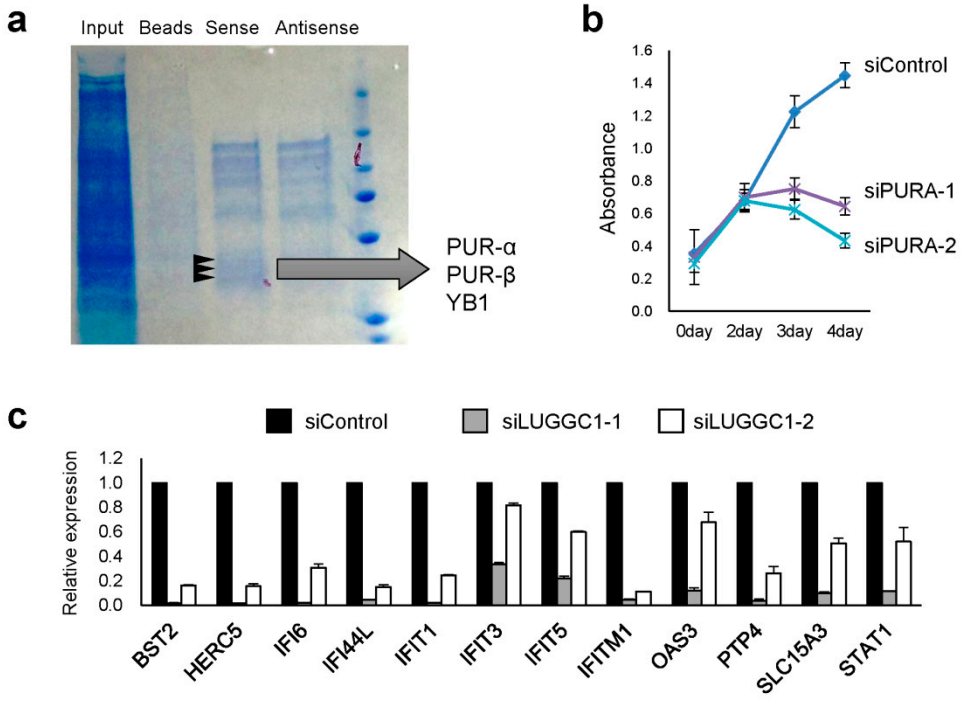
49　慢性炎症からの発がんに関与する長鎖non-coding RNAの解析	鈴木　拓

【目的】近年、長鎖非コードRNA（lncRNA）と疾患とのつながりが注目されている。我々は、胃がん関連lncRNAを解析することで炎症からの発がんメカニズムを解明し、診断・治療法の開発につなげることを目指している。これまで我々は、健常者と胃がん患者の胃粘膜のエピゲノム解析から、胃がん背景粘膜で転写活性化するlncRNAとしてLUGGC1（LncRNA Upregulated in Gastritis and Gastric Cancer 1）を同定し、LUGGC1ががん遺伝子的に機能することを見いだした。本研究では、LUGGC1の相互作用因子および下流標的を明らかにすることで発がんメカニズムを解明し、診断・治療法の開発につなげることを目的とした。

【方法】胃がん細胞においてLUGGC1と相互作用するタンパクを同定するため、RNAプルダウンおよび質量分析を行った。LUGGC1の下流標的を同定するため、胃がん細胞においてLUGGC1のノックダウンが遺伝子発現プロファイルに与える影響をマイクロアレイ解析し、定量RT-PCRで結果を検証した。さらに胃がん以外の他がん種におけるLUGGC1の発現および増殖に与える影響を解析した。

