

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861104

研究課題名(和文)大腸癌発生進展における機能性RNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of functional RNA involvement in colorectal cancer development and progression

研究代表者

高橋 里奈 (TAKAHASHI, Rina)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：80639112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：SMYD3は腫瘍形成に重要な役割を果たしている。イントロニックSMYD3 RNAは、SMYD3遺伝子のイントロンに存在し、SMYD3の発現を制御しているが、その機能はほとんど明らかにされていない。そこで、大腸癌におけるイントロニックSMYD3 RNAの機能を明らかにするために、大腸癌組織におけるイントロニックSMYD3 RNAの発現を調べた。その結果、転移が見られた組織でその発現の減少傾向が見られた。さらに、イントロニックSMYD3 RNAを欠損した大腸癌細胞株の作製を試みた。今後、大腸癌細胞株やモデル動物を用いて、イントロニックSMYD3 RNAが大腸癌の転移に関わるかどうかを調べていく。

研究成果の概要(英文)：SMYD3 plays a crucial role in carcinogenesis. The intronic SMYD3 RNAs excised in intron of SMYD3 gene and control the expression of SMYD3. The role of intronic SMYD3 in colorectal cancer is largely unknown. To uncover the function of intronic SMYD3 RNA, in situ hybridization for intronic SMYD3 RNA were carried out using tissue microarray constructed from colorectal cancer samples. As a result, there was a decrease trend in its expression in metastatic colorectal cancer. Then I tried to establish the colorectal cancer cell lines which deleted intronic SMYD3 RNA. In further study, I will investigate whether intronic SMYD3 RNA are involved in metastasis or not using model organism and cancer cell lines.

研究分野：消化器外科学

キーワード：メチルトランスフェラーゼ non-coding RNA エピジェネティクス 大腸癌 機能性RNA

1. 研究開始当初の背景

SMYDファミリーはSETドメインを持ち、ヒストンメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子群である。本遺伝子群は生物種間でよく保存されており、ヒトではSMYD1からSMYD5の5つの遺伝子から構成される。SMYDファミリーは腫瘍形成や形態形成など様々な生命現象に関与していることが明らかにされつつある。SMYD3は大腸癌などの腫瘍で高い発現を呈する分子として同定された(Hamamoto et al, *Nat Cell Biol*, 2004; Foreman et al. *PLoS ONE*, 2011)。また、癌細胞株を用いてSMYD3の発現を抑制した癌細胞はアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制することから、SMYD3は、癌細胞の生存や増殖に重要な働きを担っていることが明らかとなっており、その阻害剤も開発されている。

また、ゼブラフィッシュを用いた機能解析では、Smyd3は心臓や骨格筋の形態形成に必須であることが報告された(Fujii T et al, *PLoS ONE*, 2011)。これらのメチル化修飾は、腫瘍形成に関わるものであり、その分子メカニズムも明らかにされつつある。

SMYD3のヒストンのメチル化は主にリシン残基に見られ、ヒストンH3ではK4、K9、K27、K36、K79、ヒストンH4ではK20がSMYD3によってメチル化修飾される。これらのメチル化修飾は他のメチルトランスフェラーゼによって修飾されるが、SMYD3はこれらのリシンではなく、新規ヒストン修飾であるヒストンH4K5をメチル化修飾する(Van Allier GS et al, *Epigenetics*, 2012)。

また、ヒストン以外にも、VEGFR1といったヒストン以外のタンパク質もメチル化修飾することが報告されている(Silva et al, *Oncogene*, 2008)。さらに、最近、SMYD3は非コードRNAのひとつであるイントロニックSMYD3 RNAとして機能している。つまり、機能性RNAとしての性質ももつことが明らかに

された(Guil S, et al, *Nat Struct Mol Biol*. 2012)。しかしながら、詳細は不明である。

2. 研究の目的

イントロニックSMYD3 RNAに関する論文は一件(Guil S, et al, *Nat Struct Mol Biol*. 2012)のみである。イントロニックSMYD3 RNAについては、以下のようなことが報告されている。

1)イントロニックSMYD3 RNAは、転写抑制に働くヒストンメチルトランスフェラーゼであるEZH2と結合する。

2)イントロニックSMYD3 RNAは、EZH2のターゲット遺伝子へのリクルートを促進する。

3)イントロニックSMYD3 RNAは、内在性のSMYD3の遺伝子発現を抑制する。

4)癌細胞にイントロニックSMYD3 RNAを過剰発現させると腫瘍形成を抑制できる。

このように、イントロニックSMYD3 RNAはSMYD3の発現を調節する因子である。SMYD3は大腸癌において、重要な働きを果たしていることから、イントロニックSMYD3 RNAもまた、大腸癌形成において、重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、イントロニックSMYD3 RNAの大腸癌における詳細な機能は不明である。

