

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24590489  
 研究課題名(和文)新規 lincRNA の腫瘍生物学的形質への関与

研究課題名(英文) Involvement of lincRNA in carcinogenesis

## 研究代表者

柴崎 晶彦 (Shibazaki, Masahiko)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20445109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：非翻訳RNAは腫瘍の増悪化に関与することが知られている。本研究で、非翻訳RNAの一種であるmiR-10bとHOTAIRがHOXD10遺伝子の発現を抑制し、卵巣がんの転移能を制御することを明らかとした。また、悪性黒色腫細胞、臨床検体で、KEAP1遺伝子についての新規フレームシフト変異を見出した。その結果、NRF2が恒常的に安定化すること、各種抗がん剤に対して耐性を獲得することを明らかにした。さらに肺がん培養細胞株での遺伝子発現相関の解析から、NRF2の発現と逆相関する遺伝子群も見出しており、NRF2は、腫瘍生物学的形質を獲得する過程で、何らかの非翻訳RNAの転写を介している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In epithelial ovarian cancer cell lines and primary tumors, we investigated that miR-10b and/or HOTAIR can regulate the HOXD10 expression, and that it permit gain of pro-metastatic gene products. Our results suggested that downregulation of HOXD10 expression by miR-10b overexpression might induce increase of pro-metastatic gene products, such as MMP14 and RHOC, and contribute to the acquisition of metastatic phenotypes in epithelial ovarian cancer cells. Moreover, We identified a novel single-nucleotide deletion in codon 507 of exon 4 of the KEAP1 gene that resulted in a frameshift mutation in malignant melanoma. KEAP1-FSM cells exhibited significant resistance to hydrogen peroxide and anti-cancer agents such as cisplatin and dacarbazine, which are mostly used for melanoma chemotherapy. These data suggest that NRF2 may have potential value as a therapeutic target in malignant melanoma in order to improve the rate of clinical response to anti-cancer agents.

研究分野：分子生物学

キーワード：非翻訳RNA 腫瘍化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 正常組織では、数万のトランスクリプトームの中からジェネティック/エピジェネティックな機構を利用し特定の遺伝子セットを発現することで、時間的・空間的に厳密かつ正確な分化・増殖制御がなされている。これら機構の破綻は全体的な遺伝子発現の不均衡をもたらす、腫瘍など病態に直結すると考えられている。このような仮説の基に、申請者はこれまで、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構と腫瘍の関係について、ヒストンのアセチル化を介した機構について解析してきた。

(2) エピジェネティックによる遺伝子発現制御には、DNA に結合し近傍クロマチンの修飾状態を制御する数多くのたんぱく質が関与している。エピジェネティックのマスター制御因子 REST はヒストン脱アセチル化酵素群 HDAC と CoREST を介した相互作用により標的遺伝子近傍のヒストンの脱アセチル化状態を維持しているが、同時にクロマチン制御因子ポリコームもリクルートすることが知られていた。しかしポリコームは、REST 複合体とタンパク質を介した相互作用がないことから、何らかの非タンパク性の足場の存在が示唆されていた。

(3) 近年 Tsai らにより、lincRNAs (Large intergenic noncoding RNAs) と呼ばれる非翻訳性 RNA が、ポリコームと REST を介する足場として機能することが明らかとなった (Tsai et al., *Science* 2010)。lincRNA は数千種類存在するが、機能と作用遺伝子が明らかとなっているものはわずかである。既知 lincRNA のうち、X 染色体の不活化に関与する Xist や、インプリンティングに関与する Air、Kcnq1 は、それらが転写された近傍に存在する遺伝子 (シス領域) の転写制御に関与している。

(4) 申請者は上記の背景をもとに、「腫瘍としての生物学的特性を獲得・維持する過程で、何らかの lincRNA の発現変化が関与している」と仮定し、次世代シーケンサーを用いて lincRNA の網羅的解析を行った。その結果、腫瘍生物学的意義が示唆されている遺伝子近傍に存在する lincRNA で、さらに 50 倍以上発現変化するものとして、lincRNA-S100B、linc-DHRS7、lincRNA-EPHA6 など数種類がスクリーニングされた。S100 は皮膚がんをはじめ肺や消化器の腺がんでは強い発現がみられ、p53 経路への関与が示唆されている。また DHRS7 はステロイド代謝経路の酵素で、前立腺がんとの関連が知られており、EPHA6 はネフリン受容体として脳腫瘍や乳がんでの高発現が知られている。しかしこれらの発現制御機構は不明である。多くの lincRNA がシス領域に作用する点を考慮する

