

特集2：RNA 医学研究のトピックス**血管新生阻害治療によって活性化する悪性腫瘍化ノンコーディング RNA の
解明**

近藤 茂 忠

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野

(平成26年11月4日受付) (平成26年11月10日受理)

1. ヒトゲノムとノンコーディング RNA

ヒトゲノムプロジェクトによって、完全長のヒトゲノムが解読された。しかしながら、遺伝子がゲノム上のどこから始まって、どこで終わっているのか、また、スプライシングの位置や組み合わせはどうなっているのかなど、ゲノム配列の解読だけでは解らない。そこで、ヒトゲノム解読が終了した2003年以降、日本の理研を中心とした国際的研究組織 FANTOM コンソーシアムと、米国の ENCODE 計画 (The Encyclopedia of DNA Elements) によるポストゲノム解析が行われてきた。その結果、驚くべき事実が解ってきた¹⁻⁶⁾。当初、ヒト遺伝子の数は約70,000~100,000個と推定されていたが、どの哺乳類でも最大約25,000個しかないことが明らかになった。線虫でも遺伝子の数は約19,000個もあり、哺乳類と比較しても大差がない。このような僅かな遺伝子数の差が、高次な脳機能を含むヒトの複雑な制御を生み出しているとは考え難い。

このように、従来の蛋白質をコードする「遺伝子」の数だけでは説明がつかないことから、蛋白質をコードしない転写産物 (ノンコーディング RNA) が大きく注目されるようになってきた。ノンコーディング RNA はその鎖長から大きく2つのグループに分類されている^{1,2)}。1つは鎖長が200塩基以下の短鎖ノンコーディング RNA (miRNA, siRNA, piRNA など) と、もう1つは鎖長が200塩基以上の長鎖ノンコーディング RNA である。

当初、ノンコーディング RNA は偶発的な転写から生じるジャンクだと考えられていたが、近年になって長鎖

ノンコーディング RNA の機能が次第に解ってきた。その結果、長鎖ノンコーディング RNA は生命の複雑さや多様性を生み出す重要な要素であると認識されるようになってきた。事実、蛋白質遺伝子をコードする領域は、ヒトゲノムのわずか1.5%であること、ヒトゲノムの実に80%以上の領域が生物学的機能 (RNA に転写されているか、何らかのクロマチンとの相互作用がみられる) を持っていることが明らかにされた⁴⁻⁶⁾。

長鎖ノンコーディング RNA はそれがコードされている領域によって2つのグループに分類される (図1)。1つは遺伝子と遺伝子の間にコードされている「遺伝子間長鎖ノンコーディング RNA (long intergenic non-coding RNA; LincRNA)」。もう1つは、タンパク質をコードする遺伝子内にあるもの (Long non-coding RNA; LncRNA) で、センス鎖から転写されるもの (exonic lncRNA, intronic lncRNA) とアンチセンス鎖から転写されるもの (antisense lncRNA) がある。2014年時点で、ヒトにおけるこれら長鎖ノンコーディング RNA の数は、LincRNA が47,143個、LncRNA が28,076個と報告されており (図1)、今後更に増えると予想されている。本総説では、最近解明が進んできた長鎖ノンコーディング RNA に焦点を絞って解説するとともに、われわれが明らかにした腫瘍悪性化を誘導する新規の長鎖ノンコーディング RNA について紹介する。