【結果】RNAプルダウンと質量分析から、LUGGC1と相互作用するタンパクとしてPUR-α（purine-rich element binding protein A）、PUR-β（purine-rich element binding protein B）、YB1（Y box binding protein 1）を同定した。これらはいずれもDNA／RNA結合タンパクとして知られており、かつPUR-α、YB1のノックダウンは胃がん細胞の増殖を抑制した。また遺伝子発現プロファイルの解析から、LUGGC1が免疫応答遺伝子の発現を誘導することが示された。さらに我々は、LUGGC1が乳がん、肝がん、大腸がんなど様々ながん種においても高発現していること、そしてLUGGC1ノックダウンが乳がん・肝がん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。以上の結果から、LUGGC1がPUR-α、YB1などと相互作用することで機能すること、LUGGC1が免疫応答に関与しうること、そして胃がんをはじめ様々ながん種において治療標的となりうることが示された。

LUGGC1と相互作用するタンパクおよび下流標的の同定



49. 慢性炎症からの発がんに関与する長鎖 non-coding RNA の解析

鈴木　拓

札幌医科大学 医学部 分子生物学講座

Key words：長鎖非コード RNA，lncRNA，胃がん，エピゲノム，免疫応答

緒　言

近年、長鎖非コード RNA（lncRNA）と疾患とのつながりが注目されているが、多くの lncRNA はいまだ機能が不明である。慢性炎症からの発がんは胃・食道・肝臓など様々な臓器に見られ、その対策はがん罹患率・死亡率の低下につながる。本研究は、我々が同定した胃炎・胃がん関連 lncRNA を解析することで炎症からの発がんメカニズムを解明し、診断・治療法の開発につなげることを目的とした。

これまで我々は、主に消化器がんにおけるエピゲノムおよび non-coding RNA の異常を解析することで、疾患メカニズム解明とその臨床応用に関する研究を行ってきた［1］。近年では胃がんにおける DNA メチル化および microRNA に着目し、腫瘍抑制的な miR-34b/c 遺伝子が DNA メチル化異常により不活性化されること、DNA メチル化異常は胃炎の段階で発生し、胃がんリスクと相関することを明らかにした［2，3］。また大腸がんにおいてエピジェネティックな不活性化を受ける lncRNA 遺伝子を網羅的に探索し、新規大腸がん関連 lncRNA を報告している［4］。

今回我々は、健常者の胃粘膜と胃がん患者の非がん部胃粘膜におけるエピゲノムおよび lncRNA 発現の違いに着目して解析を行った。胃粘膜におけるエピゲノムを網羅的に解析し、数万の lncRNA 遺伝子プロモーターのヒストン修飾パターンを比較することで、胃がん高リスク群の胃粘膜で転写活性化する lncRNA を複数同定した。その一つである LUGGC1（LncRNA Upregulated in Gastritis and Gastric Cancer 1）は胃がん細胞で高発現し、増殖・遊走・浸潤能を促進することが実験的に確認されたことから、発がんにおいて重要な役割を担うと考えられた。LUGGC1 と相互作用する分子および下流標的を明らかにすることで、発がんメカニズムを解明すると共に、新たな診断法や分子標的治療法の開発につなげられると着想した。

方　法

1.　RNA プルダウンおよび質量分析

BrU ラベルした LUGGC1 RNA あるいは LUGGC1 のアンチセンス RNA を *in vitro* 転写により生成し、胃がん細胞株の抽出液と混合してインキュベートした。その後、抗 BrdU 抗体により RNA とタンパクの複合体をプルダウンし、SDS-PAGE で分離したのち、LUGGC1 と特異的に結合するタンパクをゲルから切り出して質量分析した。同定したタンパクの相互作用を、共免疫沈降とウエスタンブロッティングにより検証した。

2. マイクロアレイ解析

LUGGC1 に対する siRNA を、Lipofectamine RNAi MAX（Thermo Fisher Scientific）を用いて胃がん細胞にトランスフェクトし、48 時間後に RNA を抽出した。遺伝子発現を SurePrint G3 Human GE アレイ（Agilent）によって解析した。 アレイデータを Gene Spring GX（Agilent）により解析した。

