

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893093

研究課題名(和文)がん発症、悪性化におけるnon-coding RNAの新しい役割

研究課題名(英文)The role of non-coding RNA in cancer initiation and cancer progression

研究代表者

寺島 農(Terashima, Minoru)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80507434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでレトロウイルス挿入変異により癌を発症したマウスから、その挿入部位を同定することにより、癌に関わる遺伝子候補が多数同定されてきた。申請者はタンパク質をコードしないnon-coding RNAもウイルス挿入標的となっており、癌に関わる遺伝子候補であることを見出した。それらのうち、急性前骨髄球性白血病での関与が推測されているNEAT1、X染色体の不活性化に関わるJPXは悪性度の高い乳癌患者、および悪性度の高い癌微小環境の1つである低酸素条件下において、その発現が低下していた。これらの結果はNEAT1、およびJPXの発現低下が乳癌の悪性化に関わる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Many cancer-related genes were identified by retroviral insertional mutagenesis. We also found non-coding RNAs are targets of retroviral integration and are therefore involved in cancer. Among them, we focused on two non-coding RNAs, NEAT1 and JPX. Previous studies showed that NEAT1 can be involved in acute promyelocytic leukemia and JPX is involved in the regulation of X chromosome inactivation. In this study, we found that NEAT1 and JPX were downregulated in high grade breast cancer patients and were downregulated in hypoxia that can enhance tumor progression. These findings suggest that downregulated-NEAT1 and downregulated-JPX may be involved in breast cancer progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌 エピジェネティクス non-coding RNA レトロウイルス挿入変異

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究グループは、マウス白血病ウイルス感染モデルマウスから発症したリンパ腫を回収し、腫瘍内のウイルス挿入部位をシーケンス解析によって同定することで、癌に関わる遺伝子を網羅的に探索してきた(1, 2)。申請者は最近、いくつかのウイルス挿入部位がタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の locus 上にも存在することを発見した(図1)。

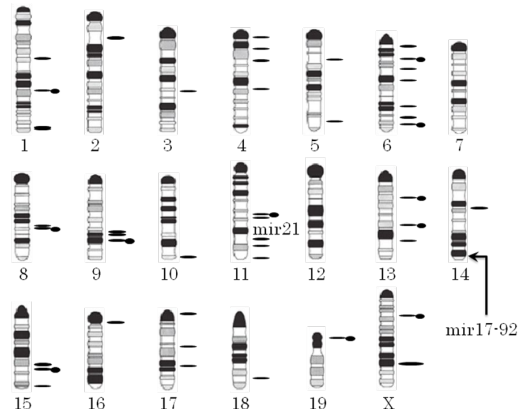


図1; ncRNAはウイルス挿入変異の標的である。miRBaseに登録されているmicroRNAのうち、ウイルス挿入の標的となる遺伝子(—)とクラスター(—●)を示す。既知のがん遺伝子 mir21、mir17-92 も含まれる。

近年、ncRNAのうちmicroRNA(長さ20~25塩基)やlncRNA(長さ200塩基以上のncRNA)は、癌の発症、悪性化に関わることが報告されている。申請者が「miRBase」データベースに登録されているmicroRNAがウイルス挿入の標的になっているか調べた結果、登録されているマウスmicroRNAのうち、約20%がウイルス挿入の標的となっていることが明らかになった(図1)。またlncRNAに関して、「lncrna db」に登録されているlncRNAのうち、約30%が標的であった。それらのncRNAの中から、申請者はNeat1とJpxを、有力な癌関連候補ncRNAとして見出した(図2)。

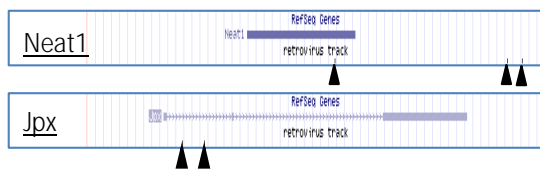


図2; ncRNAであるNeat1、Jpxもウイルス挿入変異の標的である。マウスゲノム上に、Neat1(上パネル)は3ヶ所、Jpx(下パネル)は2ヶ所、それぞれウイルス挿入部位(▲)をもつ。

Neat1とJpx共に、癌における詳細な機能はまだ報告されていなかったが、Neat1は、急性前骨髄球性白血病患者の末梢血において発現が減少していること(3)。一方Jpxは、癌にも密接に関わっているX染色体の不活性化のスイッチ分子として機能すること(4)

