

2014年度「プロジェクト未来」研究進捗状況報告書

研究課題名：がん細胞における機能性非翻訳 RNA を介したエピゲノム修飾制御に関する研究

研究者：近藤 豊

所属：名古屋市立大学 大学院医学研究科 遺伝子制御学

【研究成果の概要】

脳腫瘍（グリオブラストーマ：GBM）で腫瘍化に関与している長鎖非翻訳 RNA（long non-coding RNA：lncRNA）の網羅的解析、およびその機能解析を行なった。さらに lncRNA に対する核酸医薬の可能性についての検討を行った。Notch シグナルの下流で制御されている lncRNA として網羅的解析および in silico 解析から TUG1 を同定した。また生物種を越えて進化的に遺伝子配列が保存された lncRNA は重要な機能を持つ可能性が高いと考え、in silico 解析から LINCX を同定した。それぞれの lncRNA に対してアンチセンス核酸の有用性を検討した結果、高い抗腫瘍効果を示すことを見出した。

【研究の背景】

GBM は、悪性脳腫瘍のうち最も高頻度に見られる極めて予後不良な腫瘍である。浸潤性が強く化学療法や放射線治療が併用されるが必ずしも治療効果は高くない。そのため GBM に対する新たな有効な治療法の開発は急務であり、腫瘍細胞の維持に特異的で必須な分子・パスウェイを解明する必要がある。

申請者らはこれまでタンパク質に翻訳されない lncRNA が、GBM 細胞特異的に発現し、複数のエピゲノム関連蛋白の”結合の場”となり、GBM 形成に関わることを見出した。これまで lncRNA の発がんへの関与が着目されているが詳細なメカニズムは不明な点が少ない。また lncRNA に対するがん核酸医薬およびそれら新規メカニズムを標的とする創薬はいまだ各製薬企業も取り組めておらず、実際の臨床検体における lncRNA の生物学的意義を解明できずにいる。

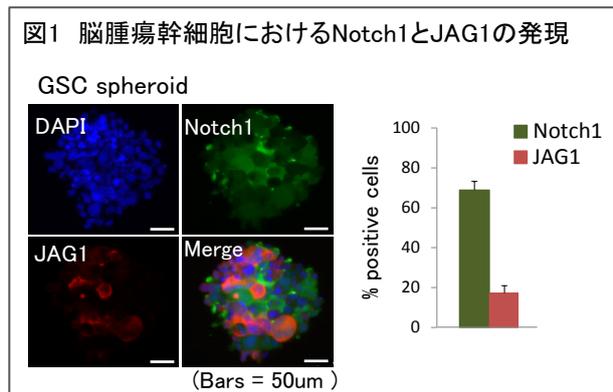
そこで本研究では、がん細胞の幹細胞性維持に重要な Notch シグナルの下流で制御される lncRNA (TUG1) の同定を行いそのメカニズムにつき詳細を明らかにすることを目的とした。さらに脳腫瘍の形成に関わる新規 lncRNA を同定しその機能解析を行なうことを目指した。これらの lncRNA を標的とすることで、新規がん治療法の開発の基盤となることができることから、核酸医薬の可能性について検討を行った。

【結果】

① Notch シグナルに誘導される lncRNA の絞り込み

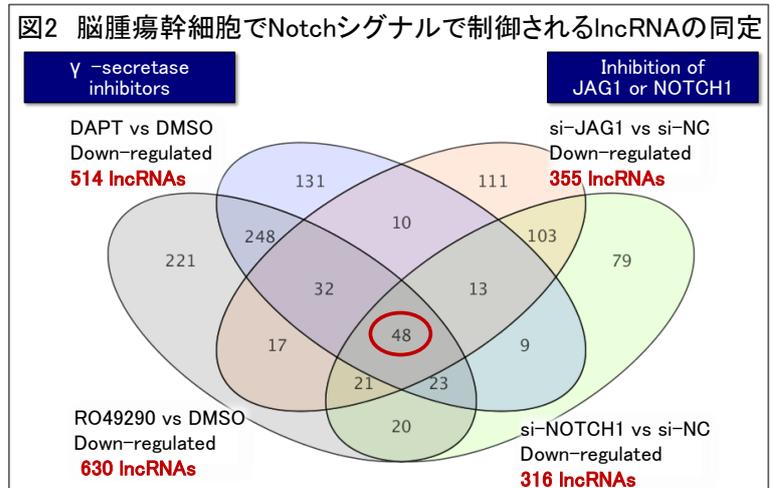
脳腫瘍幹細胞（GSC）における Notch1 およびそのリガンド JAG1 の発現状態を免疫染色で確認した。Notch1 陽性細胞と JAG1 陽性細胞は排他的関係にあった（図1）。

脳腫瘍幹細胞の維持には、Notch シグナルの重要性が報告されている。そこで Notch1 および JAG1 に対する siRNA、または、Notch シグナルの阻害として働く γ セクレターゼ阻害薬 (DAPT, RO4929097) で GSC を処理し、発現が減少する lncRNA を lncRNA マイクロアレイを用いて解析した (図 2)。Notch シグナルの阻害により 48