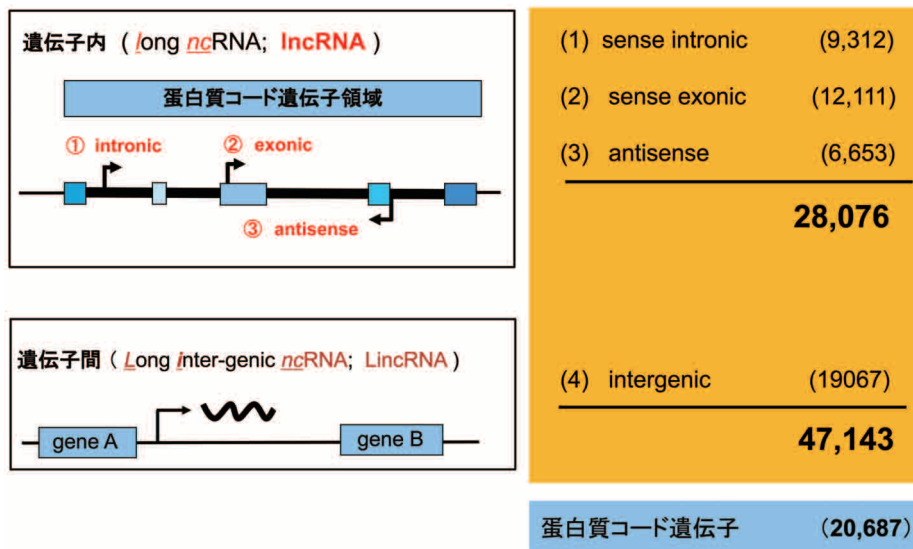


図1 長鎖ノンコーディング RNA の分類

2. 長鎖ノンコーディング RNA の機能

(1) 長鎖ノンコーディング RNA による遺伝子サイレンシング

現在最もよく解明されているのが、長鎖ノンコーディング RNA によるクロマチン修飾を介した遺伝子発現のサイレンシングである。例えば、Xist RNA は転写抑制にはたらく H3K27 のメチル化を誘導することで X 染色体の不活性化に寄与する⁷⁾。また、ゲノムインプリンティングに関わる長鎖ノンコーディング RNA である Kcnqlot 1⁸⁾ や Air⁹⁾ も、転写抑制にはたらく H3K27 や H3K9 のメチル化に関与する。

(2) 長鎖ノンコーディング RNA による転写活性化

一方、クロマチン修飾を介して遺伝子発現を活性化する長鎖ノンコーディング RNA もいくつか報告されている。ヒト *HOXA* 遺伝子群の活性化に関わる HOTTIP lncRNA やマウス *HOXA* 遺伝子の活性化に関わる Mistral lncRNA は、転写活性化にかかわる H3K4 メチル化を誘導して遺伝子発現を活性化させる¹⁰⁾。

(3) 長鎖ノンコーディング RNA の転写を介した遺伝子発現の制御

長鎖ノンコーディング RNA が関与する遺伝子発現制

御の中には、長鎖ノンコーディング RNA 自身を必要とせず、長鎖ノンコーディング RNA の転写自体が重要である場合もある。これは、長鎖ノンコーディング RNA の転写反応がある種のクロマチン修飾と共役することで起こる、遺伝子発現の制御である。例えば、酵母の H3K36 メチル化酵素は RNA ポリメラーゼ II と相互作用し、転写と共役して蛋白質コード領域での H3K36 のメチル化を誘導する。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素が呼び込まれ、蛋白質コード領域内からの転写が抑制される¹¹⁾。

3. 長鎖ノンコーディング RNA と疾患

近年、長鎖ノンコーディング RNA が実際に癌をはじめ種々の疾患に関与していることが解ってきた。特に、さまざまな癌で発現が変動する長鎖ノンコーディング RNA が複数見つかってきている (表 1)。中でも、非小細胞肺癌の予後不良と同調して発現が増加する Malat 1 が注目されている。Malat 1 をノックダウンすると、細胞運動性が抑制されたり、p53 の発現促進を介して細胞増殖が抑えられるといったことが報告されている。また、Malat 1 は選択的スプライシングの制御を介して予後不良と関係していると考えられている¹²⁾。

次に、高い転移能を持つ悪性化乳癌細胞で Hotair が高発現していることが示された。実際、乳癌細胞に

表1 ヒト各種癌と関連する長鎖ノンコーディング RNA

lncRNA, LincRNA	Size	Cancer types
MALAT1	75kb	breast, lung, pancreas, colon, liver, prostate
HOTAIR	2158nt	breast
HULC	500nt	colon, liver
MEG3	1600nt	brain
GAS5	multiple	breast
ANRIL/p15AS	34.8kb	prostate, leukemia
PTENP1	~3900nt	prostate
SRA	965nt	breast, uterus, ovary,
BC200	200nt	breast, lung, ovary, esophagus
PCGEM1	1643nt	prostate