と、上記の S100B、DHRS7、EPHA6 などの発現量は、近傍に位置する lincRNA で制御されている可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究は非翻訳 RNA の一種である lincRNA に注目し、腫瘍生物学的形質への関与を検討する。多くの lincRNA はクロマチン修飾因子が特定の遺伝子座にリクルートする足場として働き、その標的遺伝子は、lincRNA がコードされている領域の近傍 (シス領域) に存在する例がほとんどである。申請者は乳がん細胞株で特異的に発現が変化している lincRNA 群を、次世代シーケンサーを用い網羅的に検索した。以上の情報を基に、本研究では lincRNA の腫瘍での役割、特にエピジェネティックな遺伝子発現制御との関連を解析することで、lincRNA は治療の標的となり得るか基礎的な知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 各種腫瘍の培養細胞株を用い、対象となる lincRNA を siRNA 法によりノックダウンもしくは強発現した場合について標的遺伝子の下流シグナルを解析することで、lincRNA の過不足が腫瘍としての形質にどの程度影響するか評価する。

(2) 各種腫瘍の手術検体を用いた検討

外科的に切除された新鮮検体から totalRNA を抽出し cDNA を合成する。それを用い、本研究により腫瘍化に関連することが明らかになった lincRNA について、その存在量を RT-PCR 法により比較する。本研究に用いる予定の totalRNA は、現段階で悪性黒色腫由来、脳腫瘍由来、乳がん由来、卵巣癌由来のものがそれぞれ利用可能である。その利用に際しては、学内の倫理規定に則った手続きを経る。

## 4. 研究成果

「HOTAIR と miR-10b は卵巣がんの浸潤能を制御する」

(1) lincRNA の一種である HOTAIR は、クロマチン修飾状態を制御する因子の足場として働き、一部腫瘍での高発現が認められる。申請者は、次世代シーケンサーの結果を基に、卵巣がんにおいて、HOTAIR が腫瘍生物学的形質にどのような変化をもたらすか検討した (図 1)。その結果、一部腫瘍細胞株において、HOTAIR の発現程度を siRNA 法により減弱することによって、細胞遊走能が有為に抑制されることを見出した (図 2)。すなわち、腫瘍生物学的形質として重要な浸潤能の制御に、HOTAIR が積極的に関与していることが示唆された。

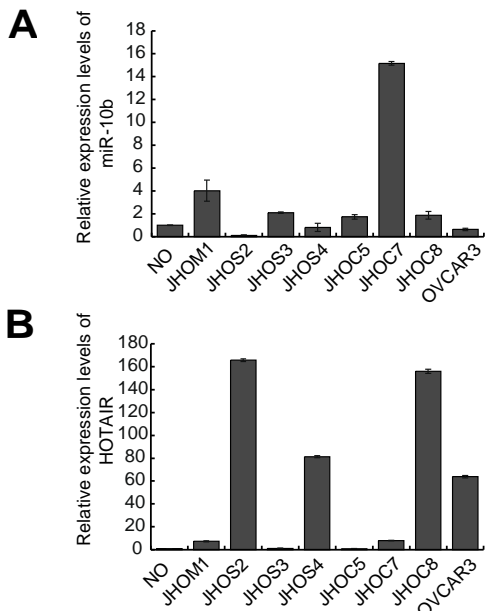


図1 卵巣がん細胞株における HOTAIR と miR-10b の発現多様性

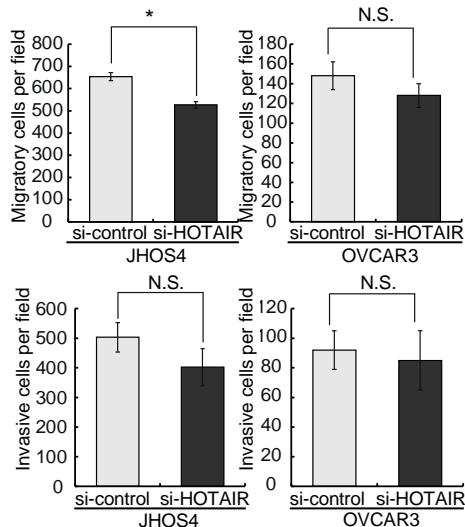


図2 HOTAIR の遊走能、浸潤能への関与

(2) 一方、浸潤能制御に HOTAIR が積極的に関与していない腫瘍細胞株では、非翻訳 RNA の一種である、microRNA のうち、miR-10b が主に関与していることを見出した。microRNA は標的遺伝子の非翻訳領域に結合し、標的遺伝子の翻訳を抑制することが知られている。miR-10b の標的遺伝子として知られる HOXD10 は形態分化に関与する遺伝子群の一種であり、ある種の腫瘍細胞において浸潤能を制御していることが知られている。本研究において、miR-10b を siRNA 法により、減弱させると HOXD10 タンパク質が増加すること、逆に miR-10b を高発現させることで、HOXD10 タンパク質が増加することから、HOTAIR が関与しない腫瘍細胞株では miR-10b が HOXD10 タンパク質の発現量を制御することにより、結果的に浸潤能を制御していることが明らかとなった(図3)。

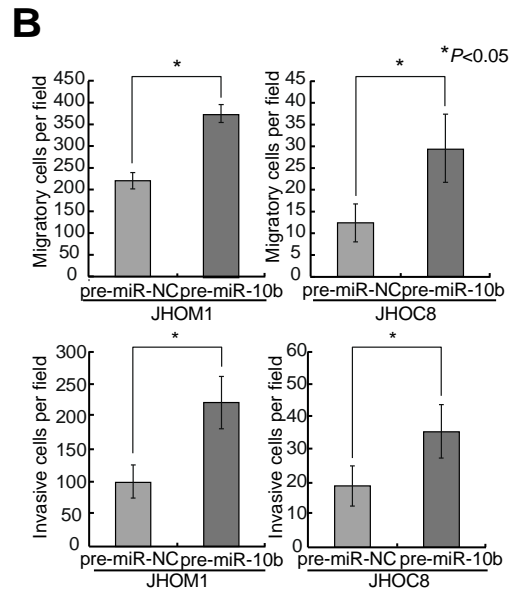
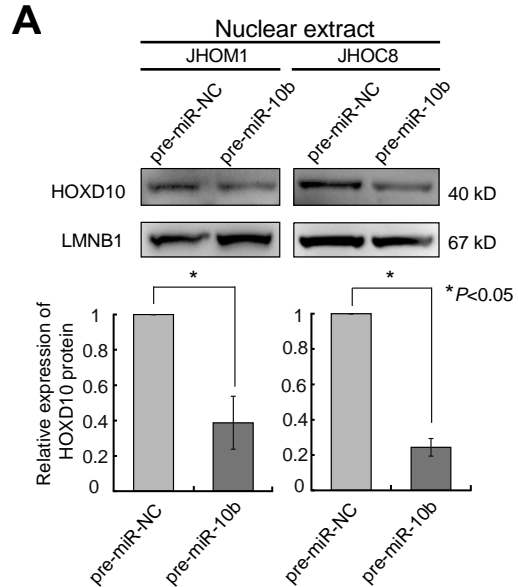


図3 miR-10b と HOXD10 の発現相関性と遊走能、浸潤能

(3) また、臨床病理検体(パラフィン切片、68例、HOXD10 と MMP14 の免疫染色の強度と miR-10b の発現量との相関)から、RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によって miR-10b の存在量を定量した結果と、HOXD10 の免疫染色の結果を比較すると、それぞれが有為に逆相関していることを見出した(図4)。一方、浸潤能に関与する他の因子である MMP14(matrix metalloproteinase 14) や RHOC(ras homolog family member C)については有為な相関が見られなかった(data not shown)。

