

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08733

研究課題名(和文) 小胞体ストレス応答を司る長鎖ノンコーディングRNA 革新的治療への展開

研究課題名(英文) Role of LINC01534 in colorectal cancer

研究代表者

市原 もも子 (Ichihara, Momoko)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50835246

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)：近年、長鎖ノンコーディングRNAは様々な生命現象に重要な役割を果たすことがわかってきたが、癌との関連は未だ十分には解明されていない。LINC01534はリウマチ疾患での報告が1報あるのみで癌についての報告はない。更に小胞体ストレス応答と癌幹細胞性とは、大腸正常上皮や大腸癌において相反的に制御されていることが報告されているが、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究によってLINC01534は癌幹細胞性とストレス応答を逆に制御するkey分子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LINC01534は大腸癌の癌細胞で発現しており予後不良因子となることが分かった。組織切片上で発現レベルを可視化することができるので、病理検査の参考所見などで活用できる可能性がある。また癌幹細胞性を維持ないしは増強する働きがあることが分かったので、治療標的としても興味深い知見が得られた。日本では大腸癌の死亡数が伸びていることを考えると、本研究の結果は、医学的、社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent research has revealed that long non-coding RNA plays a crucial role in various human vital activity. However, only little is known about its association with cancers. With LINC01534, there is only one report on rheumatoid disease and we not aware any reports on cancers. In addition, it is reported that ER stress response and cancer stemness are inversely regulated in colonic mucosa as well as colorectal cancer, but underlying mechanism is not uncovered. This study for the first time revealed that LINC01534 may be a key molecule that inversely regulates ER stress response and cancer stemness.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 Inc RNA LINC01534 ERストレス 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアソーム活性の低い癌細胞は、癌幹細胞様性質を有するという既報の結果に基づいて、低プロテアソーム活性の癌細胞を可視化する独自の技術を用い、プロテアソーム活性の低い細胞集団で高発現を示し、TCGA アトラスにて予後と関連を認める遺伝子として long non-coding RNA(LINC)01534 に着目した。近年、長鎖ノンコーディング RNA は様々な生命現象に重要な役割を果たすことがわかってきたが、癌幹細胞との関連は未だ十分には解明されていない。LINC01534 は関節リウマチでの報告が 1 報あるのみで癌についての報告はなく、その役割解明が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、LINC01534 が大腸癌の悪性化、特に癌幹細胞性との関連があるか、予後予測のバイオマーカーとなるか、その分子的役割は何かについて追求し、新しい知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 臨床サンプルで LINC01534 が癌組織の上皮成分で発現するか、間質部分で発現するかについて組織切片上の in situ hybridization によって検討した。
- 2) LINC01534 に対する siRNA を設計し、ノックダウンして、大腸癌細胞の増殖抑制、浸潤抑制、細胞周期の変化、アポトーシス誘導、幹細胞性(ステムマーカー発現、スフェア形成能、抗癌剤(5-FU)感受性について検討した。
- 3) LINC01534 をノックダウンして、RNAseq を行い、下流遺伝子の変化について検討した。
- 4) 大腸癌細胞を低栄養(ブドウ糖飢餓、アミノ酸飢餓状態)に暴露し、ストレス応答分子の発現変化を調べた。

4. 研究成果

1) RNA Scope による in situ hybridization によって、大腸癌組織サンプルでの LINC01534 の局在を調べたところ、正常上皮と比較して大腸癌組織での過剰発現がみられ、癌細胞の核で発現していることが分かった。大腸癌臨床サンプルを用いた検討では LINC01534 高発現群は低発現群と比較して有意に予後不良であった(図 1)。

