

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2018～2021

課題番号：18KT0016

研究課題名(和文) ceRNAネットワーク構造の解読を基盤とした、全く新しい抗がん剤開発戦略の開発

研究課題名(英文) Development of strategy to design anticancer drug based on ceRNA network

研究代表者

秋光 信佳 (Nobuyoshi, Akimitsu)

東京大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：40294962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝子発現を制御するための制御ネットワークとして、RNAを中心としたネットワークが注目されており、このネットワークはRNA-RNAネットワーク、RNA-タンパク質ネットワークに大別される。本研究では、これらのネットワークについて研究し、新しい医薬品開発のシーズとすることを目指した。その結果、がん増殖と密接に関係する慢性的低酸素に細胞が応答するときにRNA-タンパク質ネットワークを再構築することが明らかになった。さらに、RNA-タンパク質ネットワークの再構築をドライブするRNA結合タンパク質を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性的低酸素に対してがん細胞が適応的に応答するために遺伝子発現パターンが変化するが、この遺伝子発現を調節するためのRNA-タンパク質ネットワークを明らかにし、その上で、このネットワーク制御を担うタンパク質を多数同定した。本研究で同定したタンパク質のなかには、すでにかん増殖やがん転移に関与することが報告されているタンパク質も存在した。この結果は、我々の研究アプローチによって、がん増殖やがん転移を担う責任分子を効率的に特定できること、すなわち、有望な抗がん剤標的分子を効率的に特定できることを示している。本研究結果はがん細胞の慢性的低酸素適応を標的とした新しい抗がん剤開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)： The post-transcriptional gene regulation is achieved by RNA-based gene regulatory networks. The RNA-based networks are classified by RNA-RNA and RNA-protein network. In this study, we investigate these RNA-based network to reveal gene regulation of cancer and we aimed development of new strategy to develop anticancer drugs. Our study has revealed that RNA-protein network is remodeled in response to chronic hypoxia and we found the target molecules of RNA-protein network under hypoxia.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の制御は生命現象の根幹であるため、その全貌を解明することは生命科学の中心課題といえる。また、がんを含めた数多くの疾患が遺伝子発現およびその制御異常に起因する。したがって、病気の原因を分子レベルで理解するためにも疾患状態の遺伝子発現の仕組みを理解することは極めて重要である。そして、この遺伝子発現の制御は多数の生体分子の相互作用に立脚しており、まさに複雑系そのものである。この複雑系を理解する方法論は未確立であるため、新しいコンセプトや方法論の開発が待ち望まれている。

遺伝子発現制御のネットワークとして、これまで転写開始の制御がよく研究されてきた。一方、転写後制御、とくに RNA 分解がかかわる転写後制御について十分に理解されていない。RNA 分解はマイクロ RNA や RNA 結合タンパク質が重要な役割を担っていることから、これらの生体分子が構築する転写後遺伝子発現制御ネットワークが重要と考えられる。

マイクロ RNA は自身と相補的な塩基対を有する mRNA に結合し、mRNA を分解することで mRNA の発現量を制御する。近年、長鎖ノンコーディング RNA がマイクロ RNA と結合することでマイクロ RNA が mRNA から乖離し、結果として mRNA が発現上昇することが示された。このように、単一のマイクロ RNA は複数の長鎖ノンコーディング RNA や mRNA により奪い合われており、このような競合関係にある RNA を互いに competitive endogenous RNA (ceRNA) と言う (図 1)。