Hotair を遺伝子導入すると転移能が獲得されることが報告されている。Hotair の高発現によって実に数百種類の遺伝子の異常な発現抑制が起こり、その中に転移能を抑制する遺伝子が含まれていると考えられている¹³⁾。

UBE3AAS は600キロ塩基以上の長さをもつノンコーディング RNA で、15番染色体に位置し、同じ領域がプラダーウィリ症候群やアンジェルマン症候群などの先天性疾患（この遺伝子領域には、父親由来の遺伝子が不活性化される部位と母親由来が不活性化される部位がある。父母どちら由来の遺伝子が異常になるかによって、プラダーウィリ症候群、あるいはアンジェルマン症候群を発症する。）、自閉症などの発達障害、統合失調症などの精神疾患の発症に関わるとされている。また、KCNQIOT1/LIT1は、Beckwith-Wiedemann 症候群に関連するといわれている。Beckwith-Wiedemann 症候群は11番染色体の特定部位でゲノムインプリンティング機構（両親から譲り受けた2本の遺伝子が異なる発現パターンを示す現象）の異常で引き起こされることが知られており、過度な成長やウィルムス腫瘍などを引き起こす。KCNQIOT1/LIT1は、父親側で発現する刷り込み遺伝子として同定され、KCNQIOT1/LIT1 RNA が局所的なクロマチン上へ集積することで転写を制御していることが解明されている¹⁴⁾。

4. 腫瘍の血管新生阻害治療と長鎖ノンコーディング RNA

腫瘍血管新生の中心的役割を果たす血管内皮細胞増殖

因子（VEGF）を分子標的とした血管新生阻害治療は、現行の治療切除不能な固形がんの中心的な化学療法となっている。しかしながら、大半の患者は VEGF 阻害薬に対して抵抗性を獲得してしまうことが分かってきており、以下の臨床的課題の解決が急務となっている。1つは、VEGF 阻害薬が効かない（抵抗性を有する）患者を鑑別するためのバイオマーカーの同定と抵抗性の分子メカニズムの解明、2つ目は抵抗性を解除できる治療薬の開発である。

われわれは、これら2つの課題を解決できる可能性を秘めた、がん細胞の VEGF 標的薬に対する独自の適応機構を突き止めた。そのメカニズムの概要を図2に示した。従来、VEGF 標的薬（VEGF 中和抗体、VEGF 受容体キナーゼ阻害剤）は、血管新生を阻害することによりがん細胞の増殖を抑制すると考えられてきた。ところ

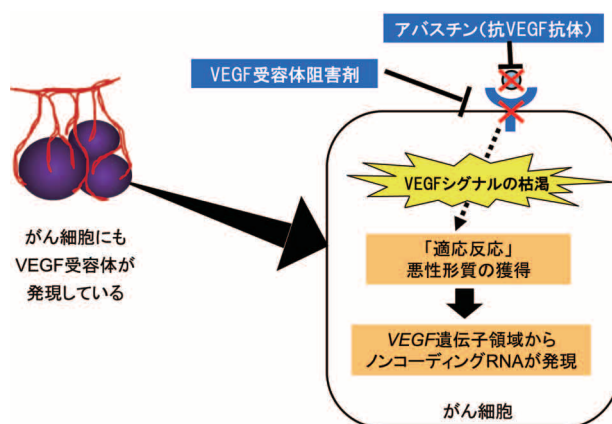


図2 VEGF 分子標的薬によって誘導される長鎖ノンコーディング RNA

が、腫瘍細胞内の VEGF 生存シグナルを枯渇させると、がん細胞は VEGF 産生を止めて、代わりに長鎖ノンコーディング RNA (VEGF lncRNA) を発現するようになる。さらに、VEGF 標的薬と併用される細胞傷害性の抗がん剤も VEGF lncRNA を強く誘導することを見出した。これは、抗がん剤も VEGF 標的薬と同様に VEGF 産生を停止させる働きがあるため、結果的に VEGF lncRNA を誘導してしまう。このように、現行の標準的化学療法 (VEGF 標的薬+細胞傷害性抗がん剤) は相乗的に VEGF lncRNA を過剰発現させてしまう。VEGF lncRNA を過剰発現させると、p53とその標的遺伝子の発現が抑制されるため、VEGF 標的薬と抗がん剤両方に対して抵抗性が誘導されてしまうことを明らかにした。