が報告されていた。

2. 研究の目的

本研究では、癌における機能が報告されていないウイルス標的ncRNAであるNeat1、Jpxに着目し、癌の発症、悪性化におけるNeat1、Jpxの新しい役割を明らかにする。さらにNeat1、Jpxが癌発症、悪性化の過程でエピジェネティック制御を受けているか検討し、エピジェネティクスによる癌疾患制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクス手法

The Cancer Genome Atlas (TCGA)より乳癌患者由来遺伝子発現データを抽出し、悪性度の高いトリプルネガティブ患者(TN)と、それ以外の乳癌患者(nonTN)で比較し、TN患者で発現が変化しているNEAT1、JPXを抽出する。

UCSC Genome Browserに公開されているデータを基に、GM12878ヒトリンパ芽球細胞株やHMECヒト乳腺上皮細胞株において、NEAT1、JPX遺伝子領域上のエピジェネティック状態を調べる。

(2) 定量PCR法

低酸素条件下でのNEAT1、JPXの発現パターンを、定量PCRによって検出する。

4. 研究成果

ウイルス挿入変異の標的となっているNEAT1、JPXがヒト癌組織において発現異常を示しているかどうかを調べるために、まず手始めに、申請者が所属する研究室にて確立されている、「乳癌患者のNEAT1、JPXの発現データをTCGAデータベースから抽出し、悪性度の高いトリプルネガティブ患者(TN)と、それ以外の乳癌患者(nonTN)で発現を比較する方法」を試みた。図3に示されているように、NEAT1、JPXは、nonTN患者に比べてTN患者で有意に発現が低かった。

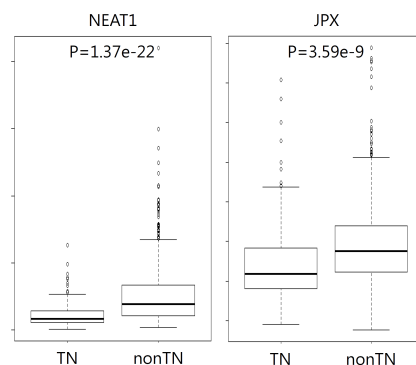


図3; NEAT1, JPXは悪性度の高い乳癌であるTN(トリプルネガティブ)患者でnonTN(その他の乳癌)患者より発現が低い。

さらに乳癌細胞株BT549を、悪性度の高い癌微小環境を構成する条件の一つである低

酸素条件下におくと、NEAT1、JPX の発現が低下した (図 4)。

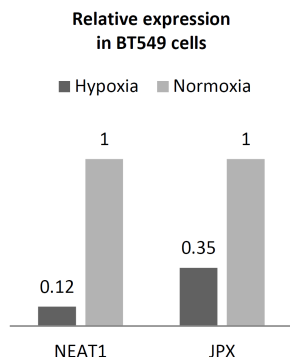


図 4; NEAT1, JPX は、低酸素条件下 (Hypoxia) で発現が低下する。BT549 は乳癌細胞株。

これらは NEAT1、JPX の発現低下が乳癌の悪性化に関わる可能性を示唆している。

次に、NEAT1、JPX がエピジェネティックな発現制御を受けているかどうかを、UCSC Genome Browser に公開されている ChIP-seq (クロマチン免疫沈降シークエンス) データを基に調べた (図 5)。

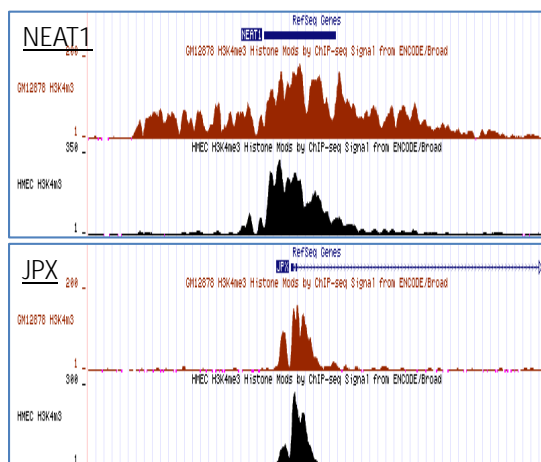


図 5 ; NEAT1、JPX 周辺は高度にヒストンメチル化されている。上段パネル; ヒト NEAT1 のヒトリンパ芽球細胞株 GM12878、およびヒト乳腺上皮細胞株 HMEC におけるヒストン H3K4 トリメチル化 (H3K4me3) の分布、下段パネル; ヒト JPX の GM12878、および HMEC における H3K4me3 の分布。NEAT1 周辺、および JPX の 1st エクソン周辺は H3K4me3 の強度が高い。

