

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591542

研究課題名（和文）non-coding RNA の発現制御解析による発がん機構の解明

研究課題名（英文）Mechanical analysis for carcinogenesis by functional studies of non-coding RNA

研究代表者

久郷 裕之 (KUGOH HIROYUKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40225131

研究成果の概要：

mRNA 様の巨大な non-coding RNA (ncRNA) *L1T1* は、細胞周期を通して安定に転写領域近傍に局在し、この RNA がクロマチン上をコーティングすることで周辺遺伝子を含むドメインレベルのユニークな遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした。さらに、*L1T1* がクロマチン上に拡散・集積している特殊な様子を RNA fiber FISH により可視化することに成功し、その集積領域を同定するための新規の方法(改変 RNA TRAP 法)を開発した。

大腸がんで高頻度に認められる *L1T1* の発現異常は、 β -catenin の相互作用により生じている可能性が示唆され、大腸がんの発生および進展に関わることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞遺伝

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

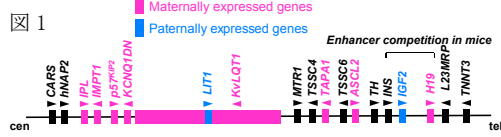
キーワード：大腸がん・ゲノムインプリンティング・*L1T1*・non-coding RNA・RNA TRAP

1. 研究開始当初の背景

塩基配列の変化を伴わず遺伝子の発現を活性化したり不活性化したりする後成的修飾によるエピジェネティクスな遺伝子発現制御機構は、転写時に生じるものと転写後に生じるものに分類できる。転写時の調節機構には、DNA のメチル化、ヒストンのリン酸化、アセチル化、メチル化などが関わっている。近年、転写後の制御機構には dsRNA が引き起こす RNAi (RNA interference) と呼ばれ

る現象や *Xist* RNA 遺伝子による X 染色体の不活化等、ncRNA 分子がエピジェネティクスの制御機構の中で重要な機能をもつことが明らかにされた。また、哺乳類特異的なゲノム刷り込み現象は、典型的なエピジェネティクスな制御により、ゲノムの特定領域に集積し、クラスターを形成する刷り込み遺伝子をドメインレベルで数百 kb から数 Mb 単位で調整していることが明らかにされた。

ヒト 11p15.5 上に存在する代表的な刷り込み領域は、*LIT1* を含め *IGF2*, *H19*, *KvLQT1*, *SMS4*,



p57^{KIP2} など少なくとも 11 個の刷り込み遺伝子がクラスターを形成している(図1)。

これまでに我々は、微小核細胞融合法を用いた染色体導入より親起源の明らかなヒト染色体を 1 本だけ保持するマウス細胞のヒト単一染色体ライブラリーを作製し、このライブラリーから 11p15.5 領域において父性発現を呈する新規刷り込み遺伝子 *LIT1* を同定した。また、プロモーター領域に存在するアレル特異的にメチル化を受ける CpG アイランド(DMR)の欠失実験による *LIT1* 遺伝子の機能消失は、がん抑制遺伝子として知られている *CDKN1C* を含む周辺刷り込み遺伝子の発現異常を誘導させることを明らかにした。これらの結果より、*LIT1* は周囲の刷り込み遺伝子の発現をクロマチンレベルでシスに制御するインプリントセンターとして重要な機能をもつことを明らかにした。さらに、*LIT1* の発現異常 (LOI:ゲノム刷り込みの消失) が高頻度で大腸がんや食道がんで認められた。

これらのことより、*LIT1* RNA は細胞周期を通して安定に *LIT1* DNA 周辺領域に局在し、*Xist* RNA 同様な ncRNA を介したクロマチン構造変化がドメインレベルの遺伝子発現制御に関与し、この *LIT1* による制御機構の破綻が大腸がんを含む発がん過程に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

一方、マウスの *lit1* においても in vitro, in vivo で周辺刷り込み遺伝子の発現を制御しているインプリントセンターとしてはたらいっていることが他の研究グループにより明らかにされた。しかし、*LIT1* RNA による発現制御がどのような分子機構を経ておこなわれているのかは全く理解されていなかった。さらに、大腸がんや食道がんで認められる *LIT1* の発現異常とがん化の分子機構についても未解明であった。

