細胞株の樹立とマウスゼノグラフトモデルの作成

TM4SF1AS1 に対する 2 種の shRNA を設計・構築したテトラサイクリン誘導系 (tet-on) レンチウイルスベクターからレンチウイルス粒子を作成した。TM4SF1AS1 を高発現する胃がん細胞株にレンチウイルス粒子を感染させ、ピューロマイシンで選抜した細胞プールをノックダウン安定発現株とした。樹立した細胞株をヌードマウス(BALB/cAJcl-nu)の皮下に移植し、通常食餌群(対照群)とドキシサイクリン含有食餌群(TM4SF1AS1 の shRNA 誘導ノックダウン)に分け、TM4SF1AS1 ノックダウンによる *in vivo* での経時的な腫瘍形成に与える影響を評価した。

(2) 臨床胃がんにおける TM4SF1AS1 発現の解析

臨床がんにおける TM4SF1AS1 の重要性を明らかにするため、胃がん検体を用いて発現を解析した。検体は新学術領域研究コホート生体試料支援プラットフォームから検体提供の支援を獲得した。また The Cancer Genome Atlas (TCGA)や the Genotype Tissue Expression project (GTEx)に公開された RNA-seq データも活用した。

(3) ChIRP-MS による TM4SF1AS1 の結合タンパク質の網羅的同定

ChIRP (Chromatin isolation by RNA purification)法は、標的 RNA に対するビオチン標識タイリングプローブを用いたキャプチャーハイブリダイゼーション法の一種で、標的 RNA と細胞内在的に相互作用するゲノム DNA、RNA およびタンパクを網羅的に解析する手法である(Chu C et al. Mol Cell, 2011)。TM4SF1AS1 に対するビオチン標識タイリングプローブを設計し、ChIRP 法により回収した RNA に TM4SF1AS1 が濃縮されるか否かで、本実験系の確立の目安とした。さらに ChIRP 法と質量分析を組み合わせた ChIRP-MS を確立し、TM4SF1AS1 安定発現胃がん細胞株を用いて、TM4SF1AS1 結合タンパク質を網羅的に同定した。同定した個別のタンパク質と

TM4SF1AS1 との相互作用については、RNA 免疫沈降法により検証した。

4. 研究成果

TM4SF1AS1 の治療標的としての評価を行うために、テトラサイクリン誘導系 (tet-on) shRNA による TM4SF1AS1 安定ノックダウン胃癌細胞株を樹立し、マウスゼノグラフトモデルを作成した。TM4SF1AS1 を shRNA 誘導ノックダウンしたマウスゼノグラフトでは、腫瘍の縮小が認められた。一方 TM4SF1AS1 過剰発現株を用いたマウスゼノグラフトモデルでは、既に TM4SF1AS1 の過剰発現により腫瘍形成が促進されることを確認していることから、TM4SF1AS1 は治療標的分子の候補となりうるということが *in vivo* での検証で明らかとなった。

胃癌臨床検体における TM4SF1AS1 の発現については、新学術領域研究コホート生体試料支援プラットフォームによる検体試料の支援を受け、提供された組織から RNA を抽出し qRT-PCR により解析した。また TCGA および GTEx から胃癌の RNA-seq データを取得し解析した。その結果、正常組織に比べ胃癌組織で TM4SF1AS1 の発現が有意に亢進していることが明らかとなった。

TM4SF1AS1 による発がんの分子的な作用機序や関連するシグナルパスウェイや分子ネットワークを明らかにするために、TM4SF1AS1 を標的にした ChIP-MS を行い、TM4SF1AS1 の結合タンパク質の網羅的探索を試みた。結果として 143 個のタンパク質のリストが得られ、Gene Ontology 解析によりリボソームタンパク質や翻訳開始因子などの特徴が見られた。これはストレス下で細胞質に形成され、非膜性構造体として知られるストレス顆粒の特徴に類似していた。またストレス顆粒の構成因子として知られるタンパク質、がん遺伝子やアポトーシスに関わるタンパク質が複数含まれていた。ストレス顆粒は多くのタンパク質と RNA から構成される。ストレス時に引き起こされた翻訳抑制によってリボソームから mRNA が解放されともに顆粒内に隔離されることが知られる。我々は同定したタンパク質の中からストレス顆粒形成に重要な役割をもつ G3BP ファミリーの G3BP2 に着目し、TM4SF1AS1 とストレス顆粒との関連を検証した。TM4SF1AS1 過剰発現株を用いて G3BP2 の免疫蛍光染色を行い、TM4SF1AS1 の過剰発現はストレス顆粒様構造体の形成を促進することを見出した。一方 TM4SF1AS1 のノックダウンでは顆粒様構造体が減弱した。以上より、TM4SF1AS1 はストレス顆粒様構造体の形成促進に関与することが示唆された。