3. インターフェロン応答遺伝子の発現解析

LUGGC1 に対する siRNA を Lipofectamine RNAi MAX を用いて胃がん細胞にトランスフェクトし、免疫応答遺伝子の発現に与える影響を定量 RT-PCR により解析した。また LUGGC1 を安定的に過剰発現する胃がん細胞を作製し、同様の定量 RT-PCR 解析を行った。さらに LUGGC1 のノックダウンおよび過剰発現が STAT1 に与える影響をウエスタンブロッティングにより解析した。

4. *in vitro* および *in vivo* の増殖アッセイ

LUGGC1 および LUGGC1 と相互作用するタンパクに対する siRNA を Lipofectamine RNAi MAX を用いて胃がん細胞にトランスフェクトし、細胞増殖に与える影響を Cell Counting Kit-8（Dojindo）により解析した。また胃がん細胞をヌードマウスの皮下に移植し、LUGGC1 に対する siRNA を経時的に局所注射することで *in vivo* における xenograft 形成能を評価した。さらに LUGGC1 を安定発現する胃がん細胞をヌードマウスの皮下に移植して xenograft 形成能を評価した。

結　果

1. LUGGC1 と相互作用するタンパクの同定

胃がん細胞において LUGGC1 と相互作用するタンパクを探索するため、BrU ラベルした LUGGC1 あるいは LUGGC1 のアンチセンス RNA と胃がん細胞株 HSC45 の抽出液を混合し、RNA プルダウンを行った。沈降したタンパクを SDS-PAGE で分離し、LUGGC1 のみに観察されるバンドを切り出して質量分析した結果、PUR-α（purine-rich element binding protein A）、PUR-β（purine-rich element binding protein B）、YB1（Y box binding protein 1）を同定した（図 1a）。共免疫沈降とウエスタンブロッティングにより PUR-α と YB1 が胃がん細胞において相互作用すること、そしてその相互作用は RNase による RNA 分解処理後に消失することが確認され、これらのタンパクが LUGGC1 を介して複合体を形成している可能性が示唆された（図 1b）。

また PUR-α および YB1 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし、胃がん細胞株 HSC45 の増殖能に与える影響を解析した結果、PUR-α、YB1 いずれのノックダウンも増殖を抑制することが明らかとなった（図 1c）。このことから LUGGC1 の機能は PUR-α、YB1 を介している可能性が示された。



図 1. LUGGC1 と相互作用するタンパクの同定

a）RNA プルダウン後に SDS-PAGE を行い、LUGGC1 と相互作用するタンパクを質量分析した。

b）PUR-α と YB1 の相互作用を免疫沈降とウエスタンブロッティングで検証した。

c）PUR-α のノックダウンが胃がん細胞株 HSC45 の増殖に与える影響を解析した。

2. LUGGC1 の下流標的の探索

LUGGC1 の下流標的を明らかにするため、胃がん細胞株 HSC45 の LUGGC1 をノックダウンし、遺伝子発現プロファイルに与える影響をマイクロアレイで解析した。その結果、LUGGC1 ノックダウンにより発現低下する遺伝子を 649 個同定した（図 2a）。Gene Ontology 解析の結果、これらの遺伝子には Antiviral defense（$P = 1.0 \times 10^{-19}$）、Type Ⅱ interferon signaling pathway（$P = 1.64 \times 10^{-15}$）、Defense response to virus（$P = 1.47 \times 10^{-14}$）、Innate immunity（$P = 3.55 \times 10^{-10}$）など免疫応答に関与するものが多く含まれることが示された。特に IFIT1、IFITM1 など複数の免疫応答遺伝子が影響を受けることに着目し、定量 RT-PCR による検証を進めた結果、多くの免疫応答遺伝子の発現が LUGGC1 のノックダウンによって低下することを見いだした（図 2b）。さらに LUGGC1 を安定的に過剰発現する胃がん細胞株 SNU638 を作製し、免疫応答遺伝子群の発現が上昇することを確認した。またこれらの免疫応答遺伝子は PUR-α のノックダウンにより低下したことから、LUGGC1 と PUR-α の複合体が免疫応答遺伝子の発現制御に関