2. 研究の目的

近年、ncRNA は、RNA interference (RNAi) による発生・分化・細胞増殖の制御や *Xist* RNA による X 染色体の不活化等、機能性 RNA として様々な生命現象に深く関与していることが明らかにされてきた。さらに、種々のマイクロ RNA, *Xist* および ncRNA と知られている刷り込み遺伝子

LIT1 においては、その発現動態ならびに関連分子の解析からがん化に関わる重要な調節因子であることも強く示唆された。しかし、その制御機構の解明に関しては、ほとんど進展が認められていない。

本研究においては、これまで蓄積された知見の成果を基盤として、*LIT1* の動態解析および関連分子の分析を通して ncRNA が関わる発現制御機構および大腸がんの発がん機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

[全体の流れ]

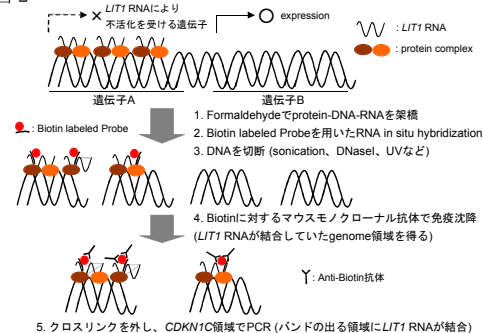
これまで細胞工学的なアプローチから蓄積された知見の成果 (1. 親起源の明らかなヒト染色体を 1 本保持するマウス細胞クローンの作製, 2. この細胞クローンを利用した新規刷り込み遺伝子 *LIT1* の単離, 3. 周辺遺伝子の発現制御センターの可能性, 4. *LIT1* RNA は細胞周期を通して安定に *LIT1* DNA 周辺領域に局在し、X 染色体の不活性化に関与する *Xist* RNA と類似した発現制御機構の存在が示唆された等) を基盤として、下記に示した詳細な機能解析を通して RNA 分子が関わるユニークな遺伝子発現制御機構および発がん機構の解明を目指す。

(1) 改変 RNA TRAP を用いた *LIT1* RNA 集積領域の同定

LIT1 RNA が隣接する遺伝子群まで拡散し、その遺伝子発現制御に関わっている可能性を検証するため、改変 RNA TRAP 法を開発し利用した。

パラホルムアルデヒドで protein-DNA-RNA を架橋し、Biotin ラベルした *LIT1* 検出プローブを用いて、RNA/プローブ DNA の ISH を行う。超音波処理により DNA を切断後、Biotin に対するマウスモノクローナル抗体で免疫沈降し、ncRNA が結合していた genome 領域を得る。クロスリンクを

図 2 RNA in situ Hybridization を応用した ChIP の原理図



外し、*p57^{KIP2}* 領域で PCR を行い *LIT1* RNA の集

積領域を同定した(図 2).

なお、この手法は、我々が新規に確立し、不活化 X 染色体上で、遺伝子発現の不活性化から逃れる *Jarid1c* および *Utx*, 一方、不活性化を受ける *Ube1x* において解析した結果、*Ube1x* のみに *Xist* RNA の集積が認められた。これらのことより、改変 RNA TRAP 法は、機能性 RNA の機能解析に有用なものであると確認された。

(2) *LIT1* 周辺領域におけるクロマチン修飾の解析

LIT1 RNA は、*Xist* RNA と同様にクロマチン上をシスにコーティングすることによりヘテロクロマチン化を誘導し、周辺遺伝子を発現制御している可能性が考える。そこで、クロマチン免疫沈降法 (ChIP: Chromatin Immunoprecipitation) を用いて、*LIT1* および周辺遺伝子のエピジェネティックな変化 (H3K27 トリメチル化, HP1) および *BRCA1* の関与を解析した。

