

論文の内容の要旨

Long noncoding RNA, MALAT-1 によるがん進行メカニズムの解析

田埜 慶子

【序論】

生物は進化するにつれ、ゲノムサイズを増すとともに、タンパク質をコードしない、非コード領域を獲得してきた。ゲノム DNA における非コード領域の割合は、原核生物では 25% 以下であるのに対し、酵母や植物、動物へと生物が進化するにしたがって増加し、ヒトにおいては 98.5% にまで至る。近年、この非コード領域から転写される、noncoding RNA が多く見出されるようになった。生物におけるそれら noncoding RNA の役割も解明されつつある。私は、このように生物が進化するにつれて獲得した、noncoding RNA から見いだされる生命現象について研究を行った。

Noncoding RNA の中でも、私が着目して研究を行ったのが long noncoding RNA (200nt 以上) である。これまでに機能が明らかとなっている long noncoding RNA は未だ少数であるが、わかっているものについては、タンパク質と相互作用することにより、細胞内構造体の形成に関わることや、クロマチンリモデリング、転写、スプライシングなどの遺伝子発現調節に関わることが示されている。特に、long noncoding RNA による遺伝子発現調節は、細胞の機能に大きな影響を与えることから、long noncoding RNA の役割について知ることは、発

生、分化などの生命現象、さらに、疾患についての理解を深めることにつながると考えられ、重要である。

近年、疾患において発現が上昇する long noncoding RNA が見出されるようになった。その代表例が、MALAT-1(Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript-1)である。MALAT-1 は高転移性の肺がん細胞で高発現する。MALAT-1 の高発現は、肺がん患者の予後の悪化と相関があることから、診断マーカーとして有用であると考えられている。しかし、MALAT-1 自体が肺がんの進行に影響するかについては不明であった。MALAT-1 は、核内に安定的に存在する 8kb 以上の RNA で、核の中でもスペックルと呼ばれる構造体に特異的に局在する。さらに、MALAT-1 は、遺伝子発現を調節する因子と相互作用する例が報告されており、遺伝子発現調節に関わる可能性が高い。そこで、MALAT-1 が遺伝子の発現を調節することによって、転移に好都合な細胞形質に影響を与えるのではないかと私は考え、この仮説を検証した。

【結果】

1. MALAT-1 は運動性遺伝子の発現を促進し、細胞運動能を促進させる

MALAT-1 は高転移性のがんで高発現することから、MALAT-1 が、転移に重要な細胞運動性に影響するか調べた。肺がん細胞である A549 細胞において、MALAT-1 を RNAi 法によりノックダウンし(図 1-A)、まず Wound healing assay によって細胞の移動率を測定したところ、コントロールの細胞に比べて MALAT-1 ノックダウン細胞の移動率は低いことがわかった(図 1-B, $p < 0.01$, Student's *t*-test)。同様の結果は、トランスウェル・チャンバーを用いた運動性アッセイによっても得られた(図 1-C, $**p < 0.01$)。以上の結果から、MALAT-1 は肺がん細胞の運動性を促進する働きを持つことが示された。

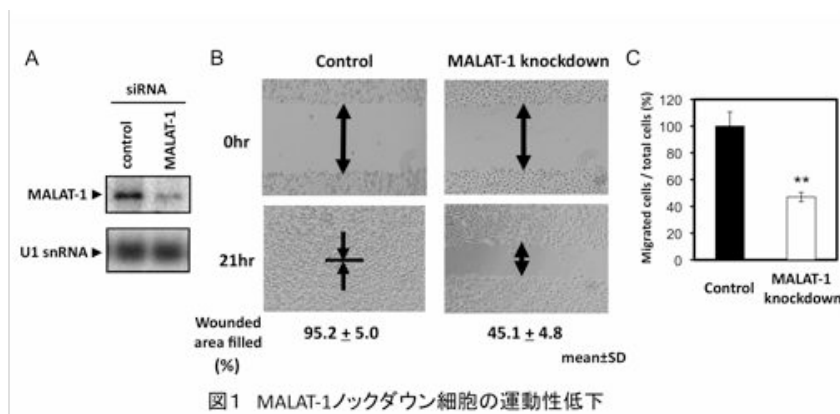


図1 MALAT-1ノックダウン細胞の運動性低下

次に、MALAT-1 がどのようなメカニズムで細胞運動性を促進させるかを調べることにした。MALAT-1 は核内で、スペックル(転写因子やスプライシング因子が多く集合する核内ドメイン)に局在することが知られている。そこで、MALAT-1 が、細胞運動に関与する何