近年、転写されたRNAの多くがタンパクに翻訳されない非コードRNAであり、遺伝子量の補正や翻訳の抑制、遺伝子発現制御因子として機能することが明らかにされている。特に、非コードRNAのひとつであるmicroRNAは20数塩基の短いRNAであり、遺伝子の3'非翻訳領域に結合して転写・翻訳抑制に関与しており、がんを含め多くの疾患との関連が知られている。最近、遺伝子のイントロン部分の転写産物も見出され、これはイントロニックRNAと呼ばれており、その機能および疾患との関係はほとんど明らかになっていない。

本研究の目的は、SMYD3のタンパク質としての働きではなく、機能性RNAとしての働き

を明らかにすることである。また、イントロニック RNA の生物学的意義を解明することは学術的に意義のある研究である。

本研究により、大腸癌の発癌に関わる SMYD3 の発現制御機構の一部を明らかにすることができ、これは新たな大腸癌の発癌機構新を明らかにできる。本研究を通して得られる結果は、大腸癌の発癌機構の新規のメカニズムの解明につながり、その成果は有用な大腸癌の予防法や治療法の開発に寄与できるものと期待できる。

3. 研究の方法

大腸癌組織におけるイントロニック SMYD3 RNA の発現

イントロニック SMYD3 RNA が大腸癌でどのような発現様式を示すのか明らかにするために、市販の大腸癌組織がプロットしてある Tissue micro array を用いて、in situ ハイブリダイゼーションを行った。今回、ターゲットとした配列は EZH2 が結合する部位で 36 塩基と通常の in situ ハイブリダイゼーション で使用するには非常に短い。そこで、本研究では、マイクロ RNA などの短い RNA を検出するために用いられる核酸との結合親和性が高い Locked Nucleic Acid を利用したプローブを使用した。今回、Locked Nucleic Acid を利用したプローブを使用するのが初めてであったので、U6 small nuclear RNA をターゲットとするプローブをポジティブコントロールとして条件検討を行った。

蛍光タンパク質を導入した大腸癌細胞株の作製

動物モデルを用いた転移に関わる表現型解析を行うために蛍光タンパク質を導入した大腸癌株とした。目的の蛍光タンパク質を発現するウィルスベクターを用いて、大腸癌細胞株のゲノムに導入した。セルソーターを用いて、目的の蛍光タンパク質を発現する大腸癌細胞株を選別した。

イントロニック SMYD3 RNA 欠損細胞株の作

製

イントロニック SMYD3 RNA の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いてイントロニック SMYD3 RNA の欠損大腸癌細胞株の作製を行った。目的の gRNA は、T7 ポリメラーゼ認識配列、目的の crRNA と tracrRNA 配列を含むオリゴを設計し、PCR によって増幅したものをを用いて、T7 ポリメラーゼで作製した。この gRNA と CAS9 を発現するプラスミドを目的の大腸癌細胞株に導入し、目的の細胞株を作製した。

4. 研究成果

大腸癌組織におけるイントロニック SMYD3 RNA の発現

イントロニック SMYD3 RNA が大腸癌における働き機能を調べるために、まず、in situ ハイブリダイゼーション条件を設定するために、ポジティブコントロールとして U6 small nuclear RNA をターゲットしたプローブを用いて条件検討を行い、前処理、ハイブリダイゼーション、洗浄、シグナルの検出条件を決定した。次に、決定した条件をもとに市販の大腸癌組織がプロットしてある Tissue micro array を用いて、in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、転移を示した組織で、イントロニック SMYD3 RNA の発現が低下している傾向を示した。この結果は、イントロニック SMYD3 RNA が SMYD3 を制御すること (Guil S, et al, *Nat Struct Mol Biol.* 2012) SMYD3 の過剰発現が転移を促進する報告 (Cock-Rada AM et al, *Cancer Res.* 2012) と一致する。今後、別コホートの Tissue micro array を用いて確認する。

蛍光タンパク質を導入した大腸癌細胞株の作製

転移モデル動物用いた転移に関わる表現型解析を行うために蛍光タンパク質を導入した大腸癌株の作製を行い、蛍光タンパク質を発現する大腸癌細胞株を樹立した。しかし

ながら、強い蛍光タンパク質を発現する大腸癌細胞株は得られなかったため、今後、蛍光色素で染色した大腸癌細胞株の使用も考える。

イントロニック SMYD3 RNA 欠損細胞株の作製

イントロニック SMYD3 RNA の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いてイントロニック SMYD3 RNA の欠損大腸癌細胞株の作製を行った。non-coding RNA はタンパク質をコードする遺伝子とは異なり、数塩基の欠損によるフレームシフトでは、その機能を破壊できない。そこで、目的の遺伝子領域をすべて欠損させるために2か所にガイド RNA を設定した。しかし、目的の遺伝子領域の欠損効率が悪く、目的の細胞を得ることができなかった。今後、CRISPR/Cas9 システムだけでなく、shRNA を用いたノックダウン法についても検討を行っていき、さらに、モデル動物を用いた実験も行っていく予定である。

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4件)