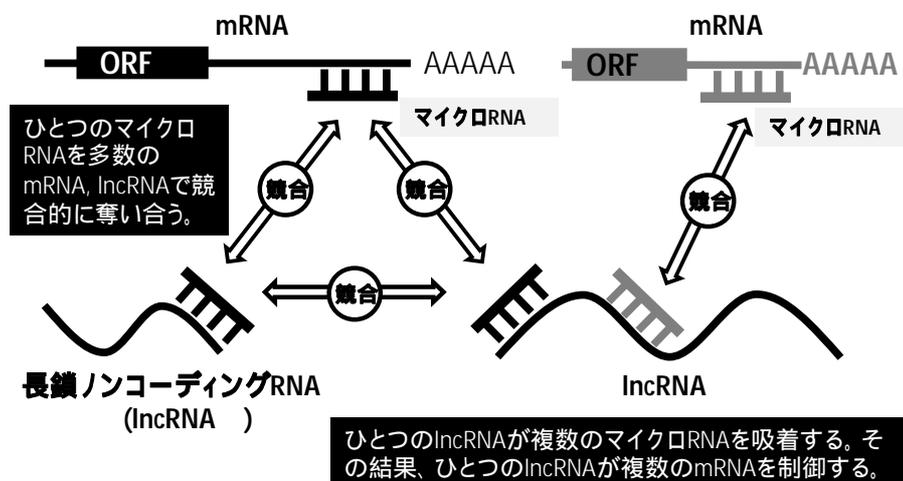


図1: ceRNA (competitive endogenous RNA) の概略

マイクロ RNA を競合的に奪い合う内在性 RNA 同士を互いに ceRNA と呼ぶ。mRNA, lncRNA, マイクロ RNA の三者間相互作用が RNA 間相互作用ネットワークを形成する。

一方、RNA に結合するタンパク質を RNA 結合タンパク質と総称するが、ヒトゲノム中には 2000 種類以上の RNA 結合タンパク質がコードされていると考えられている。ひとつの RNA 分子には複数種類の RNA 結合タンパク質が結合する。また、ひとつの RNA 結合タンパク質は複数の RNA に結合できる。したがって、RNA と RNA 結合タンパク質にもネットワーク構造が形成されると考えられる (図 2)。

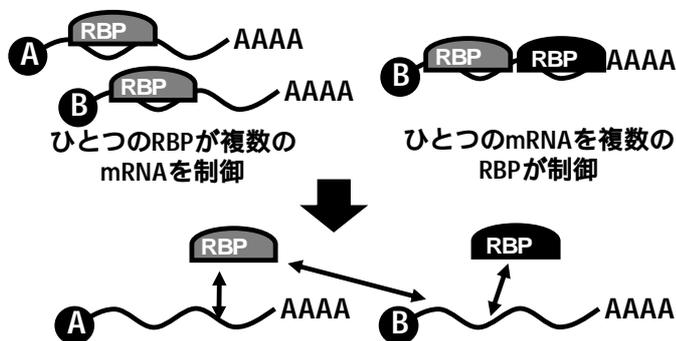


図2: RNA-RNA 結合タンパク質ネットワーク

2. 研究の目的

本研究では、RNA-RNA ネットワークあるいはRNA-タンパク質ネットワークに着目し、がん細胞に特徴的な遺伝子発現制御ネットワークを解明することである。さらに、遺伝子発現制御ネットワークの全体構造を構築するうえで重要な「ハブ」となる分子を特定し、新しい抗がん剤標的分子を特定することを目指す。

3. 研究の方法

研究代表者の秋光は、長鎖ノンコーディング RNA と RNA 結合タンパク質の生化学的性質を分子生物学的、生化学的、細胞生物学的手法で解析することを得意とする。また、研究分担者である浜田はバイオインフォマティクス解析を得意とする。両者の強みを生かして、RNA 分子を中心とした遺伝子発現制御ネットワークを解明する。

ヒト癌組織に関する公共データベース (The Cancer Genome Atlas) をつかったバイオインフォマティクス解析から、ceRNA ネットワークの推定と解析を行った。また、ヒト大腸癌細胞株 HT116 細胞をつかって、がん細胞の低酸素応答をモデル系として、がん細胞組織における RNA-BP ネットワークの推定と解析を実施した。