ヒトリンパ芽球細胞株やヒト乳腺上皮細胞株において、転写活性化に重要なヒストンメチル化修飾 (H3K4me3) が強く検出された。このことは NEAT1、JPX の発現はヒストンメチル化関連酵素によって調節されている可能性を示唆している。

以上より、ウイルス標的 ncRNA として同定してきた Neat1、Jpx はその発現低下が乳癌の悪性化に関わる可能性、そしてその発現調節はエピジェネティックな制御が関わっている可能性が示唆された。

引用文献

- (1) Suzuki T, et al, *Nature Genet.*, **32**, 166-174, 2002
- (2) Suzuki T, et al, *EMBO J.*, **25**, 3422-3431, 2006
- (3) Zheng C, et al, *BMC Cancer*, **14**, 693, 2014
- (4) Tian D, et al, *Cell*, **143**, 390-403, 2010

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 8 件)

Oktyabri D, Ishimura A, Tange S, Terashima M, Suzuki T. DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines. *Biochimie* 123, 20-31 (2016) 査読有り。DOI: 10.1016/j.biochi.2016.01.005.

Ishimura A, Terashima M, Tange S, Suzuki T. Jmjd5 functions as a regulator of p53 signaling during mouse embryogenesis. *Cell Tissue Res.* 363, 723-733 (2016) 査読有り。DOI: 10.1007/s00441-015-2276-7.

Terashima M, Barbour S, Ren J, Yu W, Han Y, Muegge K. Effect of high fat diet on paternal sperm histone distribution and male offspring liver gene expression. *Epigenetics* 10, 861-871 (2015) 査読有り。DOI: 10.1080/15592294.2015.1075691.

Ren J, Briones V, Barbour S, Yu W, Han Y, Terashima M, Muegge K. The ATP binding site of the chromatin remodeling homolog Lsh is required for nucleosome density and de novo DNA methylation at repeat sequences. *Nucleic Acids Res.* 43, 1444-1455 (2015) 査読有り。DOI: 10.1093/nar/gku1371.

Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. JARID2 is involved in transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung and colon cancer cell lines. *PLoS One* 9, e115684 (2014) 査読有り。DOI: 10.1371/journal.pone.0115684.

Oktyabri D, Tange S, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal

transition of cancer cells induced by TGF- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 124-130 (2014) 査読有り。
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.082.

Yu W, McIntosh C, Lister R, Zhu I, Han Y, Ren J, Landsman D, Lee E, Briones V, Terashima M, Leighty RM, Ecker JR, Muegge K.
Genome-wide DNA methylation patterns in LSH mutant reveals de-repression of repeat elements and redundant epigenetic silencing pathways. *Genome Res.* 24, 1613-1623 (2014) 査読有り。
DOI: 10.1101/gr.172015.114.

Yu W, Briones V, Lister R, McIntosh C, Han Y, Lee EY, Ren J, Terashima M, Leighty RM, Ecker JR, Muegge K.
CG hypomethylation in Lsh-/- mouse embryonic fibroblasts is associated with de novo H3K4me1 formation and altered cellular plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 5890-5895 (2014) 査読有り。
DOI: 10.1073/pnas.1320945111.

〔学会発表〕(計3件)

Terashima M, Tange S, Oktyabri D, Ishimura A, Suzuki T.
「JARID2 is involved in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal-transition of cancer cells.」第38回分子生物学会年会 (神戸、2015年12月)

Terashima M, Barbour S, Ren J, Yu W, Han Y, Muegge K.
「父親の高脂肪食摂取が自身の精子ヒストンおよび子に及ぼす影響。」第2回北陸エピジェネティクス研究会 (富山、2015年11月)

Terashima M, Yu W, Ren J, Han Y, Muegge K.
「Paternally transgenerational epigenetic effects on high-fat diet-induced obesity in mice」日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム (石川、2015年1月)

〔図書〕(計1件)

Han Y, Ren J, Yu W, Terashima M, Muegge K.
Epigenetics and Dermatology. *Academic Press* Chapter 7, 113-135 (2015) 査読有り。

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/Genomics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 農 (TERASHIMA MINORU)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 80507434

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし