

研 究 報 告 書

「ピロリ菌感染の慢性胃炎において中心的な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的探索の試み」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 丸山 玲緒

1. 研究のねらい

慢性炎症が発癌の母地となりうることは良く知られているが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。近年、mRNA と類似の構造を取りながらも、タンパク質に翻訳されることのない長鎖 non-coding RNA (lncRNA) が細胞・生命活動において重要な役割を担っていることが分かってきたが、実際のヒトの慢性炎症組織における lncRNA の生理的・病的意義に関しては、ほとんど分かっていない。本研究ではピロリ菌感染胃炎から胃癌への発癌過程を研究モデルとして、次世代シーケンサーを用いて実際の臨床検体の分子プロファイルを多数解析することにより、慢性炎症からの発癌に関与する lncRNA を同定し、その機能的意義を明らかにすることを試みた。

長鎖 ncRNA による炎症の制御とその破綻という新しい視点により、これまで見えなかった慢性炎症からの発癌に関与する新たな分子メカニズムの解明が期待されるとともに、本研究で産生される分子プロファイルと長鎖 ncRNA 候補リストは、この分野の研究コミュニティに有用なリソースとなるとと思われる。

2. 研究成果

(1) 概要

上部内視鏡検体からヒストン修飾プロファイルを取得し、長期的な慢性炎症により活性が変化するゲノム領域を探索した。解析の結果、担癌患者の非癌部背景粘膜で不活性化する lncRNA を 150 種類、活性化する lncRNA を 50 種類同定した。これらのうち 2 種類の lncRNA に着目し、更なる機能解析を試みた。lncRNA1 は健常者の胃粘膜では常に発現を認めるが、胃癌患者の非癌部、癌部あるいは癌細胞株では DNA メチル化により発現が低下・消失していた。興味深いことに、癌を発症していないピロリ菌陽性慢性胃炎の粘膜では DNA メチル化の程度が低く、lncRNA1 のメチル化は将来の発癌を予測する臨床診断マーカーとして有用であると考えられた。胃癌患者の非癌部背景胃粘膜で活性化している lncRNA2 は、多くの胃癌細胞株においても発現が亢進しており、そのノックダウンや過剰発現は癌細胞の増殖能や遊走能に影響を与えることから、lncRNA2 は何らかの機能を有していると考え、その分子機構の解明を試みた。RNA-pull down 実験と質量分析により、3 種類のタンパク質が lncRNA2 と結合することが明らかとなり、これらは複合体を形成し標的となる遺伝子の転写制御に関与する可能性が示唆された。また lncRNA2 が TLR 刺激により発現誘導されること、lncRNA2 のノックダウンが免疫応答に関与する遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなり、lncRNA2 が慢性炎症における免疫応答に何らかの形で関わっている可能性が示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A 「上部内視鏡生検検体のヒストン修飾プロファイリングデータの解析」

初めに内視鏡検査で得られた検体から腺管分離法により上皮細胞成分のみを分離する行程を最適化した。得られた微量の上皮細胞を用いて ChIP 実験と ChIPSeq 実験を行う各過程の条件も検討し、プロトコルの改良を行った。最終的には上部消化管内視鏡の生検検体を用いた ChIPSeq 法を確立し、安定したワークフローの構築を行うことができた。これまでに ChIPSeq 実験を 36 検体 (H3K4me3 を 22 検体、H3K27me3 を 14 検体)、RNASeq 実験を 6 検体で施行した。

本解析では非癌患者 3 例 (健康者 2 例とピロリ陽性胃炎患者 1 例) と担癌患者 4 例の非癌部背景粘膜におけるヒストン H3K4me3 の比較を詳細に行い、長期的な慢性炎症による変化を検証した。各検体ではおよそ 15,000 から 20,000 カ所のピークをゲノム上に認めたが、そのうち全検体で共通するピークは 11,398 カ所であった。また非癌患者 3 例全例でピークを認めるが癌患者 (非癌部背景粘膜) の 2 例以上でピークの消失する領域を 3,140 カ所、逆に非癌患者全例でピークを認めず癌患者の全例でピークを認める領域を 1,512 カ所同定した。

