

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659130

研究課題名(和文)長鎖ノンコーディングRNAを標的とした新たな癌治療薬の創成

研究課題名(英文)Exploration of novel molecular targets for anti-cancer drug in long non-coding RNAs

研究代表者

北川 雅敏 (Kitagawa, Masatoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：lncRNA ANRILはPRC2のリクルートを介して癌抑制遺伝子p16の転写抑制を行う。その機能阻害剤の探索系を ANRIL とPRC2の構成成分であるSUZ12との結合を解析するRNA immunoprecipitation 法により設定可能とした。一方で癌との関連が示唆されているANRILを含む既知の15種類のlncRNAの細胞内発現量の定量法を確立し、肝がん培養細胞へ発がんシグナルとしてHBxを強制発現してその発現変動を調べたが、有意に発現が変動するlncRNAはなかった。今後さらに広範囲の系で解析する必要がある。

研究成果の概要(英文)：lncRNA ANRIL negatively regulates tumor suppressor p16Ink4 via recruitment of PRC 2. We found that RNA immunoprecipitation method is applicable for a screening system to evaluate the binding between ANRIL and SUZ12, a component of PRC2. Moreover, we developed quantitation methods to measure fifteen known lncRNAs including ANRIL to evaluate their association with cancer development. Although, we evaluate them in hepatocellular carcinoma cell lines with or without HBx-expression using this system, there are no lncRNA oscillating by HBx-expression. Further evaluation will be required.

研究分野：総合生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：ノンコーディングRNA 癌抑制遺伝子 INK4 locus エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、細胞は多様な長鎖非コード RNA (long noncoding RNA; lncRNA) を発現していることが判明してきた。lncRNA の種類、機能については未知の部分が多いが、エピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な事がわかってきた。我々は癌抑制遺伝子である CDK インヒビター *p15/16* 遺伝子のポリコーム(PRC)を介したエピジェネティックな発現調節機構を明らかにし、*p15/16* の転写を抑制して細胞増殖を正に制御する lncRNA *ANRIL* を発見した。この研究において *ANRIL* は PRC2 と結合し、*p15/16* の転写制御領域に PRC2 をリクルートしてヒストン H3K27 をトリメチル化することにより、エピジェネティックに発現抑制をしている事がわかった。*ANRIL* ノックダウンにより、*p15/p16* の発現を誘導し、細胞増殖を抑制した。以上より *ANRIL* はがん遺伝子としての機能を持ち、がんの新たな分子標的として注目できる。

(2) 上記のように lncRNA はがんの新たな分子標的として注目すべきであるが、ほとんど不明といってよい。B 型肝炎ウイルスの感染は肝炎、肝硬変を経て肝発がんするがそのメカニズムは不明である。感染から発がんまで長期にわたるのでエピジェネティックな機構が関与することが予想されるが、lncRNA との関係も不明で、解明すべき課題といえる。

2. 研究の目的

本研究においては *ANRIL* 等癌化や癌の進展に関与する lncRNA の分子標的としての選定と定量および機能阻害剤スクリーニング法の開発を目的とする。*ANRIL* 阻害剤は *p15/p16* の発現を誘導し、細胞増殖を抑制する効果を期待できる。よって、*ANRIL* と PRC2 の結合を阻害して *p15/16* の転写を誘導する *ANRIL* 阻害薬を創出すれば、癌抑制遺伝子誘導がもたらされ、新たなタイプの抗腫瘍剤が創出できると考えている。そこで以下の 2 つのアプローチにより上記目標を達成する。

(1) PRC2 の構成成分である SUZ12 と *ANRIL* の結合を解析する RNA immunoprecipitation 法の確立を目指す。さらに、(2) *ANRIL* 以外にも癌の分子標的として有用な lncRNA を選定する。

3. 研究の方法

(1) *ANRIL* と PRC2 の構成成分である SUZ12 との結合を解析する RNA immunoprecipitation 法のセットアップと条件設定を行なった。詳細としては、WI38 細胞の核抽出液から、SUZ12 を抗 SUZ12 抗体を用いて免疫沈降する。沈降物に *ANRIL* との exon1 と 2 を増幅する PCR プライマーを加え、RT-PCR を行い、SUZ12 に結合している *ANRIL* を検出する方法を確立する。