4. 研究成果

4-1 がん細胞における小規模 ceRNA ネットワーク解析

がん抑制遺伝子 PTEN mRNA と PTENP1 lncRNA は互いに ceRNA の関係であることが示唆されていたので、The Cancer Genome Atlas データを用いて、PTEN mRNA と PTENP1 lncRNA の間で ceRNA ネットワーク解析を実施した。具体的には、がん細胞の包括的次世代シーケンス解析データベースである The Cancer Genome Atlas に登録された RNA 発現データを使って RNA 間の相関係数を求め、mRNA-lncRNA 間がマイクロ RNA によって相互作用することが予測され、かつ $R=0.9$ 以上の発現相関を持つ RNA ペアを ceRNA の関係にあると判断することにした。

10 名の正常組織における両 RNA の発現量の相関を調べると、高い相関となることがわかった (図3)。一方、がん化によって、PTEN mRNA と PTENP1 lncRNA の間での ceRNA 関係が崩れると (細胞のがん化による遺伝子発現変化によって生じる変化)、両 RNA の発現量の相関が低下することがわかった。この結果から、がん細胞では ceRNA ネットワークが大きく変化することがわかった。

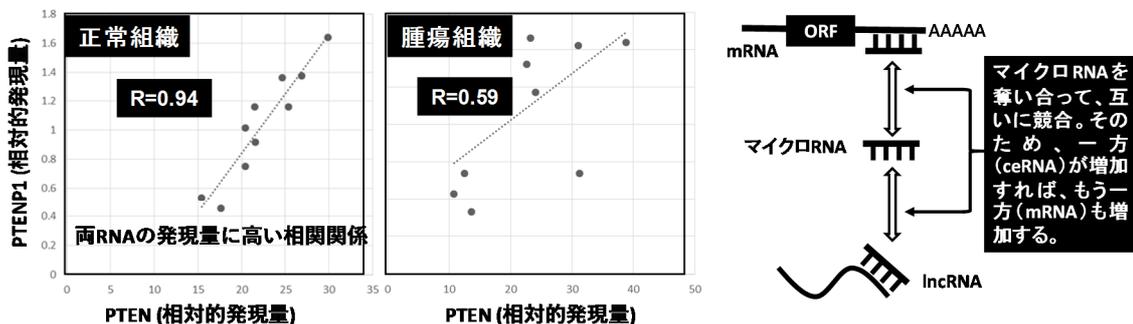


図3: The Cancer Genome Atlas (TCGA)データセットを用いたceRNAセットの予測

4-2 大規模 ceRNA ネットワーク解析

つぎに、The Cancer Genome Atlasに登録されたデータを用いた ceRNA ネットワーク構造を大規模に解析することにした。解析に着手した当時、The Cancer Genome Atlasでは乳がん組織の RNA-seq データがもっとも充実していたため、乳がん組織を解析対象にした。

解析の結果、正常細胞に比べて乳がん細胞では ceRNA ネットワークが大きく縮小していることがわかった(図4の下段図)。上下段とも多数の点が線によってつながる状態が描画されているが、点は特定の遺伝子(mRNA)を表し、線は mRNA 同士をつなぐマイクロ RNA を表現している。一見して判断できるように、上段の正常組織では多数の線が多数の点をつなぐ様子、つまり複雑な ceRNA ネットワークを形成していることがわかる。一方、下段の乳がん組織細胞では、点と点をつなぐ線が単調で少なく、ceRNA ネットワークが小さいことがわかる。

ネットワーク構造が小さい場合、外部からの攪乱要因に対してネットワークの脆弱性が高くなることが知られている(ネットワークが容易に破綻したり全体構造が変化する)。このことは、がん細胞が外的ストレス(例えば低酸素など)に対して容易に遺伝子発現制御様式を変化させることを示唆する。このような遺伝子発現パターンの変化が容易に起こることで、環境に適応できた細胞が生み出される基盤となることが予想される。

