

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07569

研究課題名（和文）新規lncRNA ELIT-1によるHBV複製および肝がん悪性化の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of HBV replication and liver cancer malignant progression by a novel lncRNA ELIT-1

研究代表者

酒井 聡 (Sakai, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50566081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々が発見したlncRNA ELIT-1のHBV複製時における機能解析を研究目的とした。しかし、ELIT-1のノックダウンやELIT-1の発現阻害剤のスクリーニングから得た化合物はB型肝炎ウイルス量の顕著な低下を示さなかった。一方で、HBV複製時に変動する別のlncRNAとしてlincNMRを見出し、DNA変異に関わるAPOBEC3Bを正に制御するがん遺伝子であることを報告した(Carcinogenesis, 2023)。さらに、がん抑制遺伝子として報告のあるLINC00173はSNAILと結合し、がん抑制遺伝子FHITの発現低下を阻害することを報告した(IJMS., 2023)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ELIT-1の発現阻害剤のスクリーニングから得た化合物はB型肝炎ウイルス量の顕著な低下を示さなかった。しかし、ELIT-1は上皮間葉転換(EMT)を促進する機能を持っている(Sakai et al., Cancer Res., 2019)。本成果で得られた化合物は、がんの転移阻害剤、肝線維化阻害剤として有用となる可能性がある。また、HBV複製時に発現上昇したlincNMRが、がんの悪性化に関わることも発見できた。今後lincNMRの発現阻害剤を探索することで、HBVを起点とする肝がんの進展阻害剤を見出すことが出来る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of our study was to analyse the function of lncRNA ELIT-1 in HBV replication. However, knockdown of ELIT-1 or compounds obtained by screening for inhibitors of ELIT-1 expression did not affect in a significant reduction of hepatitis B virus. On the other hand, we focused on lincNMR as another lncRNA whose expression is upregulated during HBV replication. We reported that lincNMR is an oncogene that positively regulates APOBEC3B, which is involved in DNA mutations (Carcinogenesis, 2023). Furthermore, we reported that LINC00173, a reported tumor suppressor, bound to SNAIL and inhibited the down-regulation of the tumor suppressor FHIT by SNAIL (Int. J. Mol. Sci., 2023).

研究分野：シグナル伝達

キーワード：lncRNA がん遺伝子 がん抑制遺伝子 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでの研究で *ELIT-1* は TGF β で誘導され、SMAD3 と結合して標的遺伝子の転写を促進して上皮間葉転換 (EMT) の誘導に機能する新規長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) であることを見出した (Sakai et al., *Cancer Res.* 2019)。*ELIT-1* による EMT 誘導は HBV 感染後の組織線維化促進による肝硬変、肝がん発症後のがん転移に寄与する可能性が高いと考えられた。一方で興味深いことに、B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製に伴って発現変動する lncRNA をマイクロアレイで解析したところ、*ELIT-1* は HBV 複製時にも発現誘導されることを見出した。さらに、肝炎から肝がんの進展に従い高発現していることが判明した。HBV による発現誘導機構を調べると、HBx の過剰発現により、*ELIT-1* promoter 活性が上昇することが判明した。一方で、*ELIT-1* の過剰発現は HBV mRNA の転写を促進した。つまり、HBV と *ELIT-1* は positive feedback 機構によりお互いを正に調節している可能性が高いと考えられた。しかしながら、その詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では *ELIT-1* がどのような分子機構で HBV によって誘導され、HBV の複製を促進しているのかを解析する。*ELIT-1* の発現阻害剤のスクリーニング系を立ち上げ、当研究室所有の化合物ライブラリーなどを用いて探索する。*ELIT-1* は HBV の複製、肝線維化、肝がんの悪性化に深く関与していることが予想され、*ELIT-1* を分子標的とした新しい HBV 関連疾患治療薬の創生を目指す。

3. 研究の方法

肝がん細胞株 Huh7 細胞に HBV ゲノムを導入した HBV 複製細胞を樹立する。HBV 複製細胞の *ELIT-1* を siRNA 法によりノックダウンし HBV ウイルス量を RT-qPCR 法で解析した。また、ルシフェラーゼレポータープラスミドに *ELIT-1* のプロモーター部分を組み込んだレポータープラスミドを構築し、化合物ライブラリーを用いてルシフェラーゼ活性阻害を評価した。阻害効果の認められた化合物を HBV 複製細胞に添加し、HBV ウイルス量を RT-qPCR 法で評価した。