ChIP 法

クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) とは、ホルムアルデヒドで DNA と結合するヒストンなどのタンパク質を架橋後、超音波処理を行って約 500bp に切断し、可溶性のクロマチンにして、ヒストンアセチル化抗体、ヒストンメチル化抗体、転写因子に対する抗体などを用いて免疫沈降する方法である。そして免疫沈降されたクロマチン分画を熱処理し、架橋をはずした後、DNA を精製し、PCR 法により標的とする DNA 領域を増幅して解析を行うものである。これにより標的とする DNA を含むクロマチン領域のヒストンアセチル化およびメチル化の状態や転写因子の結合状態を調べて、転写制御のメカニズムの解析を行うことができる。

(3) 大腸がんにおける *LIT1* の機能解析

LIT1 の発現異常 (LOI:ゲノム刷り込みの消失) が高頻度で大腸がんで認められた。本研究では、*LIT1* の発現動態を可視化させることで詳細に解析した。さらに、大腸がんでは、Wnt signal pathway の異常が多く報告されていることから、その主要な分子である β -catenin/TCF が *LIT1* 発現制御に関与するか明らかにするため、ChIP 法および β -catenin の siRNA による抑制効果を解析した。

①大腸がん細胞株において、*LIT1* RNA の発現動態を RNA FISH により詳細に解析した。

RNA FISH

< *In Situ* Hybridization のための細胞調整 >

5×10^4 個、 1×10^5 個の細胞を Lab-Tek II Chamber slide に播き、7-8 割コンフルエントの状態まで培養した。PBS(-) で 2 度洗浄した後、0.075M KCl で室温、10 分間の低張処理を行い、4% パラホルムアルデヒド/PBS(-)、室温、20 分間で固定した。さらに、PBS(-) で 2 度洗浄し、0.1% ペプシン/0.01 M 塩酸で 37°C、10 分間の浸透処理を行った。その後 1% パラホルムアルデヒド/PBS(-)、室温、5 分間の再固定の後、PBS(-) で 2 度洗浄を行った。最後にエタノールシリーズ(70%, 90%, 100% それぞれ室温、5 分間)を通して脱水し、風乾した。

< プローブの標識 ~ *In situ* Hybridization >

すべての試薬は RNase フリーで調整を行った。

LIT1 プローブ(ヒト 11p15.5 領域 *LIT1* 遺伝子全体を含む PAC U90095: Dr. Andrew P.

Feinberg より分与) は、nick translation kit を用いてビオチン-11- dUTP で標識を行った。得られた標識プローブをホルムアミド(Roche)に溶解し、75°C、10 分間で変性させた。この際に、ヒト胎盤 DNA を加え、ゲノミックプローブ中に含まれる反復配列に由来する非特異的なシグナルの抑制を行った。37°C、湿箱中で一晩ハイブリダイゼーションを行った後、50% ホルムアミド/2×SSC、37°C、10 分間で洗浄を行った。続いて 2×SSC、1×SSC、4×SSC で洗浄を行い、アビジン-FITC を 37°C、1 時間ハイブリダイズさせた。2×SSC、0.05% Triton-X/2×SSC、2×SSC で洗浄し、ビオチン化-抗アビジンを 37°C、1 時間ハイブリダイズさせた。再び 2×SSC、0.05% Triton-X/2×SSC、2×SSC で洗浄し、最終的にアビジン-FITC を 37°C、1 時間ハイブリダイズさせてシグナルの増幅、検出を行った。細胞核の対比染色は DAPI(250 ng/ml) により行った。

< シグナルの検出 >

得られたシグナルは蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Axio Vision)を用いて×100(倍率)で観察を行った。