らかの遺伝子の発現に影響を与えることによって、運動性を促進させているのではないかという仮説を立てた。MALAT-1 ノックダウン細胞のマイクロアレイ解析により、MALAT-1 によって影響を受ける遺伝子群を調べた。その結果、MALAT-1 のノックダウンによって発現が低下する遺伝子群(図 2-A)の中に、運動性に関連するものが多く含まれていることがわかった。それらの遺伝子が、私の用いている肺がん細胞の運動性に影響を与えるか知るため、それらの遺伝子をノックダウンし、細胞の運動性を調べると、*CTHRC1*, *CCT4*, *HMMR*, *ROD1* のノックダウン細胞の運動性が低下した。このことから、これらの遺伝子は、MALAT-1 によって発現が影響される運動性遺伝子群であり、MALAT-1 はこれらの運動性遺伝子の発現を促進させることにより、肺がん細胞の運動性を促進させることが示された。

MALAT-1 が運動性遺伝子群の発現を、転写または転写後のいずれの段階で調節するか知るため、pre-mRNA レベルを調べた。MALAT-1 ノックダウン細胞で、転写直後の pre-mRNA の段階から低下すれば転写の段階、低下していなければ転写後に調節されると判断することにした。その結果、MALAT-1 ノックダウン細胞で、*HMMR* の pre-mRNA 量は低下し、*CTHRC1*, *CCT4*, *ROD1* の pre-mRNA 量は低下していなかった(図 2-B, ***p<0.001)。このことから、MALAT-1 は、*HMMR* の発現を転写の段階で、*CTHRC1*, *CCT4*, *ROD1* の発現を転写後に調節することがわかった。

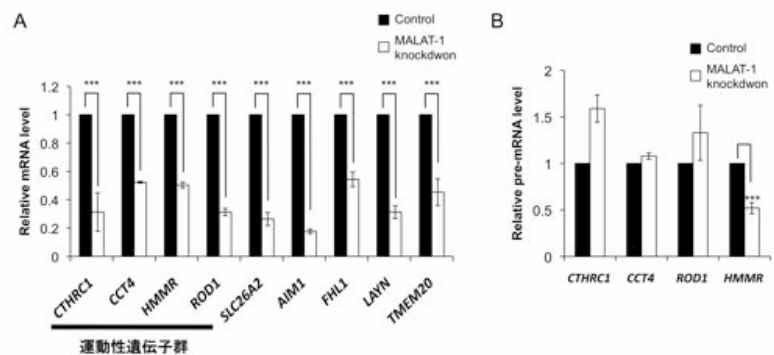


図2 MALAT-1ノックダウン細胞における運動性遺伝子群の発現

以上の結果から、MALAT-1 は、転写あるいは転写後の段階で運動性遺伝子の発現を促進し、肺がん細胞の運動性を促進させることが示された。(Tano K, *et al.*, 2010)

2. MALAT-1 は p53 の発現を抑制し、G1-S 期の細胞周期の移行を制御する

MALAT-1 によって影響を受けるのは、運動性遺伝子のみではない。MALAT-1 ノックダウン細胞のマイクロアレイ解析の結果から、MALAT-1 ノックダウン細胞で、p53 の標的遺伝子群の発現が上昇していることがわかった。このことから、MALAT-1 ノックダウン細胞で、p53 の活性を介した転写が上昇している可能性が考えられた。そこで、この現象が p53 を介しているかについて検証した。p53 の発現を RNAi により抑制すると、MALAT-1 のノ