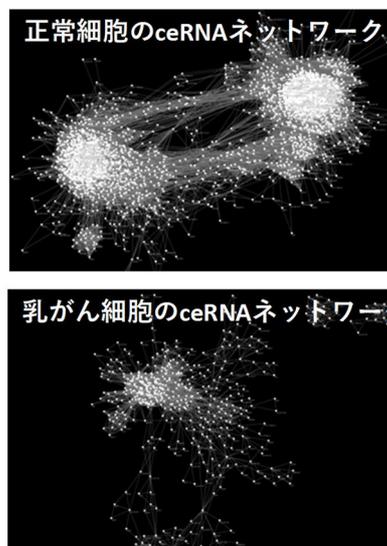


図4：正常細胞と乳がん細胞の ceRNA ネットワーク

The Cancer Genome Atlasの RNA-seq データを元に予測した ceRNA ネットワーク構造を Cytoscan プログラムで描画した。正常細胞に比べて乳がん細胞ではネットワークが縮小していた。

4-3 がん細胞の低酸素応答系の確立

ceRNA ネットワーク解析から、ネットワークの変化ががん細胞の遺伝的不安定性の一部が説明可能と期待された。ここで、細胞塊を形成する固形がん組織の内部は低栄養低酸素条件となるため、固形がん細胞は低栄養低酸素への適応を獲得している。この低栄養低酸素状態への適応を解除できれば、がん治療戦略になると期待できる。そこで、がん細胞の低酸素応答におけるネットワークレベル解析を実施することにした。

まず、大腸癌細胞株 HT116 細胞を用いて、一過のおよび慢性的な低酸素応答について、転写および RNA 分解について調べた。その結果、一過的な低酸素への応答では転写制御による遺伝子発現制御が重要であること、この転写制御では転写因子 HIF-1 が主な役割を担っていることがわかった。一方、24 時間以上の慢性的な低酸素状態になると、低酸素応答における HIF-1 の役割が減弱すること、および RNA 分解の制御の役割が増すことがわかった。

ここで、低酸素応答を大規模に RNA-seq 解析したデータは公共データベースには登録されていない。そこで、RNA-seq 解析を基盤にした ceRNA 解析は困難であった。一方、自前リソースを用いて RNA-タンパク質ネットワーク解析は実施可能であった。そこで、低酸素応答に関するネットワーク解析では RNA-タンパク質ネットワーク解析を実施することにした。

4-4 mRNA-RNA 結合タンパク質ネットワークに関わる RNA 結合タンパク質を同定する手法の確立

mRNA の持つポリ A 尾部に相補的なオリゴ dT アンチセンスオリゴを用いて、mRNA を細胞質抽出液から回収することにしたが、効率がわるかった。検討の結果、LNA オリゴを使うことで、効率的に mRNA を回収できるようになった。そして、mRNA-RNA 結合タンパク質を網羅的に回収し、質量分析で同定した。その結果、常酸素条件特異的、慢性的低酸素条件特異的、両条件で、

それぞれ、93種類、2種類、256種類の RNA 結合タンパク質を同定した。この結果から、慢性的低酸素条件では、mRNA から多くの RNA 結合タンパク質が遊離していることがわかった。一方、低酸素特異的にメッセンジャーRNA に結合するタンパク質は限られていることが判明した。

今後は、本研究で得られた知見をもとに、慢性的低酸素応答時の遺伝子発現制御を mRNA-RNA 結合タンパク質ネットワークの観点から解明する。

4-5 DNA ダメージ応答における PUM1 タンパク質を介した DNA 修復応答

本研究を実施する過程で、mRNA-protein ネットワークを高精度に予測する技術を開発した。この技術の有用性を検証するため、RNA 結合タンパク質 PUM1/2 に注目し、PUM1/2 の標的mRNA の同定および PUM1/2 の生理機能解明を行った。その結果、PUM1 が mRNA 分解を介して、Translesion DNA synthesis を制御することを見いだした(Yamada T. et al Cell Rep (2020))。このように、本研究の成果は、RNA-protein ネットワークの解明に有効であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshimichi Yamada, Naoto Imamachi, Katsutoshi Imamura, Kenzui Taniue, Takeshi Kawamura, Yutaka Suzuki, Masami Nagahama, Nobuyoshi Akimitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Systematic Analysis of Targets of Pumilio-mediated mRNA Decay Reveals that PUM1 Repression by DNA Damage Activates Translesion Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107542	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0件

〔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	浜田 道昭 (Hamada Michiaki) (00596538)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

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