② ChIP 解析法による *LIT1* プロモーター領域内の β -catenin の検出

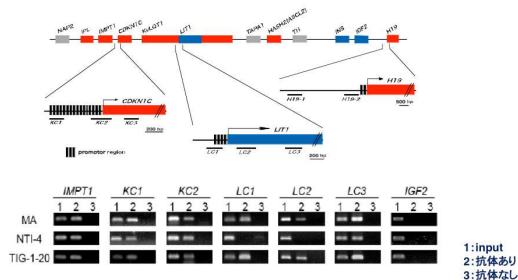
大腸がんでは、Wnt シグナル経路の破綻が高頻度で生じている。そこで、この経路と *LIT1* が関与しているかどうかを明らかにするため、抗 β -catenin 抗体を用いて β -catenin と結合しているゲノム領域を回収、精製した後、PCR 法により *LIT1* プロモーター領域への β -catenin の関与を ChIP 法による解析した。

4. 研究成果

(1) 改変 RNA TRAP を用いた *LIT1* RNA 集積領域の同定

fiber RNA FISH により *LIT1* RNA のクロマチン上への局在が観察された。その局在領域を同定するために、我々が新規に開発した改変 RNA TRAP 法を試みた。その結果、*SLC22A18/IMPT1* および *p57^{KIP2}/CDKN1C* を含む *LIT1* 周辺領域に *LIT1* RNA 分子のクロマチン上への集積が認められた(図 3)。

図3 RNA TRAP法による*LIT1* RNA コーティング領域の同定



このように、本研究において我々は、改変 RNA TRAP 法を開発し、利用することで、これまで染色体レベルでは解析不可能であった ncRNA の詳細な集積領域を検出することに成功した。今後、本法は、様々な ncRNA、とりわけ mRNA 様 ncRNA の機能解析やそこに集積する蛋白質の単離などに有用な方法として利用されることが期待できる。

(2) *LIT1* 周辺領域におけるクロマチン修飾の解析

Xist RNA は、哺乳類における遺伝子量補正機構として知られる X 染色体不活化に関わり、不活化される X 染色体から特異的に転写される。その転写産物である RNA 分子が X 染色体のほぼ全域にわたってシスに結合し、160 Mb にわたる X 染色体のほぼ全長にわたって遺伝子の不活化を引き起こす。さらに、*Xist* RNA のコーティングに協調して、ヒストン H3K9 および H3K27 のメチル化の広がりが生じる。また、HDAC をリクルートさせることやヒストン H3K9 および H3K27 のメチル化活性をもつポリコーム遺伝子群(PcG)の Eed-Ezh2 複合体が *Xist* RNA 依存的に X 染色体へ局在することが認められ、最終的にヘテロクロマチン化が形成される。一方、がん抑制遺伝子 *BRCA1* は、*Xist* RNA と局在が一致していることが知られている。*BRCA1* の欠損細胞を用いた研究から X 染色体の不活化を不安定にさせ、遺伝子量補償機構の破綻が発がん機構に大きく関与

している可能性が示唆されている。

LIT1 の発現動態解析より、*Xist* に類似した機能を保持する可能性から、*LIT1* および *LIT1* の発現制御下にあると考えられる *p57^{KIP2}/CDKN1C* 領域のヒストン H3K9, H3K27 のメチル化の広がりと *BRCA1* の関与の可能性を ChIP 法により解析した。その結果、これらのエピジェネティクスな変動や *BRCA1* の関与は認められなかった。このことから、*LIT1* の周辺遺伝子への発現制御は、X 染色体の不活化とは異なる経路により成立している可能性が示唆された。

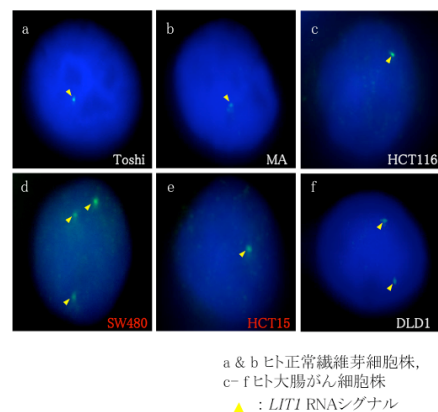
(3) 大腸がんにおける *LIT1* の機能解析

① RNA-FISH 法による *LIT1* RNA の発現動態解析

これまで、*LIT1* の LOI は Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)や食道がん、大腸がん細胞株で高頻度で起こることが報告されている。また、BWS といくつかの大腸がん細胞株では、*CDKN1C* の刷り込み異常をもたらす *LIT1* 遺伝子座における母方特異的なメチル化の欠損も報告されている。これらのことより、がんにおいて発現異常を示す *LIT1* は、がんの発生や進展に関与している可能性が示唆された。

