研究実績報告書

がんの増殖を担う lncRNA の網羅的な探索とその機能解析

愛知県がんセンター
研究所・分子診断 TR 分野
主任研究員　梶野　泰祐

１．研究の背景・目的

肺がんは、現在も外科切除以外では治癒が難しい代表的な難治がんである。キナーゼ等を標的とする分子標的薬の開発が進みつつあるが一部の肺がんにしか効かず不十分である。近年ゲノム解析が進み、ヒトを含む様々な生物種において、タンパク質を発現しない長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)の存在が明らかとなった。そして現在では、がんをはじめとする様々な研究分野において lncRNA の研究が進み、その機能と重要性が明らかになりつつある。これまでに申請者は、システム生物学的手法を用いて MYC を制御する lncRNA を探索し、MYMLR を同定した (Ref.1)。生化学的な解析から、MYMLR は核内において PCBP2 と結合して MYC のエンハンサーを制御し、MYC の転写を制御することを解明した。申請者はまた、miR-20a の標的 lncRNA として TILR を同定した(Ref.2)。TILR は p53 mRNA と結合し、p53 の翻訳抑制を介してがん細胞の生存に必須の働きをすることを解明した。一方、lncRNA は数千から数万も存在すると考えられているため、MYMLR や TILR のように機能が解明された lncRNA はごくわずかである。そこで本研究課題では、CRISPRi スクリーニングを立ち上げ、肺がんの増殖を担う lncRNA の探索を開始した。

２．研究の対象ならびに方法

培養細胞と化合物

肺がん細胞株 A549 細胞および 293T 細胞を用いた。A549 細胞は RPMI 1640 培地(10% FBS 含)を用い、293T 細胞は DMEM 培地(10% FBS 含)を用いて培養した。Forskolin は SIGMA 社より購入した。

発現ベクター

dCas9 発現ベクターとして pHR-SFFV-KRAB-dCas9-P2A-mCherry(addgene 社)を、gRNA ラ

イブラリー発現ベクターとしてCRiNCL-Human CRISPRi Non-coding Libraries(addgene社)を用い、レンチウイルスを作成した。

CRISPRi スクリーニング

A549 dCas9 発現細胞に gRNA ライブラリー発現レンチウイルスを Multiplicity of Infection (MOI) = 0.2-0.5 にて感染させた。感染細胞は BD FACS Aria III セルソーターを用いてソートし、回収した。1 gRNA あたり 250 以上の細胞に導入し、0 日後および 20 日後に gDNA を回収した。PCR を用いて回収した gDNA より gRNA 領域を増幅し、次世代シーケンサー解析を行った。

３．研究結果

近年の技術革新により遺伝子改変の技術が進み、ゲノムワイドな CRISPR スクリーニングが開発された。さらに、遺伝子の転写を抑制する CRISPRi の技術も開発され、タンパク質をコードしない lncRNA であってもゲノムワイドな探索を行うことが可能となった（図１）。そこで申請者は、標的遺伝子の発現を抑制する肺がん細胞株の樹立を開始した。293T 細胞に、DNA 切断能を欠損しかつ遺伝子発現抑制能を持つ KRAB ドメインを融合した dCas9 発現ベクターを導入し、dCas9 発現レンチウイルスを作成した。このレンチウイルスを A549 細胞に感染させて、フローサイトメトリー法によりソートした後に dCas9 発現細胞を樹立した（図２）。次に、TILR を標的とする gRNA を発現するベクターを作成してレンチウイルスを作成し、この A549 dCas9 発現細胞に導入したところ、効率よく TILR の発現が抑制された。以上の結果から、gRNA による標的遺伝子を発現抑制することのできる A549 dCas9 細胞を樹立することができたと考えられた。

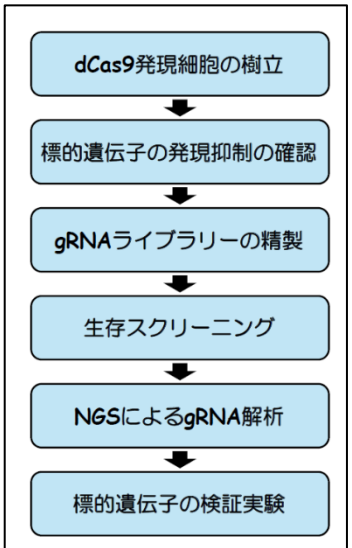

図１：lncRNAを標的とするCRISPRiスクリーニングの概略

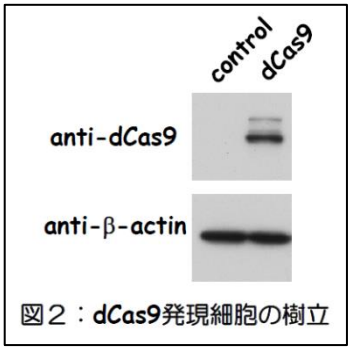

図２：dCas9発現細胞の樹立

次に、lncRNA の promoter を標的とする gRNA ライブラリーを作成した。1 遺伝子あたり 10 種類の gRNA がデザインされており、合計で 2,000 遺伝子の lncRNA を標的とする全 20,000 gRNA ライブラリーCRISPRi Non-Coding Linbrary (CRiNCL)を 293T 細胞に導入し、レンチウイルスライブラリーを樹立した。樹立したライブラリーの Titer を確認した後に A549 dCas9 細胞に導入し、フロ