わる可能性が示唆された。さらにLUGGC1のノックダウンがSTAT1のタンパク量を低下させ、逆にLUGGC1の過剰発現はSTAT1のタンパク量とリン酸化を上昇させたことから、LUGGC1がSTAT1を活性化させることで免疫応答遺伝子の発現を誘導する可能性が示された。

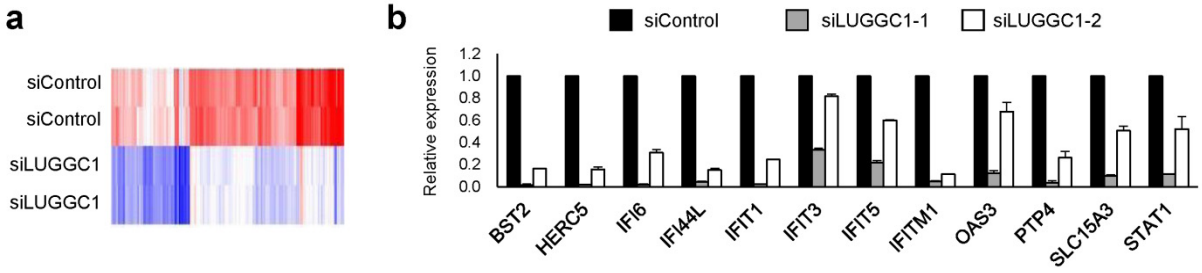


図2. LUGGC1の下流標的の探索

a）HSC45を用いてLUGGC1ノックダウン後の遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。

b）LUGGC1ノックダウンによる免疫応答遺伝子の発現抑制を定量RT-PCRで検証した。

3. *in vivo* 腫瘍形成能の解析

これまで我々はLUGGC1のノックダウンが胃がん細胞株の増殖、遊走、浸潤能を抑制することを明らかにした。次に我々は*in vivo*の腫瘍形成能に対するLUGGC1の影響を検証した。胃がん細胞株HSC45をヌードマウスの皮下に移植し、LUGGC1に対するsiRNAを経時的に局所投与した結果、LUGGC1 siRNAはcontrol siRNAと比較してxenograftの成長を抑制する効果を示した。さらにLUGGC1を安定的に過剰発現する胃がん細胞株SNU638をヌードマウスの皮下に移植した結果、コントロールのGFP発現細胞と比較してxenograft形成の促進が認められた（図3）。これらの結果から、LUGGC1は*in vivo*の腫瘍形成能を促進することが示された。