本研究では、*LIT1* が関わる大腸がんの発がん機構を明らかにすることを目的とした。大腸がん細胞株における *LIT1* の発現状態を解析するため、*LIT1* 遺伝子全体を含む PAC U90095 ゲノミックプローブおよび 4 種類のヒト大腸がん細胞株を用いて *LIT1* RNA-FISH を行った(図 4)。

図4. 大腸がん細胞株における*LIT1* RNAシグナルの発現動態の変化



すべての細胞において 100 個の核を観察し、それぞれの核において *LIT1* シグナルのスポット数を計測し、スポット数の平均を求めた。また、それぞれの核面積と *LIT1* シグナルの面積を計測し、*LIT1* RNA シグナルの核面積に占める割合を算出した。その結果、*LIT1* RNA シグナルのスポット数は、ヒト正常繊維芽細胞株 Toshi および MA

で1.07,1.00個,ヒト大腸がん細胞株のSW480, DLD-1,HCT116およびHCT15では,各々で2.77,1.85,1.07,1.07個のスポット数を確認した. SW480,DLD-1では,*LITI* RNAシグナルのスポット数が,他の細胞株と比較すると約2~3倍増幅していることが認められた.これまでに,DNA FISHによって*LITI* DNAシグナルのスポット数はSW480においては3から4個,DLD-1においては3個と報告されている.これらのことより, SW480,DLD-1では*LITI*のLOIが確認され,*LITI*の発現が正常細胞の2倍~3倍に亢進されている可能性が示唆された.

さらに,*LITI* RNAシグナルの大きさを比較した結果,ヒト大腸がん細胞株のHCT116の*LITI* RNAシグナルの大きさは(0.16%),ヒト正常繊維芽細胞のMA(0.19%),Toshi(0.16%)と顕著な違いは認められなかった.しかし,HCT15(0.35%), SW480(0.34%)では,正常細胞に比べて,およそ2倍の*LITI* RNAシグナルの増大が確認された.このうち,HCT15では*LITI*のLOIは確認されていない.したがって,HCT15では*LITI*シグナルの拡大による発現亢進,SW480では*LITI*のLOIに加えて*LITI*シグナルの拡大といった発現亢進が認められた.

これらのことより,大腸がん細胞株では,LOIに加えて,シグナルの拡大、すなわち発現量の増大による*LITI*の発現亢進が認められた.

②ChIP法による*LITI*プロモーター領域内でのβ-cateninの検出

最近,大腸がん細胞株においてβ-cateninによるアンチセンスncRNAの転写促進が報告された.そこで我々は,大腸がん細胞株において発現異常を呈するアンチセンスなncRNAである*LITI*の発現調節にもβ-cateninの関与を明らかにするため,ChIP法により,*LITI*プロモーター領域内のTCF結合サイトへのβ-cateninの結合の検出を試みた.

*LITI*プロモーター領域内のTCF結合サイトを同定するため,Genomatix Matinspectorを利用し,*LITI*プロモーター領域内のTCF結合サイトの検索を行った.その結果,*LITI*転写開始点からその上流10000bpまでの間に,計13のTCF結合予想サイトが検出された.

大腸がん細胞株において,今回検出されたTCF結合予想サイトにβ-cateninが結合すかどうかを確認するため,コントロールにはヒト胎児腎臓由来培養細胞株293を,大腸がん細胞株にはヒト大腸がん由来培養細胞株DLD-1, SW480,

HCT116,HCT15を用いた.