これらの現象は大腸がん細胞株レベルに加え、*in vivo* レベル (ヌードマウスの皮下に腫瘍細胞を移植するモデル) でも認められた。VEGF 標的薬投与によって腫瘍内に VEGF lncRNA が過剰発現した結果、治療抵抗性 (VEGF 阻害剤および抗がん剤抵抗性) を示すことを確認した。

このように、VEGF 分子標的薬に対するがん細胞の生存・適応戦略に長鎖ノンコーディング RNA が関与していることが解った。今後、この長鎖ノンコーディング RNA を分子標的とした薬剤を開発して、現行の VEGF 阻害薬と併用することで治療抵抗性の解除と抗腫瘍効果の増強が期待される。

文 献

- 1) Jensen, T. H., Jacquier, A., Libri, D.: Dealing with pervasive transcription. *Mol. Cell.*, 52 : 473-484, 2013
- 2) Morris, K. V., Mattick, J. S.: The rise of regulatory RNA. *Nat. Rev. Genet.*, 6 : 423-437, 2014
- 3) Clark, M. B., Choudhary, A., Smith, M. A., Taft, R. J., Mattick, J. S.: The dark matter rises: the expanding world of regulatory RNAs. *Essays Biochem.*, 54 : 1-16, 2013
- 4) Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., *et al.*: Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489 : 101-108, 2012
- 5) Maher, B.: ENCODE: the human encyclopaedia. *Nature*, 489 : 46-48, 2012
- 6) FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), Forrest, A. R., Kawaji, H., Rehli, M., Baillie, J. K., de Hoon, M. J., Lassmann, T., Itoh, M., Summers, K. M., Suzuki, H., Daub, C. O., *et al.*: A Promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, 27 : 462-470, 2014
- 7) Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J. J., Lee, J. T.: Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*, 322 (5902) : 750-756, 2008
- 8) Pandey, R. R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-Dinardo, D., Kanduri, C.: Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell*, 32(2) : 232-246, 2008
- 9) Nagano, T., Mitchell, J. A., Sanz, L. A., Pauler, F. M., Ferguson-Smith, A. C., Feil, R., Fraser, P.: The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science*, 322(5908) : 1717-1720, 2008
- 10) Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B. R., Protacio, A., Flynn, R. A., Gupta, R. A., Wysocka, J., Lei, M., Dekker, J., Helms, J. A., Chang, H. Y.: A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 472(7341) : 120-124, 2011
- 11) Saunders, A., Core, L. J., Lis, J. T.: Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 7(8) : 557-567, 2006
- 12) Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H., Müller-Tidow, C.: MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 22(39) : 8031-8041, 2003
- 13) Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings,

- H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., Chang, H. Y. : Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, **464**(7291) : 1071-1076, 2010
- 14) Wilson, M., Peters, G., Bennetts, B., McGillivray, G., Wu, Z. H., Poon, C., Algar, E. : The clinical phenotype of mosaicism for genome-wide paternal uniparental disomy : two new reports. *Am. J. Med. Genet A*. **146A**(2) : 137-148, 2008

Long non-coding RNAs : new players in cancer biology

Shigetada Teshima-Kondo

Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

The most well-studied sequences in the human genome are those of protein-coding genes. However, the coding exons of these genes account for only 1.5% of the genome. In recent years, FANTOM and ENCODE projects reveal that more than 80% of the human genome is transcribed into RNAs that do not encode protein. It has become increasingly apparent that the non-protein-coding RNAs (ncRNAs) are of crucial functional importance : for normal development and physiology, and for disease. In particularly cancer, it is increasing evidence that not only miRNAs but also other ncRNAs, such as large intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs), function as oncogenic ncRNAs and tumor-suppressive ncRNAs.

Key words : non-coding RNA, cancer, lncRNA, lincRNA