ーサイトメトリー法を用いて mCherry 強陽性/BFP 陽性細胞をソートし、回収した（図３）。得られた細胞を培養し、スクリーニング開始時点である Day 0 およびスクリーニング後の Day 20 の細胞より gDNA を回収した。そして、lncRNA を標的とする gRNA 領域を PCR 法により増幅し、Sanger シーケンス法を用いて目的とする gRNA 領域が単離できていることを確認した。その後、次世代シーケンサーを用いて PCR 産物を網羅的に解析したところ、3G 以上のリード数且つ 89%のマップ率のデータが得られた。さらにエンリッチメント解析等を進め、肺がん細胞の生存・増殖に必須の働きをする lncRNA の候補を得た（図４）。今後はノックダウン等を用いて lncRNA の重要性について検討するとともに、公共データベース等の遺伝子発現プロファイルを用いて臨床的意義について検討を進める予定である。

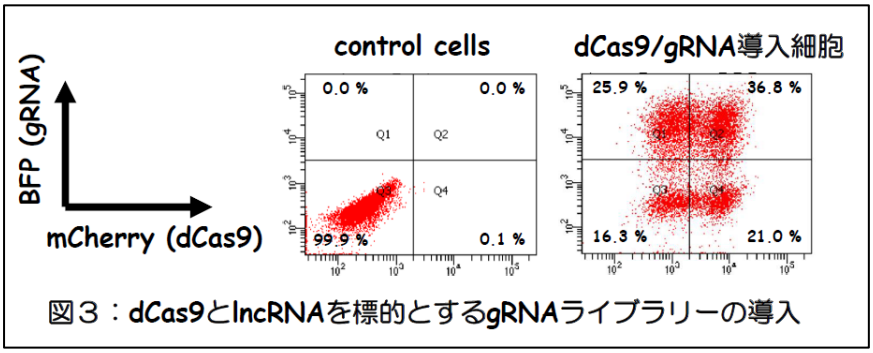

図３：dCas9とlncRNAを標的とするgRNAライブラリーの導入

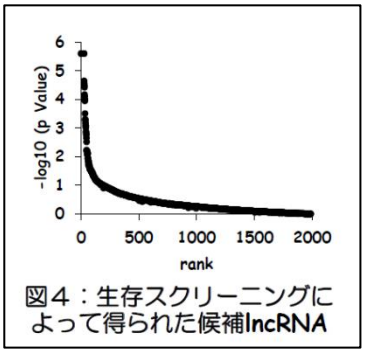

図４：生存スクリーニングによって得られた候補lncRNA

４．考察

本研究において我々は、代表的な肺がん細胞株である A549 細胞に dCas9 を導入し、目的の遺伝子の発現を抑制することのできる A549 dCas9 細胞を樹立した。この細胞を用いて CRIPSRi スクリーニングを行った結果、FDR 0.05 未満且つ 2 倍以上変動する遺伝子として 28 lncRNA を同定した。今後は、これらの lncRNA の候補遺伝子を順次ノックダウンし、がん細胞の増殖における重要性について検討する。

これまでに我々を含む様々な研究グループが CRISPR スクリーニングに取り組んでおり、がん細胞の生存・増殖にかかわる分子が同定されつつある。一方、これまでの手法ではタンパク質一分子、あるいはシグナル伝達経路に着目した解析にとどまり、その全容の解明には至っていない。本研究において我々は lncRNA を標的とする CRISPRi スクリーニングを立ち上げた。この A549 dCas9 細胞を用いることにより、lncRNA のみならず、タンパク質を標的とする gRNA を用いることにより、lncRNA とタンパク質の網羅的な探索が可能となる。さらに、複数の肺がん細胞に対して CRISPRi スクリーニングを行うことにより、各種の遺伝子変異を背景にもつ肺がん細胞の lncRNA 依存性や組織型との関連へと展開することが可能となる。これにより、lncRNA とタンパク質の複雑な制御機構に着目した複合ス

クリーニングへと発展させる予定である。

タンパク質をコードしない lncRNA は、下流の遺伝子発現などを介して細胞の生存や増殖など様々な生命現象を担うことが知られている。我々はこれまでに、MYC の発現に必須の働きをする MYMLR と、p53 の発現を抑制する TILR を同定・解析し、報告してきた。本研究において我々は、がん細胞の生存・増殖に必須の働きをする lncRNA を探索しており、将来の革新的な治療の開発に繋がることが期待される。

５．文献

1. Kajino T, Shimamura T, Gong S, Yanagisawa K, Ida L, Nakatochi M, Griesing S, Shimada Y, Kano K, Suzuki M, Miyano S, Takahashi T. Divergent lncRNA MYMLR regulates MYC by eliciting DNA looping and promoter-enhancer interaction. EMBO J. 2019 Sep 2;38(17):e98441.
2. Iwai M*, Kajino T*, Nakatochi M, Yanagisawa K, Hosono Y, Isomura H, Shimada Y, Suzuki M, Taguchi A, Takahashi T. Long non-coding RNA TILR constitutively represses TP53 and apoptosis in lung cancer. Oncogene. 2023 Jan;42(5):364-373. (*: equally contributed)

６．論文発表

該当なし