(2) 癌の分子標的として適当な lncRNA を選定するため、癌との関連が示唆されている *ANRIL* を含む既知の 15 種類の lncRNA (*ANRIL*、*PCAT1*、*PANDA*、*PR antisense*、*PSF interacting RNA*、*GASS*、*lincRNA-p21*、*E2F4 antisense*、*MALAT1*、*HOTAIR*、*HULC*、 *α HIF*、*Tie-1AS*、*PCGEM-1*、*UCA1-1*)に注目し、特異的プライマーをデザインして、RT-PCR による細胞内発現量の定量法を確立した。この定量アッセイを用いて肝がん培養細胞へ発がんシグナルとして HBx を強制発現してその発現変動を調べる。

4. 研究成果

(1) WI38 細胞の核抽出液を調整し、抗 SUZ12 抗体を用いて SUZ12 を免疫沈降した。沈降物に *ANRIL* との exon1 と 2 を増幅する PCR プライマーを加え、RT-PCR を行った。その結果 SUZ12 に結合している *ANRIL* を検出することができた。細胞培養中に化合物を加え、この方法を利用して *ANRIL* と SUZ12 の結合を阻害する物質をスクリーニングできると考えている。

(2) 癌との関連が示唆されている *ANRIL* を含む既知の 15 種類の lncRNA (*ANRIL*、*PCAT1*、

PANDA, PR antisense, PSF interacting RNA, GASS, lincRNA-p21, E2F4 antisense, MALAT1, HOTAIR, HULC, αHIF, Tie-1AS, PCGEM-1, UCA1-1)について、特異的プライマーを作成し、RT-PCRによる測定法を確立することに成功した。肝臓がん培養細胞 Huh7 と HBx を発現させた Huh7 から全 RNA を抽出し、この測定方法を利用し、上記 15 種の発現量を定量した。しかしながら HBx の有無で有意に発現が変動する lncRNA はなかった。今後は正常細胞を用いて癌化シグナルを付与するモデル系でこれらの lncRNA の解析を行ない、分子標的を探索する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)以下全て査読あり

1. *Kitagawa, M., Kotake, Y. and Ohhata, T. (2012) Long non-coding RNAs in cancer development and cell fate determination. *Cell. Curr. Drug Targets* 13, 1616-1621, DOI10.1174/138945012803530026
2. *Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H. and Ohhata, T. (2013) Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4785-4794, DOI10.1007/s00018-013-1423-0.
3. *Kotake, Y., Ozawa, Y., Harada, M., Kitagawa, K., Niida, H., Morita, Y., Tanaka, K., Suda, T. and Kitagawa, M. (2013) YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. *Genes Cells* 18, 999-1006, DOI10.1111/gtc.12093
4. Suzuki, S., Ohashi, N. and *Kitagawa, M. (2013) Roles of the Skp2/p27 axis in the progression of chronic nephropathy. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3277-3289, DOI10.1007/s00018-012-1232-x
5. Harada, M., Kotake, Y., Ohhata, T., Kitagawa, K., Niida, H., Matsuura, S., Funai, K., Sugimura, H., Suda, T. and *Kitagawa, M. (2014) YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells*, doi: 10.1111/gtc.12150
6. *Uchida, C., Hattori, T., Takahashi, H., Yamamoto, N., Kitagawa, M. and Taya, Y. (2014) Interaction between RB protein and

NuMA is required for proper alignment of spindle microtubules. *Genes Cells* 19: 89-96, DOI10.1111/gtc.12119

7. Miyazaki, S., *Kikuchi, H., Iino I., Uehara, T., Setoguchi, T., Fujita, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Baba, S. and Konno, K. (2014) Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. *Int. J. Cancer*, 135, 295-307, doi: 10.1002/ijc.28686

[学会発表](計 4 件)

1. 大畑樹也、北川雅敏:Recent progress of Long non-coding RNAs research. 第71回日本癌学会年会 シンポジウム発表 札幌 2012 年
2. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb, 柴田進和、廣瀬 哲郎、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz:マウスES細胞におけるXist抑制機構解析. 第36回日本分子生化学会年会 ポスター発表 神戸 2013 年
3. Tatsuya Ohhata, Masatoshi Kitagawa: Investigation of long non-coding RNAs involved in regulating X-chromosome inactivation. The 13th Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium, Plenary talk, Deagu, Korea, 2013.
4. Tatsuya Ohhata, Mika Matsumoto, Martin Leeb, Shinwa Shibata, Tesuro Hirose, Masatoshi Kitagawa, Anton Wutz: Molecular dissection of Xist repression through Tsix dependent/independent manner in undifferentiated ES cells. Gordon research conference, Epigenetics. Rhode Island, USA, 2013

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 雅敏 (KITAGAWA, Masatoshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：5 0 2 9 4 9 7 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：