*LITI*転写開始点上流4600bpに位置するTCF結合サイト,TCF-11について解析を行った結果,TCF-11では,DLD-1細胞のみからβ-cateninの結合が検出された.また,*LITI*転写開始点上流3800bpに位置するTCF結合サイト,TCF-12について解析を行った結果,DLD-1, HCT15からβ-cateninの結合が認められた.さらに,*LITI*転写開始点上流1300bpに位置するTCF結合サイト,TCF1-5について解析を行った結果,DLD-1,SW480,HCT116,HCT15において,β-cateninの結合が検出された.

これらのことより,*LITI*プロモーターに,β-cateninが関与し,*LITI*の発現制御に関わる可能性が示唆された.

Xist RNAを除いたmRNA様ncRNAの機能は,国内外を通してほとんど明らかにされていない.したがって,本研究の解析結果は,機能性RNAの機能を解明するための重要な知見になり,発がん機構の理解に留まらず,複雑な生命現象の理解へ向けて展開させることができる力になるものと期待される.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4件)

1. Murakami, K., Ohhira, T., Oshiro, E., Qi, D., Oshimura, M., [Kugoh, H.](#) [Identification of the chromatin regions coated by non-coding Xist RNA. Cytogenetic and Genome Research in press](#) 査読:有
2. [Nguyen P, Cui H, Bisht KS, Sun L, Patel K, Lee RS, Kugoh, H, Oshimura M, Feinberg AP, Gius D.](#) CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res.* 68: 5546-5551, 2008. 査読:有
3. [久郷裕之, 押村光雄](#) 染色体解析 改訂培養細胞実験ハンドブック:177-183,羊土社, 2008 査読:無
4. Murakami, K., Oshimura, M., [Kugoh, H.](#) Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1. *J. Human Genetics*, 52: 926-933, 2007 査読:有

〔学会発表〕(計 8件)

1. 久郷裕之:BWS 関連遺伝子,LIT1 の制御メカニズムとがん化 「インプリンティング疾患発症機序の解明と治療に向けて」大阪大学蛋白質研究所セミナー 大阪 平成 20 年 11 月 28 日

2. Hiroyuki Kugoh, Kazuhiro Murakami, Eriko Oshiro, Takahito Ohhira, Mitsuo Oshimura Chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted LIT1 The 3rd Asian Chromosome Colloquium (ACC3) Osaka, Dec 1-4., 2008

3. 村上和宏,押村光雄,久郷裕之:non-coding RNA LIT1 のクロマチン局在における発現制御機構の解明 第 31 回日本分子生物学会年会神戸, 平成 20 年 12 月 9-12 日

4. 村上和宏,押村光雄,久郷裕之:改変 RNA TRAP 法による non-coding RNA の発現動態解析技術の開発 第 31 回日本分子生物学会年会神戸, 平成 20 年 12 月 9-12 日

5. Makiko Meguro-Horike, Hiroyuki Kugoh, Shinichi Horike, Mitsuo Oshimura: Incomplete conservation of the mechanism controlling genomic imprinting in mammal, marsupial and avian cell lines 第 31 回日本分子生物学会年会神戸, 平成 20 年 12 月 9-12 日

6. 八木ひとみ, 久郷裕之, 福井千晶, 東元健, 城圭一郎, 押村光雄, 向井常博, 副島英伸: ヒト KIP2/ LIT1 刷り込みドメインにおける ncRNA LIT1 のおよぼす影響 第 31 回日本分子生物学会年会 神戸, 平成 20 年 12 月 9-12 日

7. 久郷裕之,村上和宏,押村光雄:non-coding RNA LIT1 のクロマチン局在における発現制御機構の解明 第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会 三島、平成 20 年 5 月 9-10 日

8. Kazuhiro Murakami, Mitsuo Oshimura, Hiroyuki Kugoh Identification of chromatin regions coated by non-coding RNA Keystone Symposium: D03 Chromatin remodeling, Denver Aspen April 7-12, 2008

〔図書〕(計 1件)

1. 久郷裕之, 押村光雄 分子細胞生物学辞典 (第二版) 東京化学同人 2008

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久郷 裕之 (Kugoh Hiroyuki)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40225131

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

研究協力者

村上和弘

福井千晶

大城恵利子

大平嵩人