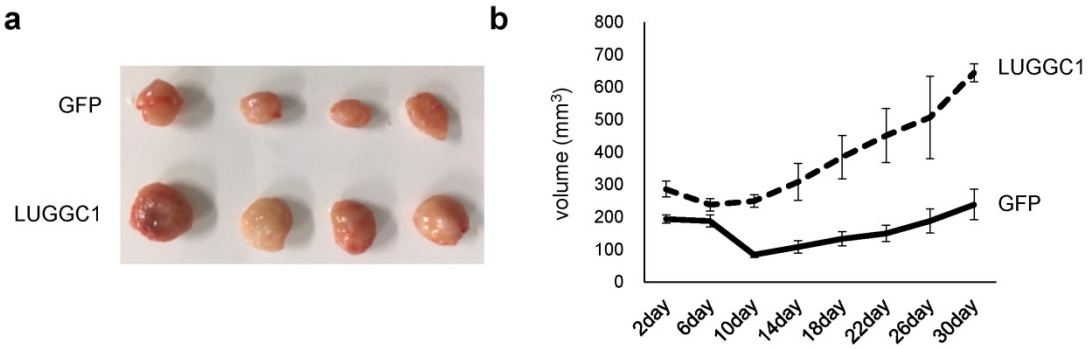


図3. *in vivo*腫瘍形成能の解析

LUGGC1あるいはGFPを安定発現するSNU638細胞を作製し、ヌードマウスに移植してxenograft形成能を評価した。

a）摘出したxenograft。

b）xenograftの腫瘍容積を経時的に計測した結果（n = 4）。

4. 他がん種における LUGGC1 の解析

LUGGC1 の他がん種における役割を明らかにするため、乳がん細胞株（n = 9）、肝がん細胞株（n = 10）、大腸がん細胞株（n =12）と、それぞれの正常組織における LUGGC1 の発現を定量 RT-PCR で解析した。その結果、乳がん細胞 8 株、肝がん細胞 5 株、大腸がん 9 株において、正常組織と比較して LUGGC1 の発現亢進が認められた（図 4a、b）。次に特に LUGGC1 発現が高レベルであった乳がん細胞 3 株、肝がん細胞 5 株、大腸がん細胞 5 株を対象に、LUGGC1 に対する siRNA をトランスフェクションして増殖能を検討した。その結果、乳がん細胞 2 株、肝がん細胞 3 株において、LUGGC1 のノックダウンが細胞増殖を抑制した（図 4c）。

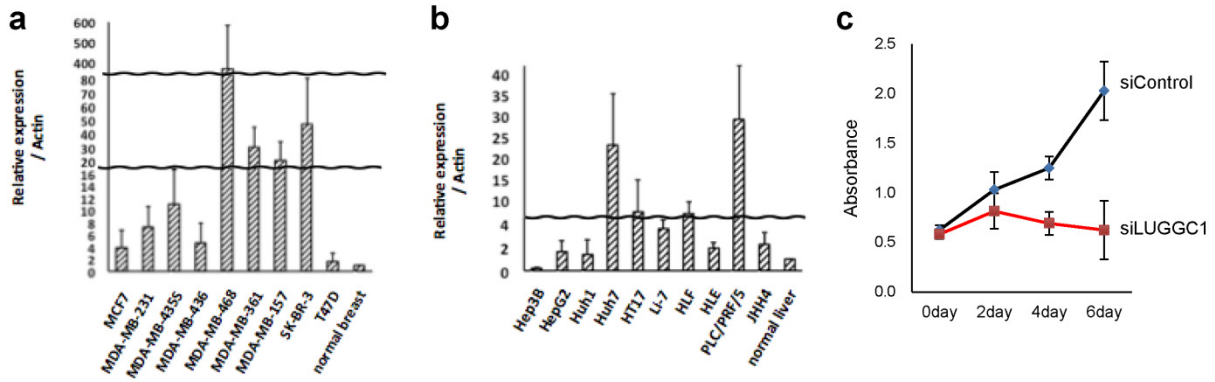


図 4. 胃がん以外のがん種における LUGGC1 の解析

a）乳がん細胞株における LUGGC1 の定量 RT-PCR 解析結果。

b）肝がん細胞株における LUGGC1 の定量 RT-PCR 解析結果。

c）LUGGC1 ノックダウンが乳がん細胞株 SK-BR-3 の増殖に与える影響の解析結果。

考　察

本研究において我々は、がんにおける LUGGC1 の機能を明らかにすべく解析を行った。LUGGC1 と相互作用するタンパクとして同定した PUR-α、PUR-β は、RNA や DNA と結合して転写、翻訳、細胞周期、細胞増殖などの制御に関わることが知られている [5]。また近年では、PUR-α が Oct4-antisense、PUR-β が linc-HOXA1 などの lncRNA と結合することが報告されている [6, 7]。YB1 は RNA 結合タンパクであり、転写制御、RNA スプライシング、翻訳制御、DNA 修復、ストレス応答など多彩な機能を持つことが知られる。さらに近年では、がん細胞において YB1 が TP53TG1 や HULC などの lncRNA と結合し、がん化に関わることが報告された [8, 9]。また PUR-α と YB1 が複合体を形成し、p53 標的遺伝子である Bax の転写を抑制するという研究報告もある [10]。これらのことから、LUGGC1 は PUR-α、PUR-β、YB1 と複合体を形成し、転写制御やその他の細胞内機能に関わっている可能性が推測された。