解析候補 lncRNA はマイクロアレイや RNA-Seq データを利用し、lncRNA の標的遺伝子の探索は、lncRNA をノックダウンし発現変動した遺伝子群を RNA-Seq データから抽出した。これらの中から RT-qPCR で発現変動を確認できた遺伝子を標的遺伝子とした。

4. 研究成果

まず、HBV 複製時の *ELIT-1* の誘導機構について解析した。*ELIT-1* の発現誘導には SMAD3 が寄与する (Sakai et al., *Cancer Res.*, 2019) が、HBV ゲノム由来のタンパク質が協調的に機能すると考えた。HBV ゲノム由来のタンパク質である HBx は SMAD3 との共存下、*ELIT-1* プロモーター活性を上昇させた。両者が結合する可能性を考え、IP-WB で検証したが細胞内での結合は認められなかった。また、HBV と *ELIT-1* の positive feedback 機構を評価するために、両者の結合を RIP-qPCR 法で検証したが、HBx と *ELIT-1* の結合は確認出来なかった。

次に、*ELIT-1* を siRNA 法でノックダウンし、HBV 複製細胞のウイルス量を RT-qPCR 法で検討したが、顕著な HBV ウイルス量の低下は認められなかった。当研究室、本学所有の化合物ライブラリーや理研との共同研究により供与された化合物ライブラリーを用いて、*ELIT-1* を阻害する化合物のスクリーニングを実施した。発現阻害効果を示した化合物を得たが、ウイルス量の顕著な低下を示さなかった。R2 年度までの解析から顕著な結果を得ることが出来なかったことから次年度以降の予定を変更した。

R3 年度からは、HBV 複製により発現誘導される lncRNA を新たに探索し *lincNMR* に着目した。*lincNMR* は、ヌクレオチド代謝に関与し、がん細胞の増殖に寄与することが別のグループにより報告された (Gandhi et al., *Nat. Commun.*, 2020)。また、*lincNMR* ががん中で高発現していることが示されていたものの、発現上昇に関わる機序は不明であった。本研究では、*lincNMR* が TGF β -SMAD 経路を介して誘導されることが SMAD2/3 のノックダウンや *lincNMR* のプロモーター領域をルシフェラーゼレポータープラスミドに導入したルシフェラーゼアッセイから判明した。次に、*lincNMR* の標的遺伝子を RNA-Seq で網羅

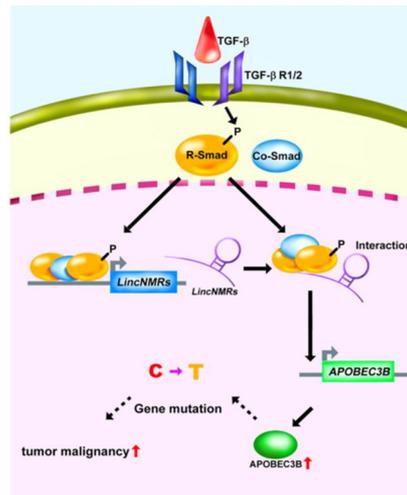


図1 TGF β -SMAD-*lincNMR*-APOBEC3B を介したがん悪性化モデル

的に解析したところ、DNA 変異に関わる APOBEC3B を正に制御することが判明した。また、*lincNMR* は SMAD2/3 と結合することが RIP-qPCR 法により明らかになり、SMAD2/3 を介した APOBEC3B の発現上昇が *lincNMR* をノックダウンすることにより消失した。つまり、*lincNMR* は SMAD2/3 と結合することで APOBEC3B 発現を正に制御するがん遺伝子として機能することが判明した。さらに、*in Silico* 解析から、肝がんや肺がんにおいて *lincNMR* の高発現は予後と相関することが判明した。これらの結果を *Carcinogenesis* 誌に投稿し採択された(Ota and Sakai et al., 2023 ; 図 1)。

