

主論文の要旨

**Oncogenic Effects of Evolutionarily Conserved
Non-coding RNA *ECONEXIN* on Gliomagenesis**

（ 進化学的に保存された非翻訳 RNA *ECONEXIN* の
神経膠腫形成に関わる発がん効果 ）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

（指導：若林 俊彦 教授）

出口 彰一

<背景>

神経膠腫は最も悪性の脳腫瘍である。神経膠腫の分子学的解析によってタンパク質をコードする遺伝子の変異や発現異常がわかってきたが、これらのみでは神経膠腫形成の機構を十分に説明できない。近年、タンパク質に翻訳されない遺伝子の異常が腫瘍形成に関わることが明らかとなってきた。

200 塩基以上の長さからなる非翻訳 RNA は長鎖非翻訳 RNA (long non-coding RNA ; lncRNA) と定義される。lncRNA は他の遺伝子の発現を制御することで腫瘍形成を含む様々な生物学的過程に関わる。lncRNA はクロマチン構造の変化や RNA 相互作用に関わるとされ、例えばタンパク質に翻訳される RNA を阻害する microRNA (miRNA) を抑制することによってタンパク質発現を制御する。

lncRNA の多くは生物種間での塩基配列の保存性が乏しい。しかし一方で高度に塩基配列が保存されている lncRNA は脳の形態形成や眼の発生などの重要な機能を有することが報告されている。本研究ではヒトとマウスの塩基配列の保存性に着目した *in silico* 解析と神経膠腫形成マウスモデルを用いた *in vivo* 解析を組み合わせ、神経膠腫形成に関わる lncRNA を同定し、その機能解析を行うことを目的とした。

<方法>

GENCODE (ver.21) に登録されている lncRNA から BLAST を用いてヒトとマウスで高度に保存されている lncRNA (配列相同性 > 80%、塩基数 > 200) を同定した。遺伝子組み換え技術によって変異細胞 (Tp53^{-/-}, Nf1^{-/-}) のみ GFP 陽性となる神経膠腫形成マウスモデルを用いて腫瘍細胞における遺伝子の発現量を RT-PCR 及び micro array で測定した。このマウスモデルは生後 90-100 日に腫瘍を自然発生する。また、ヒト神経膠腫細胞株 U87 及び U251 を用いて機能解析を行った。複数の siRNA を用いて標的 RNA のノックダウンを行った。RNA の発現量は RT-PCR、タンパク質の発現量は Western blot 法で測定した。細胞増殖能は MTT アッセイ法で測定した。RNA の細胞内局在は RNA-FISH を用いて解析した。

<結果>

15,877 のヒト lncRNA からヒトとマウスで高度に保存されている 67 lncRNA を同定した (図 1)。この中で最も保存されている新規の lncRNA、LINC00461 (配列相同性 83.0%、2,521 塩基) に着目した。LINC00461 はヒトとマウスで共通して神経組織にのみ特異的に発現している lncRNA であり、evolutionary conserved and expressed in neural tissues (ECONEXIN) と命名した。

ECONEXIN は正常脳と比べてヒト神経膠腫で有意に発現が上昇していた (図 2)。また ECONEXIN は正常脳細胞株 F3 と比べて U87 及び U251 でも有意に発現が上昇していた (図 3)。さらに神経膠腫形成マウスモデルの変異細胞における C130071C03Rik (ECONEXIN のオルソログ) の発現量は前がん細胞 (生後 20, 60 日) から有意に上昇しており、腫瘍細胞 (生後 90, 120 日) でさらに上昇していた (図 4)。そこで U87

及び U251 で siRNA を用いて *ECONEXIN* をノックダウンすると有意に細胞増殖能が悪化した (図 5)。以上から *ECONEXIN* は腫瘍形成に関わる可能性が示唆された。

次に *ECONEXIN* の機能解析を行った。lncRNA は細胞内の局在によって機能が異なることが知られている。RNA-FISH では *ECONEXIN* は細胞質に優位に存在していた (図 6)。細胞質に存在する lncRNA は miRNA に結合し、その活性を消失させることで miRNA の標的タンパク質の発現を制御する機能が知られている。公共のデータベース starBase v2.0 を用いて、*ECONEXIN* と結合する miRNA を検索し、miR-411-5p を同定した。U87 及び U251 で *ECONEXIN* をノックダウンすると有意に miR-411-5p の発現は増加した (図 7)。さらに神経膠腫形成マウスモデルにおける変異細胞の miR-411 の発現量は正常脳に比べて有意に低下していた (特に生後 90 日、120 日) (図 8)。

starBase v2.0 を用いて miR-411-5p の標的となりうる 700 のヒト遺伝子を同定した。予測された 700 個の標的遺伝子のうち、DNA の複製に関わるトポイソメラーゼ 2 (*TOP2A*) はヒトとマウスのいずれの腫瘍においても正常脳と比べて最も高い発現率の増加を示した (図 9)。さらに *Top2a* は前がん細胞 (生後 20 日) から発現の上昇を認めた (図 10)。実際に U87 及び U251 で *ECONEXIN* をノックダウンすると *TOP2A* 発現が抑制された (図 11)。また siRNA によって *TOP2A* をノックダウンすると有意に細胞増殖能が悪化した (図 12)。最後に *ECONEXIN* のノックダウンに加えて外来性に *TOP2A* を導入すると細胞増殖能の悪化は改善した (図 13)。以上から、*ECONEXIN* は miR-411-5p を抑制することによって神経膠腫の細胞増殖に関わる重要なエフェクターである *TOP2A* を制御することが示された。

<考察>

一部の lncRNA は腫瘍形成に関わるということが報告されているが、いまだ多くの lncRNA の機能は解明されておらず、腫瘍形成に関わる lncRNA を同定することは難しい。本研究では公共のデータベースを用いてヒトとマウスで高度に塩基配列が保存されている 67 lncRNA を同定した。興味深いことに、同定された 67 lncRNA は神経細胞の発達や機能に関連することが報告されている *MIAT*、*KANTR*、*TUNA*、*MEG3*、*MALAT1* を含んでいた。このことから保存性に着目した解析は機能的な lncRNA の同定に有効である可能性がある。同定された 67 lncRNA の中で *ECONEXIN* は最も高度に保存されていた。神経膠腫形成マウスモデルにおける経時的な発現解析では前がん細胞、腫瘍細胞で *C130071C03Rik* の高発現を確認できた。以上から lncRNA の保存性に着目した解析と腫瘍形成マウスモデルにおける経時的な発現量解析を組み合わせることは腫瘍形成に関わる lncRNA を同定するための有効な手段となりうると考えられた。

神経膠腫細胞において *ECONEXIN* は miR-411-5p との相互作用を介して *TOP2A* の発現を増加させ、腫瘍形成に関わることを示した。*ECONEXIN* を標的とすることは神経膠腫に対する有用な治療になる可能性がある。

<結語>

ヒトとマウスの塩基配列の保存性に着目した *in silico* 解析と神経膠腫形成マウスモデルでの *in vivo* 解析を組み合わせ、神経膠腫形成に関わる新規の lncRNA、*ECONEXIN* を同定した。*ECONEXIN* は miR-411-5p と結合し、その機能を阻害することで miR-411-5p の標的である TOP2A の発現を亢進し神経膠腫の形成に関わることを発見した。