またストレス顆粒は、ストレス応答性 MAPK シグナルを介するアポトーシスを抑制する (Arimoto K et al. Nat Cell Biol, 2008)。そこで、TM4SF1AS1 のノックダウンによる細胞増殖の抑制効果が、細胞周期またはアポトーシスに起因するものかを検証した。まずは TM4SF1AS1 による胃癌細胞の細胞周期への影響を検証するため、テトラサイクリン誘導系 (tet-on) shRNA による TM4SF1AS1 のノックダウンを行い、Propidium Iodide (PI) で染色しフローサイトメーターで細胞周期を解析した。その結果、TM4SF1AS1 のノックダウンにより subG1 期にある細胞の増加がみられた。引き続き同様にノックダウンした細胞をアネキシンVおよび PI で二重染色し、フローサイトメーターによるアポトーシス解析を行った。TM4SF1AS1 のノックダウンでは、後期アポトーシスを引き起こしている細胞が増加した。従って、TM4SF1AS1 ノックダウンによる細胞増殖の抑制は、アポトーシスによるものであり、TM4SF1AS1 がアポトーシスを抑制することが示唆された。さらに TM4SF1AS1 ノックダウンによるストレス応答性 MAPK の活性化への影響をウェスタンブロットにて検証した。その結果、TM4SF1AS1 のノックダウンにより p38 のリン酸化レベルが亢進した。これらの結果から、TM4SF1AS1 はストレス応答性 MAPK シグナルの活性化を介したアポトーシスを抑制する可能性が考えられた。

以上より、TM4SF1AS1 は慢性炎症・胃癌関連の新規 lncRNA として、ストレス顆粒様構造体を介してがん細胞のストレス耐性を増強し、アポトーシスによる細胞死に対し抑制的に作用することが示唆された。本研究成果は、当初の作業仮説を大きく覆す結果に至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Maruyama R, Nishiyama N, Ohtani H, Sudo G, Toyota M, Sasaki H, Yamamoto E, Kai M, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dual EZH2 and G9a inhibition suppresses multiple myeloma cell proliferation by regulating the interferon signal and IRF4-MYC axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discov.	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-020-00400-0.	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 Yorozu A, Yamamoto E, Niinuma T, Tsuyada A, Maruyama R, Kitajima H, Numata Y, Kai M, Sudo G, Kubo T, Nishidate T, Okita K, Takemasa I, Nakase H, Sugai T, Takano K, Suzuki H.	4. 巻 111
2. 論文標題 Upregulation of AEBP1 in endothelial cells promotes tumor angiogenesis in colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1631-1644.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14360.	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 Niinuma T, Kitajima H, Kai M, Yamamoto E, Yorozu A, Ishiguro K, Sasaki H, Sudo G, Toyota M, Hatahira T, Maruyama R, Tokino T, Nakase H, Sugai T, Suzuki H.	4. 巻 11
2. 論文標題 UHRF1 depletion and HDAC inhibition reactivate epigenetically silenced genes in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Epigenetics.	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0668-3.	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 Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Toyota M, Hatanaka Y, Igarashi T, Kobayashi JI, Ogi K, Dehari H, Miyazaki A, Yorozu A, Yamamoto E, Idogawa M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Hiratsuka H, Suzuki H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-018-0893-2.	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 Wakasugi H, Takahashi H, Niinuma T, Kitajima H, Oikawa R, Matsumoto N, Takeba Y, Otsubo T, 他10名, Sasaki H, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Sasaki S, Tanaka Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Yamamoto H, Tokino T, Nakase H, Suzuki H, Itoh F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dysregulation of miRNA in chronic hepatitis B is associated with hepatocellular carcinoma risk after nucleos(t)ide analogue treatment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 91-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.07.019.	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 Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Ishida T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 104
2. 論文標題 DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica.	6. 最初と最後の頁 155-165.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.191262.	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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北嶋洋志、丸山玲緒、高澤 啓、新沼 猛、山本英一郎、甲斐正広、時野隆至、小山内誠、仲瀬裕志、鈴木 拓
2. 発表標題 慢性胃炎および胃がんに関連する長鎖non-coding RNAの同定
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋洋志、丸山玲緒、高澤 啓、新沼 猛、山本英一郎、甲斐正広、時野隆至、小山内誠、仲瀬裕志、鈴木 拓
2. 発表標題 慢性胃炎および胃がんに関連する長鎖non-coding RNAの同定
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋洋志, 丸山玲緒, 高澤啓, 山本英一郎, 新沼猛, 甲斐正広, 仲瀬裕志, 時野隆至, 鈴木拓
2. 発表標題 慢性胃炎および胃がんに関連する長鎖non-coding RNA結合タンパク質の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北嶋洋志, 丸山玲緒, 高澤啓, 山本英一郎, 新沼猛, 甲斐正広, 時野隆至, 仲瀬裕志, 鈴木拓
2. 発表標題 慢性胃炎および胃がんに関連する長鎖non-coding RNAの同定と機能解析
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 北嶋洋志, 丸山玲緒, 山本英一郎, 新沼猛, 甲斐正広, 佐々木泰史, 時野隆至, 仲瀬裕志, 鈴木拓
2. 発表標題 慢性胃炎および胃がんに関連する長鎖non-coding RNAの同定と機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北嶋洋志, 丸山玲緒, 山本英一郎, 新沼猛, 甲斐正広, 高澤啓, 時野隆至, 仲瀬裕志, 鈴木拓
2. 発表標題 慢性胃炎および胃がん関連長鎖non-coding RNAの同定と機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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