我々は LUGGC1 の下流標的を探索するため、胃がん細胞において LUGGC1 のノックダウンが遺伝子発現プロファイルに与える影響を解析し、多くの免疫応答遺伝子の発現が抑制されることを見いだした。これらの結果が siRNA によるアーチファクトではないことを検証するため、LUGGC1 を安定的に過剰発現する胃がん細胞株を作製し、免疫応答遺伝子群の発現上昇を確認した。さらに LUGGC1 が STAT のタンパク量およびリン酸化を上昇させ、これら免疫応答遺伝子の発現を誘導する可能性を見いだした。LUGGC1 は、胃がんの背景胃粘膜において転写活性化する領域から同定されたことから、LUGGC1 が何らかの免疫応答に関わっている可能性が推測された。慢性胃炎および胃がん発生における LUGGC1 の役割を解明するため、今後さらなる研究を推進したい。

また我々は、LUGGC1 が胃がん以外の複数のがん種において発現上昇していること、そして LUGGC1 の阻害ががん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。このことから、LUGGC1 が様々な臓器のがんにおいて治療標的となりうることが示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、札幌医科大学医学部分子生物学講座の北嶋洋志、新沼猛、山本英一郎、甲斐正広、がん研究会がん研究所がんエピゲノムプロジェクトの丸山玲緒である。

文　献

1) Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of MicroRNA genes in colorectal cancer. Cancer Res. 2011 Sep 1;71(17):5646-58. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1076.Epub 2011 Jul 6. PMID: 21734013

2) Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. Carcinogenesis. 2010 Dec;31(12):2066-73. doi: 10.1093/carcin/bgq203. Epub 2010 Oct 5. PMID: 20924086

3) Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Nosho K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. J Gastroenterol. 2014 Jul;49(7):1135-44. doi: 10.1007/s00535-013-0861-7. Epub 2013 Aug 13. PMID: 23942619

4) Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Kitajima H, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Yamano HO, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Suzuki H. A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. Sci Rep. 2016 May 24;6:26699. doi: 10.1038/srep26699. PMID: 27215978

5) White MK, Johnson EM, Khalili K. Multiple roles for Puralpha in cellular and viral regulation. Cell Cycle. 2009 Feb 1;8(3):1-7. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19182532

6) Hawkins PG, Morris KV. Transcriptional regulation of Oct4 by a long non-coding RNA antisense to Oct4-pseudogene 5. Transcription. 2010 Nov;1(3):165-175. Epub 2010 Aug 16. PMID: 21151833

7) Maamar H, Cabili MN, Rinn J, Raj A. linc-HOXA1 is a noncoding RNA that represses Hoxa1 transcription in cis. Genes Dev. 2013 Jun 1;27(11):1260-71. doi: 10.1101/gad.217018.113. Epub 2013 May 30.

8) Diaz-Lagares A, Crujeiras AB, Lopez-Serra P, Soler M, Setien F, Goyal A, Sandoval J, Hashimoto Y, Martinez-Cardús A, Gomez A, Heyn H, Moutinho C, Espada J, Vidal A, Paúles M, Galán M, Sala N, Akiyama Y, Martínez-Iniesta M, Farré L, Villanueva A, Gross M, Diederichs S, Guil S, Esteller M. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 22;113(47):E7535-E7544. Epub 2016 Nov 7. PMID: 28027578

9) Li D1, Liu X, Zhou J, Hu J, Zhang D, Liu J, Qiao Y, Zhan Q. Long noncoding RNA HULC modulates the phosphorylation of YB-1 through serving as a scaffold of extracellular signal-regulated kinase and YB-1 to enhance hepatocarcinogenesis. Hepatology. 2017 May;65(5):1612-1627. doi: 10.1002/hep.29010. Epub 2017 Mar 22.

10) Kim K, Choi J, Heo K, Kim H, Levens D, Kohno K, Johnson EM, Brock HW, An W. Isolation and characterization of a novel H1.2 complex that acts as a repressor of p53-mediated transcription. J Biol Chem. 2008 Apr 4;283(14):9113-26. doi: 10.1074/jbc.M708205200. Epub 2008 Feb 7.