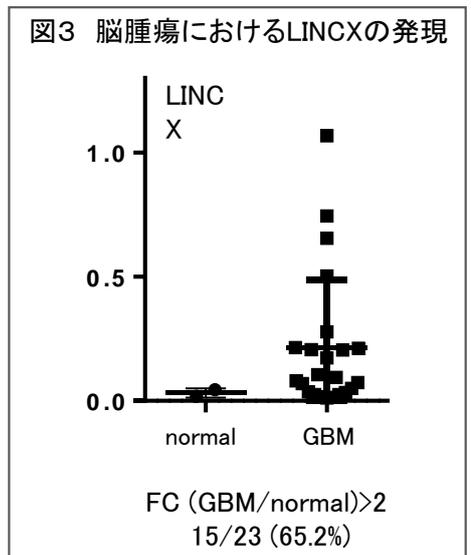
の lncRNA の発現が低下した。

これまでに GSC の 3 細胞株を用いて RNA-seq を行った結果、Notch 応答配列を有する 64 の lncRNA が 3 つの細胞株で共通して高発現であった。lncRNA マイクロアレイと RNA-seq の結果を対比した結果、TUG1 のみが GSC で高発現を示し、Notch の下流で制御させている lncRNA として同定できた。



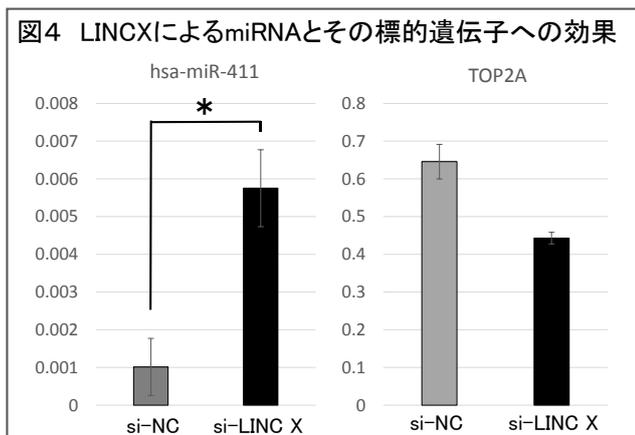
② 膠芽腫形成に関わる新規 long non-coding RNA の同定

生物種を越えて進化的に遺伝子配列が保存された lncRNA は少なく重要な機能を持つ可能性が高い。公共のデータベース上に登録されている 15,876 の lncRNA から、ヒトとマウスで保存された塩基配列 (200bp 以上で 80%以上の相同性) を有する 177 の lncRNA を同定した。RNA sequencing の結果より、そのうち 3 つの lncRNA (LINCX, RP11-553L6.5, MEG3) は膠芽腫細胞株で高発現を示した (膠芽腫細胞 FPKM>10、Fold change (膠芽腫/正常脳神経細胞)>2)。膠芽腫形成マウスモデルを用いて 3 つの lncRNA の発現を解析した結果、LINCX は発がん早期より発現が上昇しており、特に腫瘍形成期には正常の 10 倍以上の発現を示した。ヒト膠芽腫 (n=23) では、3 つの lncRNA のうち LINCX は最も高



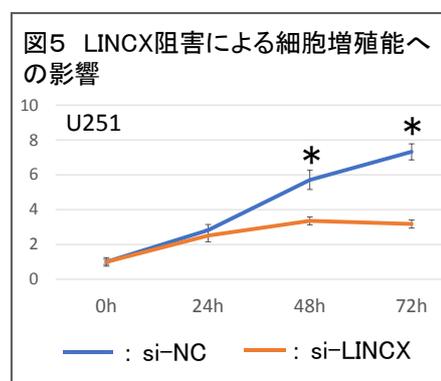
頻度に膠芽腫症例 (18 例;78.2%) で発現上昇が見られた(図 3)。

LINCX には miR-411-5p と共通のシードシーケンスが存在し、siRNA を用いた LINCX の発現抑制により miR-411-5p の発現増加と細胞増殖の抑制が観察された。さらに miR-411-5p の標的遺伝子である TOP2A の蛋白発現が抑制された (U251 脳腫瘍細胞株、*, $P < 0.01$ 、図 4)。



③ TUG1 の阻害および LINCX の阻害は共に増殖抑制に働く

脳腫瘍幹細胞 (GSC) のマウス皮下移植モデルで TUG1 に対する siRNA 治療が腫瘍縮小に有効であることを見出した。さらに今回同定した LINCX に対して、siRNA 処理により細胞増殖能が顕著に抑制されることを見出した (MTT アッセイ、*, $P < 0.01$ 、図 5)。



【考察】

がん細胞の幹細胞性の維持機構として重要な Notch シグナルに誘導される TUG1 を同定した。Notch シグナルはがん幹細胞ニッチでの機能が報告されており、その下流で発現調節される TUG1 は周囲環境に応じて細胞の性質を変化させる可能性が高い。特に TUG1 はエピゲノム修飾酵素との相互作用が報告されていることから、今後 TUG1 とエピジェネティック機構との関連につきより詳細に解析を行なう予定である。また今回、膠芽腫の形成に関わる LINCX を同定した。TOP2A は DNA 複製の役割を担い腫瘍形成に関わるタンパク質の一つであるが、LINCX は miR-411-5p の発現調節を介して TOP2A の発現亢進に寄与している可能性が示唆された。

このように次世代のがん治療の標的として lncRNA は有力な候補分子になり得ると考える。適切なドラッグデリバリーシステムと組み合わせることにより、今後脳腫瘍に対する核酸医療の開発に向けた研究を展開する予定である。