1. Takehara K, Sakamoto K, Takahashi R, Kawai M, Kawano S, Munakata S, Sugimoto K, Takahashi M, Kojima Y, Fukunaga T, Kajiyama Y, Kawasaki S. Superior Mesenteric Artery Syndrome Improved by Enteral Nutritional Therapy according to the Controlling Nutritional Status Score. Case Rep Gastroenterol. 2017 Nov 29;11(3):729-735. doi: 10.1159/000484129. (査読有)
2. Takahashi R, Sakamoto K, Tomiki Y, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Kawai M, Okazawa Y, Makino Y. Two-stage laparoscopic curative resection for synchronous multiple colorectal cancers: A case report. Asian J Endosc Surg. 2016 Nov;9(4):300-302. doi: 10.1111/ases.12293. (査読有)
3. Takahashi R, Ichikawa R, Ito S, Mizukoshi K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Yao T, Sakamoto K. A case of metastatic carcinoma of anal fistula caused by implantation from rectal cancer. Surg Case Rep. 2015 Dec;1(1):123.

doi: 10.1186/s40792-015-0125-2. (査読有)
4. Okazawa Y, Takahashi R, Mizukoshi K, Takehara K, Ishiyama S, Sugimoto K, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Yao T, Sakamoto K. A case of clear cell adenocarcinoma arising from endometriosis of the rectum treated by laparoscopic surgery. Int J Surg Case Rep. 2014;5(12):979-83. doi:10.1016/j.ijscr.2014.10.034. (査読有)

[学会発表](計8件)

1. 高橋里奈 小島 豊 五藤倫敏 坂本一博 : 直腸癌術後における肛門機能の短期成績 第34回日本ストーマ・排泄リハビリテーション学会 総会 2017年2月17日~18日
2. 高橋里奈 雨宮浩太 萩原俊昭 河野眞吾 茂木俊介 塚本亮一 市川亮介 呉一眞 河合雅也 丹羽浩一郎 石山隼 杉本起一 高橋 玄 小島 豊 五藤倫敏 奥澤淳司 富木裕一 坂本一博 : 直腸癌術後における肛門機能の短期成績, 第71回日本大腸肛門病学会学術集会, 伊勢, 2016年11月18日~19日
3. Rina Takahashi, Kazuhiro Sakamoto, Yuichi Tomiki, Atsushi Okuzawa, Michitoshi Goto, Yutaka Kojima, Hirohiko ,Shun Ishiyama, Kiichi Sugimoto, Hisashi Ro, Laparoscopic Sigmoid Colon Resection by Use of Needle Forceps and Transanal Specimen Extraction, 15th World Congress of Endoscopic Surgery, 2016年11月9日~12日
4. 高橋里奈 牧野有里香 茂木俊介 塚本亮一 呉一眞 水越幸輔 河合雅也 丹羽浩一郎 石山隼 杉本起一 神山博彦 高橋 玄 五藤倫敏 奥澤淳司 富木裕一 坂本一博 : 大腸癌における血清 p53 抗体の検討, 第84回大腸癌研究会, 熊本, 2016年1月15日
5. 高橋里奈 呉一眞 盧尚志 水越幸輔 石山隼 柳沼行宏 小島 豊 五藤倫敏 富木裕一 坂本一博 : 細径鉗子と

経肛門的腫瘍摘出を用いた腹腔鏡下 S 状結腸切除術の 1 例, 第 12 回 Needlescopic Surgery Meeting, 福岡, 2015 年 1 月 31 日

6.高橋里奈 塚本亮一 市川亮介 伊藤慎吾 呉 一眞 本庄薫平 盧 尚志 青木順 岡澤 裕 水越幸輔 河合雅也 嵩原一裕 丹羽浩一郎 石山 隼 神山博彦 高橋 玄 柳沼行宏 小島 豊 五藤倫敏 奥澤淳司 富木裕一 坂本一博 : 単孔式内視鏡下に修復しえた左上腰ヘルニアの 1 例, 第 13 回日本ヘルニア学会学術集会, 愛知, 2015 年 5 月 23 日

7.高橋里奈 塚本亮一 市川亮介 伊藤慎吾 呉 一眞 本庄薫平 盧 尚志 青木順 岡澤 裕 水越幸輔 河合雅也 嵩原一裕 宗像慎也 石山 隼 神山博彦 高橋 玄 柳沼行宏 小島 豊 五藤倫敏 坂本一博 : 当院における急性虫垂炎に対する腹腔鏡手術, 第 51 回日本腹部救急医学会総会, 京都, 2015 年 3 月 5 日~6 日

8.高橋里奈 茂木俊介 塚本亮一 市川亮介 呉 一眞 盧 尚志 青木 順 岡澤裕 水越幸輔 嵩原一裕 宗像慎也 丹羽浩一郎 石山 隼 杉本起一 高橋 玄 小島 豊 五藤倫敏 奥澤淳司 富木裕一 坂本一博 : 直腸癌術後における肛門機能の短期成績, 第 70 回日本大腸肛門病学会学術集会, 名古屋, 2015 年 11 月 13 日~14 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 里奈 (TAKAHASHI, Rina)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号 : 80639112