ックダウンによる *p21*, *FAS* 遺伝子の発現上昇が抑制された(図 3, $**p<0.01$)。同様の結果は、MALAT-1 ノックダウン細胞に、p53 の阻害剤 (pifithrin- α) を作用させることによっても得られた。このこと

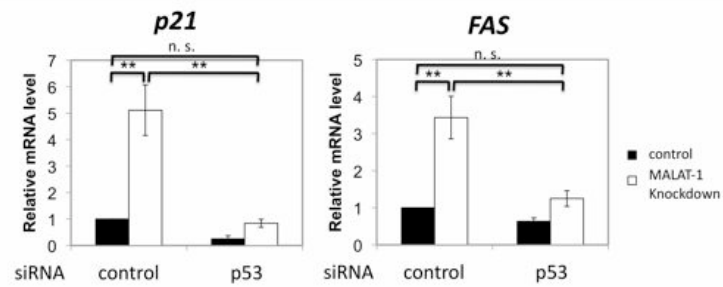


図3 MALAT-1ノックダウンによる*p21*, *FAS*の発現上昇は、p53による転写を介する

ことから、MALAT-1 ノックダウン細胞で p53 による転写が上昇し、下流の *p21*, *FAS* の発現が上昇することがわかった。従って、MALAT-1 は p53 による転写を抑制し、*p21*, *FAS* の発現抑制に関与することが示された。

MALAT-1 ノックダウン細胞における p53 の発現を調べると、タンパク質レベル(図 4-A)、mRNA レベルの両方で上昇していた。さらに、massive transcriptional start site (TSS) analysis によって、p53 のプロモーターのうち、転写活性を有する p53 タンパク質をコードする mRNA の上流にある P1 プロモーターからの転写が、MALAT-1 ノック

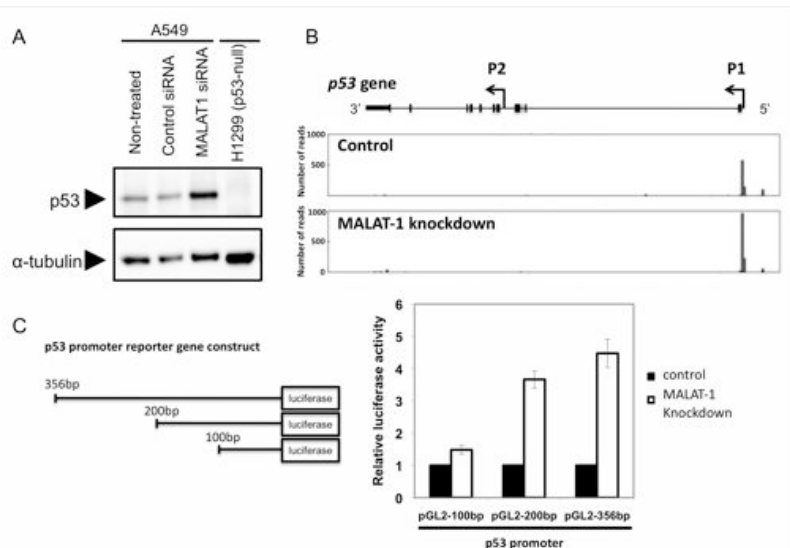


図4 MALAT-1ノックダウン細胞におけるp53の発現量の上昇およびプロモーター活性の上昇

ックダウン細胞で上昇していることがわかった(図 4-B)。レポータージーンアッセイにより、p53 の P1 プロモーター(コア領域)の活性を調べると、MALAT-1 ノックダウン細胞で上昇していた(図 4-C)。以上の結果から、MALAT-1 は p53 遺伝子の転写を抑制することによって p53 の発現を抑制し、下流の遺伝子の発現に影響することが示された。 MALAT-1 によって影響を受ける p53 プロモーター領域について、さらに領域を絞り込むため、P1 プロモーターの 200bp 領域の 5'側から deletion した mutant reporter gene を作成し、これらを MALAT-1 ノックダウン細胞に導入して活性を調べた。その結果、P1 プロモーターの 122~165bp 領域にかけての活性が、MALAT-1 ノックダウン細胞で段階的に上昇することがわかった。このことから、MALAT-1 は、P1 プロモーターの 122~165bp 領域を介して p53 の転写を抑制していると考えられる。

