HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

APOBEC3B expression is promoted by lincNMR collaborating with TGF-β-Smad pathway

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-04-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 幸佑 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004349

博士（医学）太田　幸佑

論文題目

APOBEC3B expression is promoted by *lincNMR* collaborating with TGF-β–Smad pathway

（APOBEC3B の発現は TGF-β–Smad 経路と共同で *lincNMR* により促進される）

論文の内容の要旨

［はじめに］

Long non-coding RNA（lncRNA）は、様々な生物学的事象に関っていることが知られており、がんの悪性化に関わるものも報告されている。また、成長因子 TGF-β（Transforming growth factor-β）は、がん細胞を転移・浸潤に有利な間葉系細胞へ転換させる上皮間葉転換の誘導等により悪性化に関わることが知られている。APOBEC family タンパクの APOBEC3B はデアミナーゼ活性を持ち DNA の変異を触媒することでがんの悪性化に関わることが知られている。

以前、本研究室では複数の細胞株において TGF-β により発現誘導され、転写因子 Smad3 と相互作用することで上皮間葉転換を誘導する新規 lncRNA *ELIT-1*（EMT-associated lncRNA induced by TGF-β-1）を発見した。申請者らは、同様に TGF-β によって誘導される lncRNA を発見するため RNA-seq を用いた網羅的解析を行い、lncRNA、*lincNMR*（long intergenic non-coding RNA–nucleotide metabolism regulator）が Huh7 細胞において TGF-β により発現誘導されることを新たに発見した。*lincNMR* は転写因子 YBX1 と相互作用し、ヌクレオチド代謝関連遺伝子を調節することで、がん細胞の増殖促進をはじめとした悪性化に関わることが報告されている。しかしながら、TGF-β を介した発現制御機構及びシグナル伝達下の標的遺伝子の発現調節機構は解明されていない。本研究では、*lincNMR* の誘導機構とその標的遺伝子を探索し、TGF-β シグナルにおけるがんの悪性化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし解析を行った。

［材料ならびに方法］

ヒト肝がん細胞株 Huh7 細胞を TGF-β で刺激し発現誘導された lncRNA を RNA-seq を用いて網羅的解析を行った。RNA-seq より得られた候補 lncRNA の発現誘導機構は種々の阻害剤、シグナル下流の転写因子のノックダウンを用いて qRT-PCR 法で解析した。次に候補 lncRNA のノックダウンにより標的遺伝子を RNA-seq を用いて探索した。RNA-seq のデータから、がんの悪性化に寄与する遺伝子に着目し、lncRNA の標的遺伝子であるか qRT-PCR とウェスタンブロットにより評価した。また、標的遺伝子の発現調節機構について RNA immunoprecipitation assay および luciferase assay で検証した。遺伝子の過剰発現を伴う luciferase assay は、組換え DNA 実験安全委員会認証のもと行われた（承認番号 4-28）。さらに、がんの予後に対する影響をデータベース、GEPIA 及び

Kaplan-Meier Plotter により検証した。

［結果］

ヒト肝がん細胞株 Huh7 における RNA-seq を用いた網羅的な解析の結果、ヌクレオチド代謝に関与し、肝がん等の種々のがん細胞株で高発現していることが知られている *lincNMR* が TGF-β により誘導されることを見出した。また qRT-PCR 法により、複数の細胞株にて *lincNMR* の TGF-β による発現誘導を確認した。公開データベース、ensembl では *lincNMR* には複数の transcript variant が存在することが示されており、それら全てが TGF-β により誘導されていることがわかった。

lincNMR の発現誘導機構を解析したところ、TGF-β の I 型受容体の阻害剤やシグナル伝達分子 Smad2/3 のノックダウンにより抑制されることが判明した。さらに *lincNMR* の標的遺伝子を RNA-seq で解析し、APOBEC3B が *lincNMR* の標的遺伝子であることを見出した。

次に APOBEC3B の TGF-β シグナル伝達による発現調節機構を解明するために、阻害剤や Smad2/3 のノックダウンを行ったところ、*lincNMR* 同様に TGF-β–Smad 経路を介して発現誘導されることが判明した。*lincNMR* が TGF-β–Smad 経路に寄与する可能性を考え、RNA immunoprecipitation assay を行ったところ、*lincNMR* が R-Smad と結合することが判明した。また、R-Smad の過剰発現は APOBEC3B の promoter 活性を増加させ、その活性は *lincNMR* のノックダウンにより抑制された。

In silico 解析により、*lincNMR* と APOBEC3B の発現は、多くの細胞株で正に相関し、両者の高発現はヒト臨床肝がん及び肺がんにおける予後不良と相関していた。

［考察］

TGF-β による *lincNMR* の発現誘導が Smad2/3 のノックダウンにより抑制されたことから、*lincNMR* は TGF-β/Smad 経路により誘導される lncRNA であると考えられる。TGF-β シグナルと APOBEC3B との関連性は不明であったが、*lincNMR* が R-Smad と結合すること、Smad の過剰発現による APOBEC3B promoter 活性の増加が *lincNMR* のノックダウンにより抑制されることから、*lincNMR* は R-Smad と相互作用することで APOBEC3B の発現を調節していると考察できる。さらに、*lincNMR* と APOBEC3B の高発現が予後不良と相関していることから、*lincNMR* は APOBEC3B の発現誘導を介して変異遺伝子を増加させ、がんのさらなる悪性化に寄与していることが示唆された。

［結論］

lincNMR は TGF-β/Smad 経路により誘導され、Smad との相互作用により APOBEC3B の発現を調節し、がんの悪性化に寄与する lncRNA であると示された。これらの結果より、*lincNMR* はがんの予後診断マーカーや分子標的薬の標的

候補遺伝子となり得る可能性が示唆された。