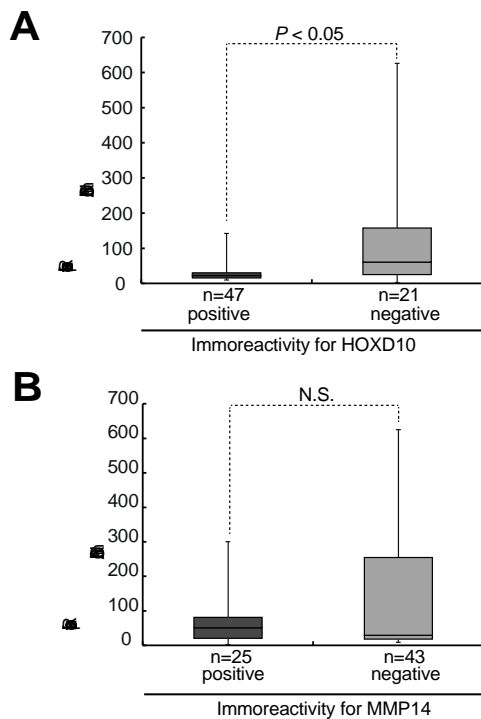


図4 miR-10b と HOXD10 の発現相関

(4) 以上の(1)～(3)から、卵巣がんにおいて、遊走能、浸潤能の積極的制御に lincRNA の一種である HOTAIR が関与している場合と、microRNA の一種である miR-10b が関与している場合があり、卵巣がんの浸潤能の亢進という腫瘍生物学的形質において、異なった非翻訳 RNA を介した機構が存在することが明らかとなった。

(5) 次に、悪性黒色腫細胞株を用い、lincRNA を初めとする、非翻訳 RNA 群を制御し得る因子を検索する目的で、特に転写因子に關与する遺伝子の変異を次世代シーケンサーを用いて検索を行った。悪性黒色腫は皮膚、眼窩内などに発生するメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、予後不良である。これまでに BRAF-V600 や NRAS-Q61 など、悪性黒色腫のドライバー変異が報告され治療標的分子となっているが、これら既知変異を持たない症例も知られている。培養細胞株 11 種類について、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行った。ゲノム中の全エクソン領域について、平均 7.5 カバレッジ以上のシーケンスデータが得られた。これらデータを解析した結果、フレームシフトやアミノ酸変異を伴ういくつかの新規変異を見いだした。本研究では特に、フレームシフト変異が認められた KEAP1 (kelch like ECH associated protein 1) 遺伝子に注目した(図 5 a, b)。KEAP1 は酸化ストレスを感知するセンサー分

子であり、またそのパートナー分子 NRF2 の活性化は、腫瘍形成に關与することが知られている。さらに、NRF2 は転写因子であり、各種非翻訳 RNA の発現制御に關与し、腫瘍生物学的形質の獲得に關与する可能性がある。

(6) 新規変異を生化学的に解析した結果、KEAP1 のパートナー分子である NRF2 が安定化し核内移行していること (data not shown)、NRF2 遺伝子を siRNA 法にて減弱すると、各種抗がん剤による細胞内酸化状態が減弱すること(図 5 d、e)、KEAP1 変異株ではそれら抗がん剤に対して耐性を示すこと(図 5 f)が明らかとなった。

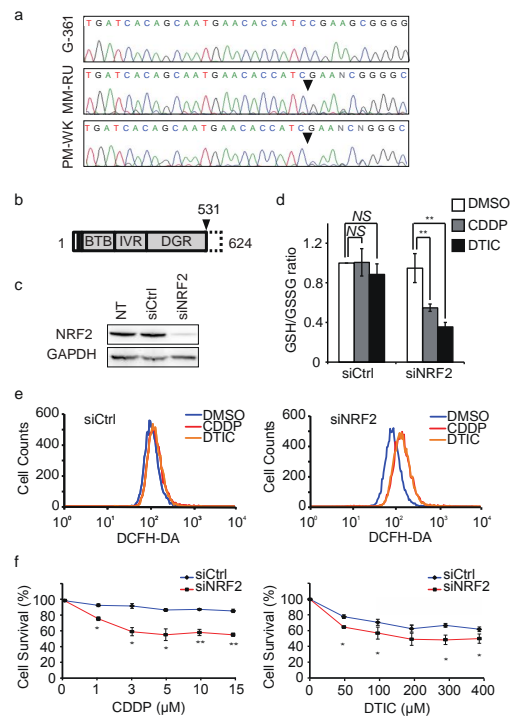


図5 悪性黒色腫細胞株における KEAP1 遺伝子のフレームシフト変異と薬剤耐性  
CDDP: cisplatin, DTIC: Dacarbazine

(7) また臨床検体(21検体)を用いた DNA シークエンス解析から、2 検体において悪性黒色腫細胞株で見られた KEAP1 遺伝子変異部位の近傍に、同様のフレームシフト変異を伴う塩基欠損が認められ、免疫染色により NRF2 タンパク質が恒常的に活性化していることが認められた。一方、正常型の KEAP1 を有する臨床検体では、NRF2 タンパク質の恒常的な安定化は見られなかった。以上から KEAP1 の新規変異は、悪性黒色腫の生物学的特性の一因となる可能性が示唆された (data not shown)。