p53 の下流遺伝子である p21 は、G1 期のアレストを誘導する因子であることが知られて

いる。そこで、MALAT-1 ノックダウン細胞で、G1 期のアレストが生じているか調べた。FACS 解析の結果、MALAT-1 ノックダウン細胞では、コントロールの細胞に比べて S 期と G2/M 期の細胞数が減少し、G1 期における細胞数が上昇してい

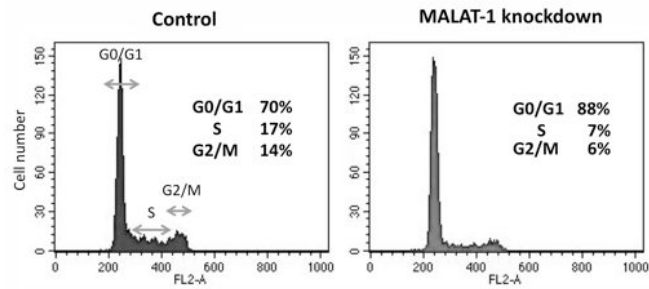


図5 MALAT-1ノックダウン細胞は、G1期でアレストを生じる

た(図5)。このことから、MALAT-1 ノックダウン細胞は G1 期でアレストを生じることがわかった。従って、MALAT-1 は G1 期からの細胞周期の移行の促進に関わることが示された。

以上の結果から、MALAT-1 は p53 の遺伝子発現を抑制して p21 の発現を抑制し、G1 期からの細胞周期の移行を促進させることが示された。

【総括】

本研究で私は、MALAT-1 が、①運動性遺伝子の発現を促進し、肺がん細胞の運動性を促進させること、②p53 の転写を抑制し、G1 期からの細胞周期の移行を促進することを明らかにした。①も②も、がんの進行に通じる現象であることから、肺がん細胞において発現上昇する MALAT-1 は、単なる診断マーカーではなく、がんの悪化に影響する重要な因子であること

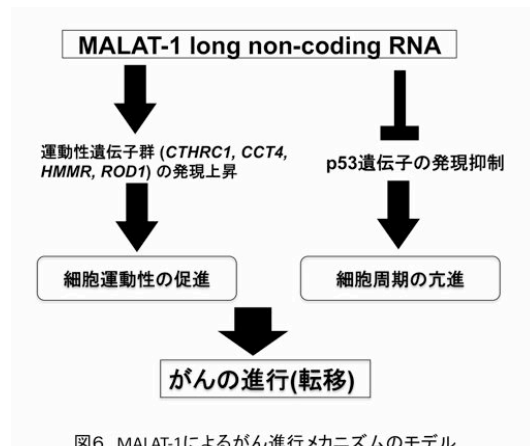


図6 MALAT-1によるがん進行メカニズムのモデル

が、示されたと考えられる。また、運動性遺伝子群の発現は、p53 に依存しないことも示していることから、①と②は独立した経路であると考えられる。従って、MALAT-1 は、2 つの異なる経路を介してがんの悪化に影響すると考えられる。このように、long noncoding RNA に着目することによって、がんの進行メカニズムについて新しい観点から理解できることがわかった。

さらに本研究では、MALAT-1 が、転写および転写後、両段階において遺伝子発現を調節するという、多様な分子機構を担うことが示されたと考えられる。一つの long noncoding RNA が、複数の遺伝子発現調節に関わるという考えは、概念的に新しい。Long noncoding RNA は、転写因子やスプライシング因子などのように活性を有するタンパク質にはならないが、自身の複雑な構造をうまく利用し、様々な因子と相互作用できる能力を発揮することで、多様な遺伝子発現調節に貢献する分子として、進化とともに獲得されたのではないかと考えられる。