➤ LINC01534 は大腸癌組織で高発現し、予後不良と関連していた。

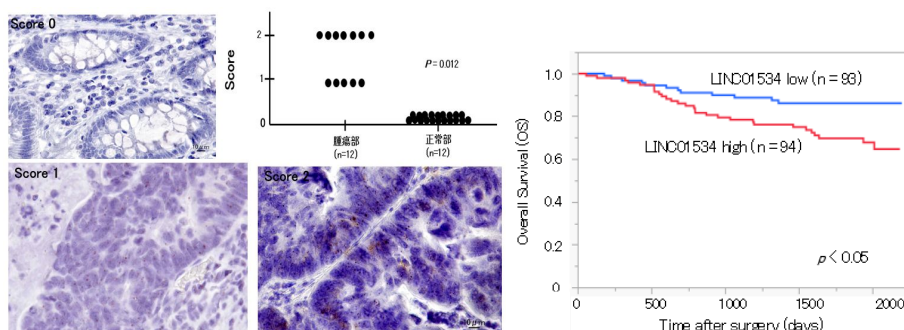


図 1. In situ hybridization 正常大腸組織と比べて癌組織での発現スコアが高かった。

LINC01534 高発現は予後不良である。

2) 大腸癌細胞株 (HCT116 と RKO) における LINC01534 の機能解析。LINC01534 をノックダウンする siRNA の選別を行い、ノックダウン効率のよい 2 種類の siRNA 配列を決定した。Negative control siRNA と比べて、2 種の大腸癌細胞株の細胞増殖能・浸潤能の低下を認め、細胞周期の G2/M arrest、Annexin V アッセイによる apoptosis の増加を認めた(図 2)。

➤ LINC01534 を抑制することにより、増殖能・浸潤能の低下、G2/M arrest、Apoptosis の増加を認めた。

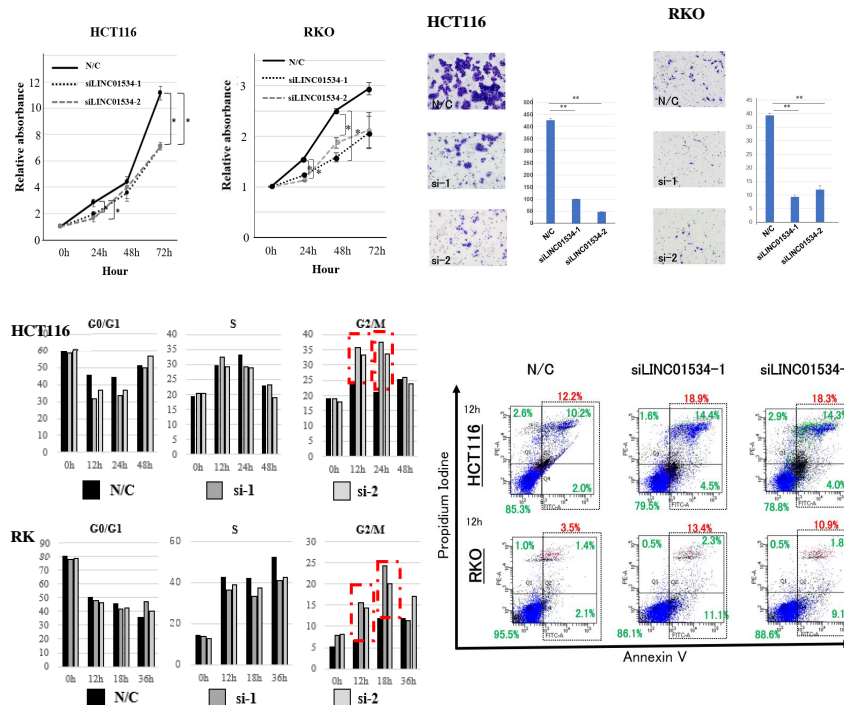
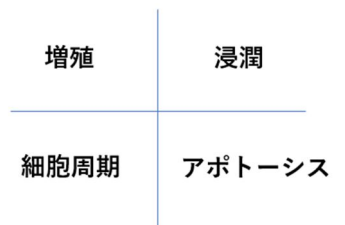


図 2. siLINC01534 による大腸癌の増殖、浸潤、細胞周期、アポトーシスへの影響



癌幹細胞性との関係では、LINC01534 を抑制することで各種の癌幹細胞表面マーカーの発現低下 (図 3)、Sphere 形成能の低下 (図 4)、5-FU の感受性増強を認めた。