(8) 以上の(5)～(7)から、悪性黒色

腫において KEAP1 遺伝子のフレームシフト変異によって NRF2 が恒常的に安定化し、抗酸化プログラムを活性化すること、これらの細胞株では種々の抗がん剤によって発生する活性酸素群を代謝することにより、抗がん剤の殺細胞効果が減弱することが明らかとなった。本結果を基に NRF2 の標的遺伝子群を発現解析した結果、ある種の肺癌細胞株において、NRF2 の発現と逆相関する遺伝子群の存在を認めている (data not shown)。NRF2 は、転写因子であることから、標的遺伝子を正に制御することが考えられるが、これら逆相関する遺伝子群は、何らかの抑制的制御因子を NRF2 が誘導した結果であると想定される。これらの因子として、非翻訳 RNA が候補であるとの予想に至っている。

#### 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)

Nakayama I, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Miura F, Sugiyama T, Masuda T, Maesawa C. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2013 Jul;43(1):63-71. doi: 10.3892/ijo.2013.1935.

Watanabe A, Yasuhira S, Inoue T, Kasai S, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics in melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2013 Aug;22(8):518-23. doi: 10.1111/exd.12185.

Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol*. 2014 Feb; 134(2): 553-6. doi: 10.1038/jid.2013.343.

Miura S, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tsunoda K, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T.

Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2014 Mar;36(3):211-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182964e02.

[学会発表](計6件)

中山育慧, 柴崎晶彦, 安平進士, 葛西秋宅, 杉山徹, 増田友之, 前沢千早  
microRNA-10b の発現増加による HOXD10 遺伝子の発現抑制は卵巣がん細胞における遊走・浸潤能を亢進させる  
第 102 回 日本病理学会、2013、札幌

三浦慎平, 柴崎晶彦, 安平進士, 葛西秋宅, 赤坂俊英, 増田友之, 前沢千早  
悪性黒色腫細胞株の網羅的エクソーム解析による新規関連遺伝子の検索  
第 102 回 日本病理学会、2013、札幌

影下雄一, 前沢千早, 三浦慎平, 柴崎晶彦, 安平進士, 葛西秋宅, 角田加奈子, 前田文彦, 高橋和宏, 赤坂俊英, 増田友之  
悪性黒色腫におけるヒストンメチル化酵素、脱ヒストンメチル化酵素の発現の検討  
第 102 回 日本病理学会、2013、札幌

中山育慧, 柴崎晶彦, 八島亜希子, 三浦史晴, 杉山徹, 増田友之, 前沢千早  
microRNA-10b の過剰発現による homeobox D10 の発現抑制は卵巣がん細胞における遊走・浸潤能を亢進させる  
第 72 回 日本癌学会学術総会、2013、横浜

渡辺彩乃, 安平進士, 井上剛, 葛西秋宅, 柴崎晶彦, 高橋和宏, 赤坂俊英, 増田友之, 前沢千早  
悪性黒色腫における抗チューブリン薬耐性は BCL2 と BCLxL によって規定される  
第 72 回 日本癌学会学術総会、2013、横浜

三浦慎平, 柴崎晶彦, 安平進士, 葛西秋宅, 井上剛, 影下雄一, 赤坂俊英, 増田友之, 前沢千早  
悪性黒色腫における KEAP1 遺伝子の新規変異は NRF2 を活性化させ抗がん剤に抵抗性に関与する  
第 72 回 日本癌学会学術総会、2013、横浜

[図書](計0件)  
該当なし

[産業財産権]

出願状況（計0件）  
該当なし

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）  
該当なし

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

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴崎 晶彦 (SHIBAZAKI, Masahiko)  
岩手医科大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20445109

### (2) 研究分担者

前沢 千早 (MAESAWA, Chihaya)  
岩手医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10326647

赤坂俊英 (AKASAKA, Toshihide)  
岩手医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30137525

杉山 徹 (SUGIYAMA, Toru)  
岩手医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40162903

柏葉 匡寛 (KASHIWABA, Masahiro)  
岩手医科大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：80326660

### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：