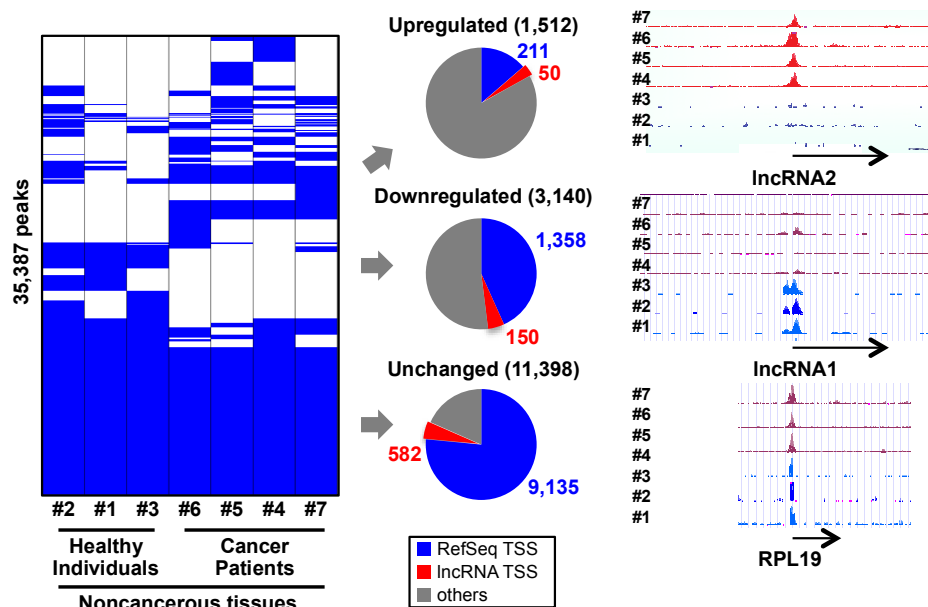


図 1. H3K4me3 データの解析と担癌患者の背景粘膜で変化を認める lncRNA の同定

研究テーマ B 「臨床検体による候補 ncRNA の検証と臨床分子マーカーとしての応用」

担癌患者の背景粘膜で H3K4me3 が消失する 3,140 カ所のうち、lncRNA の転写開始点と重なるものが 150 カ所あり、それらに着目し更に解析を進めた。まず発現情報の参考として、大型公共データベース TCGA で公開されている胃癌 175 検体 (癌部:148 検体、非癌部:27 検体) の RNASeq データを解析した。上記 150 個の lncRNA のうち、発現量が癌部で非癌部より有意に低下しているものは 8 個あり、そのうちのひとつ lncRNA1 に関して更に解析を行った。lncRNA1 は胃粘膜を含む多くの正常組織で発現が認められたが、検証した胃癌細胞株 21 株全てで発現の低下 (1/10 ~ 1/1000 程度) が認められた。lncRNA1 プロモーター領域の DNA メチル化レベルを測定したところ、正常胃粘膜では全くメチル化を認めなかったが、測定した全

での胃癌細胞株で 100%に近いメチル化を認めた。次に多数の臨床検体で同部位のメチル化を測定したところ、健常者やピロリ陽性胃炎患者に比べ癌患者非癌部で有意に高メチル化を示した(図 2)。更に TCGA の各種癌検体 5152 例の DNA メチル化データを解析したところ、この領域は胃癌のみならず、大腸癌・食道癌・頭頸部癌・子宮頸癌・膀胱癌・肺扁平上皮癌において高頻度かつ癌特異的に高メチル化を示し(図 3)、胃癌患者の背景粘膜に起こるエピゲノム変化とこれらの癌部に起こる変化に何らかの共通性があることが示唆された。

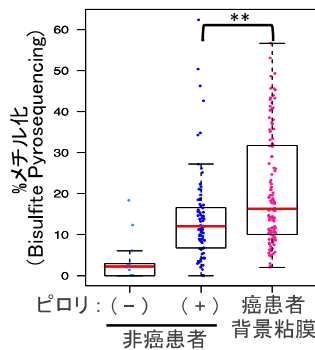


図 2. 上部内視鏡検体における lncRNA1 のメチル化

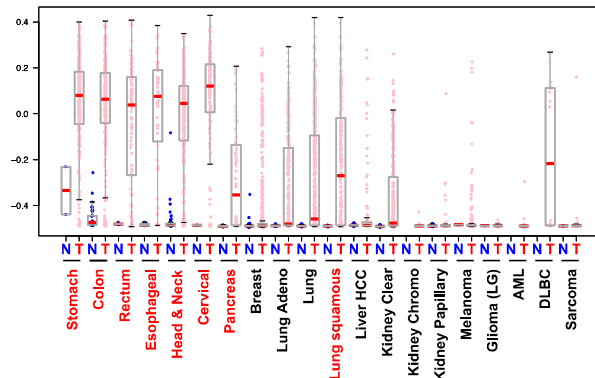


図 3. TCGA にある臓器別癌データ(全 5152 症例)の正常部(N)と癌部(T)における lncRNA1 のメチル化レベル

研究テーマ C 「長鎖 ncRNA の慢性炎症からの発現における病的意義の解明」

次に担癌患者の背景粘膜で特異的に活性化している lncRNA 候補について解析した。これらの長鎖 ncRNA 候補について、18 種類の胃癌細胞株と複数の正常胃粘膜 RNA における発現パターンを検証し、癌細胞株で過剰発現している lncRNA2 に着目して機能解析を試みた。lncRNA2 と bidirectional に発現する protein2 は膜タンパクをコードしており、このファミリーに属する遺伝子群はこれまで癌や免疫応答における役割が示されている。この観点から lncRNA2 も同様の機能を持つ可能性を考えた。protein2 のノックダウンは胃癌細胞の増殖能や遊走能を抑制したが、lncRNA2 単独のノックダウンや過剰発現実験においても同様の結果が得られた。よってこの lncRNA は何らかの機能を有していると考え、その分子機構の解明を試みた。まず lncRNA2 と結合するタンパク質を同定する目的で、RNA-pull down 実験と質量分析を複数回施行した。その結果、3 種類のタンパク質が結合タンパクの候補として同定された。この 3 者は複合体を形成し、標的となる遺伝子の転写制御に関与することが既に報告されており、その方向性で解析を進めた結果、その標的候補として EGR2 が同定された。EGR2 は lncRNA2 を含む RNP の標的遺伝子である可能性があり、ChIP 法や ChIRP 実験により検証作業を進めている。また胃癌細胞を TLR9 アゴニストで処理することにより、lncRNA2 の発現が誘導されることが確認された。さらに発現アレイの結果、lncRNA2 のノックダウンにより、インターフェロン応答(特に自然免疫応答)に関与する遺伝子群の発現が有意に低下することを見いだし、現在これらの機能的意義を解明すべく、種々の実験を試みている。