➤ LINC01534 を抑制することにより、幹細胞マーカー-LGR5 / BMI1 / CD133 / CD44v9 の低下を認めた。

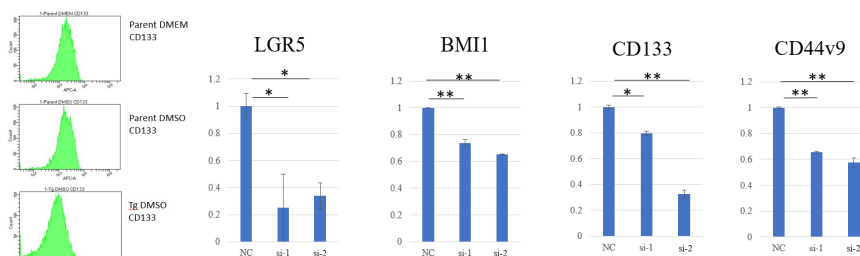


図 3. LINC01534 の siRNA 処理でステムマーカー発現が減少した。

➤ LINC01534 を抑制することにより、Sphere 形成能の低下を認めた。

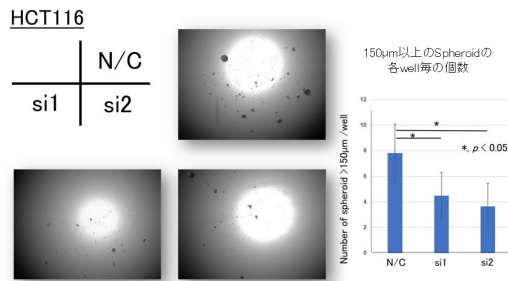


図 4. LINC01534 の siRNA 処理で sphere 形成能が減少した。

一方、LINC01534 のノックダウンによってもプロテアソーム活性は変化しなかったことから、LINC01534 はプロテアソーム非依存性に癌幹細胞性を亢進ないしは維持することが分かった。

3) siRNA 処理の後、RNAseq を行い、Gene ontology 解析にて、小胞体ストレス経路の変化が最上位に複数挙がってきた(図 5)。

➤ LINC01534 を抑制することにより、PERK 経路をしたストレス応答の亢進を認めた。

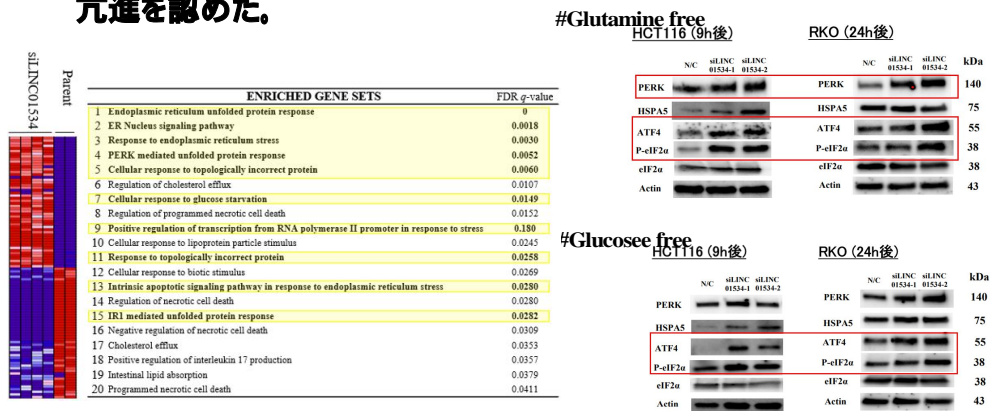


図 5. (左): Ontology 解析の結果、siLINC01534 処理した群では、黄色帯で示す多くの ER ストレス経路に関係するパスウェイが挙がってきた。(右)Glutamine 除去、Glucose 除去の栄養飢餓状態で LINC01534 のノックダウンはリン酸化 eIF2 の増加をはじめとする PERK 経路の活性化が顕著な結果となった。

小胞体ストレス応答は、ホメオスタシスの維持や癌細胞の生存において重要な機構であるが、小胞体ストレス応答と lncRNA の関わりは、未だほとんどわかっていない。更に大腸癌では、PERK 経路による小胞体ストレス応答の亢進により、癌幹細胞性が減弱することが報告されているが、その原因や制御因子も分かっていない。私達も癌幹細胞性の強い HCT116 を用いて、ER ストレス誘導剤であるタプシガルギン(Thapsigargin) 添加により確認実験を行ったところ、CD133 や CD44 陽性細胞が減少して幹細胞性は減少し、CDX2 などの上皮マーカー発現が増加することを確認した。

4)ウエスタンブロットの結果、LINC01534 のノックダウンにより小胞体ストレス応答に働くリン酸化 eIF2 、ATF4 といった PERK 経路の構成分子の蛋白発現が亢進すること、更にブドウ糖やグルタミンの飢餓状態では LINC01534 のノックダウンによって一層小胞体ストレス応答作用が増強された(図 5)。このことから、LINC01534 は、過酷な細胞環境下で小胞体ストレス

応答のマスターレギュレーターとして機能し、癌微小環境における癌細胞の増殖に重要な役割を果たすことが考えられる。

これまで小胞体ストレス応答と癌幹細胞性とは、大腸正常上皮や大腸癌において相反的に制御されていることが報告されているが、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究によって LINC01534 は癌幹細胞性とストレス応答を逆に制御する key 分子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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