R5 年度は TGFβにより発現低下する lncRNA に着目し、がん抑制遺伝子として報告のある *LINC00173* の機能解析を実施した。*LINC00173* の発現調節機構や標的遺伝子に関しては不明な点が多く残されている。*LINC00173* をノックダウンした細胞を用いた RNA-Seq による網羅的解析から、アポトーシス等に機能するがん抑制遺伝子 FHIT が *LINC00173* の発現低下と連動し、標的遺伝子であることが判明した。FHIT 及び *LINC00173* のプロモーター領域には E-box 配列が複数存在し、発現抑制機構は SNAIL を介していることが判明した。次に、*LINC00173* と SNAIL が結合する可能性を考え、RIP-qPCR 法で検証すると両者が結合することが判明した。SNAIL をノックダウンすると FHIT 発現が上昇するが、この発現上昇は *LINC00173* をノックダウンすることで消失した。つまり、*LINC00173* は SNAIL と結合することにより、FHIT の SNAIL による発現低下を阻害する機能を持っていると考えられた。さらに、*in Silico* 解析から *LINC00173* と FHIT の発現が高い場合は予後が良好で、SNAIL の高発現と逆相関することが判明した。これらの結果を *Int. J. Mol. Sci.* 誌に投稿し

採択された(Suzuki and Sakai et al., 2023 ; 図 2)。しかし、TGFβ 経路を介した *LINC00173* の発現低下の意義など未解明の部分も残されており、今後のさらなる検証が必要であると考えている。

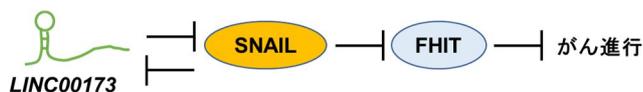


図2 *LINC00173*-SNAIL-FHITを介したがん進展抑制モデル

一方で、TGFβにより発現誘導される *ELIT-2* と名付けた lncRNA の解析を行った。肝がん細胞株 Huh7 細胞を用いて *ELIT-2* を siRNA 法でノックダウンすると、TGFβシグナルに応答するレポータープラスミド(CAGA-Luc, SBE-Luc)の活性が低下することが判明し、シグナルの調節に寄与する lncRNA であることが示唆された。*ELIT-2* をノックダウンし発現変動する遺伝子を網羅的に解析すると、TGFβにより変動する EMT に関連する遺伝子群が標的であることが判明した。詳細な分子機構は解析中であるが、*ELIT-2* は *ELIT-1* の発現上昇に関わる lncRNA であることが判明した。スクラッチアッセイを行ったところ、TGFβによる誘導される EMT は *ELIT-2* をノックダウンすることにより抑制された。また、TGFβによる EMT の形態変化も抑制された。おそらく、*ELIT-2* を介した *ELIT-1* の発現誘導が抑制されることにより EMT が阻害されたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ota Kosuke, Sakai Satoshi, Ohhata Tatsuya, Suzuki Takahito, Uchida Chiharu, Niida Hiroyuki, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 APOBEC3B expression is promoted by lincNMR collaborating with TGF-β-Smad pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgac086	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 Suzuki Takahito, Sakai Satoshi, Ota Kosuke, Yoshida Mika, Uchida Chiharu, Niida Hiroyuki, Suda Takafumi, Kitagawa Masatoshi, Ohhata Tatsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Expression of Tumor Suppressor FHIT Is Regulated by the LINC00173-SNAIL Axis in Human Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17011~17011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms242317011	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 酒井 聡、太田 幸佑、大畑 樹也、北川 雅敏
2. 発表標題 TGF-βにより誘導される長鎖ノンコーディングRNAの網羅的解析とその機能
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田 幸佑、酒井 聡、大畑 樹也、北川 雅敏
2. 発表標題 lincNMRはTGF-β-Smad pathwayを介してAPOBEC3Bの発現を促進する
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Sakai, Kosuke Ota, Tatsuya Ohhata, Hiroyuki Niida, Masatoshi Kitagawa
2. 発表標題 Comprehensive analysis of long non-coding RNAs induced by TGF and their functional analysis
3. 学会等名 2022 Cold Spring Harbor Asia Conference (RNA BIOLOGY) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Sakai, Kosuke Ota, Tatsuya Ohhata, Hiroyuki Niida, Masatoshi Kitagawa
2. 発表標題 APOBEC3B expression is promoted by lincNMR collaborating with TGF -Smad pathway
3. 学会等名 28th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 聡、太田 幸佑、鈴木 貴人、大畑 樹也、北川 雅敏
2. 発表標題 TGF シグナルに寄与するlincRNA
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 聡、大畑 樹也、丹伊田 浩行、北川 雅敏
2. 発表標題 lincRNA ELIT-2はTGF -Smad経路を介して上皮間葉転換(EMT)を促進する
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
研究協力者	北川 雅敏 (Kitagawa Masatoshi)		

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