3. 今後の展開

本研究で同定された lncRNA2 は免疫応答の惹起・維持ならびに癌の発生・進展の両者に関与している可能性を示すデータが得られているが、その詳細な分子メカニズムについては未だ不

明な点が多いので、その解明を目指す。具体的には lncRNA2 と 3 種類のタンパク質複合体がどのように標的遺伝子の転写制御を行うのか、各種実験により明らかにしていく。また lncRNA2 の発現が誘導される機構と自然免疫応答におけるその役割に関して、明らかにしていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究補助員 2 名と共に、概ね計画通りに研究費を執行し、実験を遂行することはできたと考えている。特に本研究テーマの前半部分、臨床検体のヒストン修飾プロファイルの取得並びにインフォマティクスによる解析は予定通り遂行でき、臨床検体の貴重な分子プロファイルデータを得ることができた。しかし後半部分の lncRNA の機能解析に関しては、多くの新しい実験に挑戦し試行錯誤したが、有意義な結果が得られないことも多く、研究期間内に作用機構を詳細に解明することはできなかった。lncRNA 研究の難しさを痛感したが、それでも本研究を通じて構築できた実験系やノウハウは多くあり、今後も研究を継続していくことで、将来 lncRNA の作用機構の一端を明らかにすることができれば有意義であると考えている。本研究成果の延長として、慢性炎症からの発癌に重要な役割を果たす lncRNA の存在と病的意義を確認できれば、それは基礎医学・臨床医学の両者において大きなインパクトを与えうる。また本研究は臨床検体を研究材料としているので、胃癌発症のリスク予測マーカーとしての応用はもちろん、新しい核酸創薬の分子標的の同定などの臨床応用も視野に入ると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本課題では、ピロリ菌感染胃炎から胃癌への発癌過程を研究モデルとして、次世代シーケンサーを用いて実際の臨床検体の分子プロファイルを解析することにより、慢性炎症からの発癌に関与し得る長鎖 ncRNA(lncRNA)を同定し、その機能的意義を明らかにすることを目標とした。上部消化管内視鏡の生検検体から腺管分離法によって得た上皮細胞を用いた ChIPSeq 法を確立して解析を実施した。非癌患者 3 例と担癌患者 4 例の非癌部背景粘膜におけるヒストン(H3K4me3)プロファイルを比較し、担癌患者の非癌部背景粘膜で不活性化している lncRNA を 150 種類、活性化している lncRNA を 50 種類同定した。不活性化している 150 種類の中から、公共データベース TCGA で公開されている胃癌検体の RNASeq データを解析して発現量が癌部で非癌部より有意に低下しているものの一つ(lncRNA1)の機能について検討した。多数の臨床検体で同部位のメチル化を測定したところ、健常者やピロリ陽性胃炎患者に比べ癌患者非癌部で有意に高メチル化を示し、さらに TCGA の各種癌検体 5152 例の DNA メチル化データを解析したところ、この領域は胃癌のみならず、他臓器の各種の癌においても高頻度かつ癌特異的に高メチル化を示し、胃癌患者の背景粘膜に起こるエピゲノム変化とこれらの癌部に起こる変化に何らかの共通性があることが示唆された。また、活性化している上記 50 種類の中の一つ(lncRNA2)は多くの胃癌細胞株で発現亢進が見られ、さらにそのノックダウンにより細胞増殖能や遊走能が低下した。lncRNA2 は、TLR9 シグナルにより発現が誘導されるため自然免疫応答との関連が注目される。

発展途上の研究分野におけるチャレンジングな課題であり、特に lncRNA の機能解析については大変であったことが窺える。詳細な検討を経て本領域の目標の入り口までにはたどり着いたと評価したい。今後、蓄積された技術やデータを論文として公表し、研究のさらなる発展、lncRNA 研究に関する我が国のリーダーの一人として、研究発展の道を切り拓くことを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

現時点では該当無し

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

該当無し

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Suzuki R, Ashida M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs potentially involved in chronic inflammation associated with *Helicobacter pylori* infection. The 4th Symposium of A3 Foresight Program Recent progress of cancer epigenomics. 2013 年 3 月、韓国

2. 丸山玲緒、山本英一郎、鈴木拓. 胃癌の発生に關与するエピゲノム変化と長鎖非コード RNA の解析. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋

受賞

第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会学術奨励賞 (2015 年, 10 月)