

TM4SF1-AS1 inhibits apoptosis by promoting stress granule formation in cancer cells

Cell Death Dis 2023; 14: 424. doi: 10.1038/s41419-023-05953-3.

Kitajima H, Maruyama R, Niinuma T, Yamamoto E, Takasawa A, Takasawa K, Ishiguro K, Tsuyada A, Suzuki R, Sudo G, Kubo T, Mitsuhashi K, Idogawa M, Tange S, Toyota M, Yoshido A, Kumegawa K, Kai M, Yanagihara K, Tokino T, Osanai M, Nakase H, Suzuki H

要旨 本研究は、胃がん患者の非がん部背景粘膜や胃がん細胞において発現が亢進した長鎖非コード RNA (lncRNA) TM4SF1-AS1 を同定し、胃がん細胞における分子機能を解析した。TM4SF1-AS1 は細胞質顆粒構造体のストレス顆粒の形成促進に作用し、ストレス応答 MAPK シグナルの活性化因子をストレス顆粒に隔離抑制することで胃がん細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

1. 背景

慢性炎症が発がんの母地となり得ることはいくつかのがんでよく知られている。長期の炎症による正常粘膜上皮細胞のエピジェネティックな変化ががん遺伝子やがん抑制遺伝子の発現の異常を引き起こし発がんに至るものと考えられているが、その過程における詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。一方で近年タンパク質に翻訳されることのない長鎖非コード RNA (lncRNA) が、様々な生命現象やがんなどの疾患で特異的な役割をもつことが明らかとなった。本研究では慢性胃炎から胃がんへの発がん過程を研究モデルとして、慢性炎症およびがんに重要な役割を果たす lncRNA の同定とその機能の解明を目的とした。

2. 結果

前がん状態にある炎症の段階から発がんの過程に関わる lncRNA を同定するため、3名の健常者の正常胃粘膜と4名の胃がん患者の非がん部背景粘膜を用いて、遺伝子プロモーター上の転写活性マーカーであるヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) プロファイルを ChIP-seq 法により網羅的に解析した。その結果、胃がん背景粘膜でエピジェネティックな転写活性化を示し、かつ多くの胃がん細胞株でも高頻度に発現の亢進を示した lncRNA TM4SF1-AS1 を同定した。siRNA による TM4SF1-AS1 のノックダウンは胃がん細胞株の増殖抑制を示し、マウスゼノグラフトによる *in vivo* での検討では、テトラサイクリン系誘導 shRNA により TM4SF1-AS1 をノックダウンした胃がん細胞は腫瘍形成が抑制され、TM4SF1-AS1 の過剰発現では腫瘍形成を促進した (図 A)。

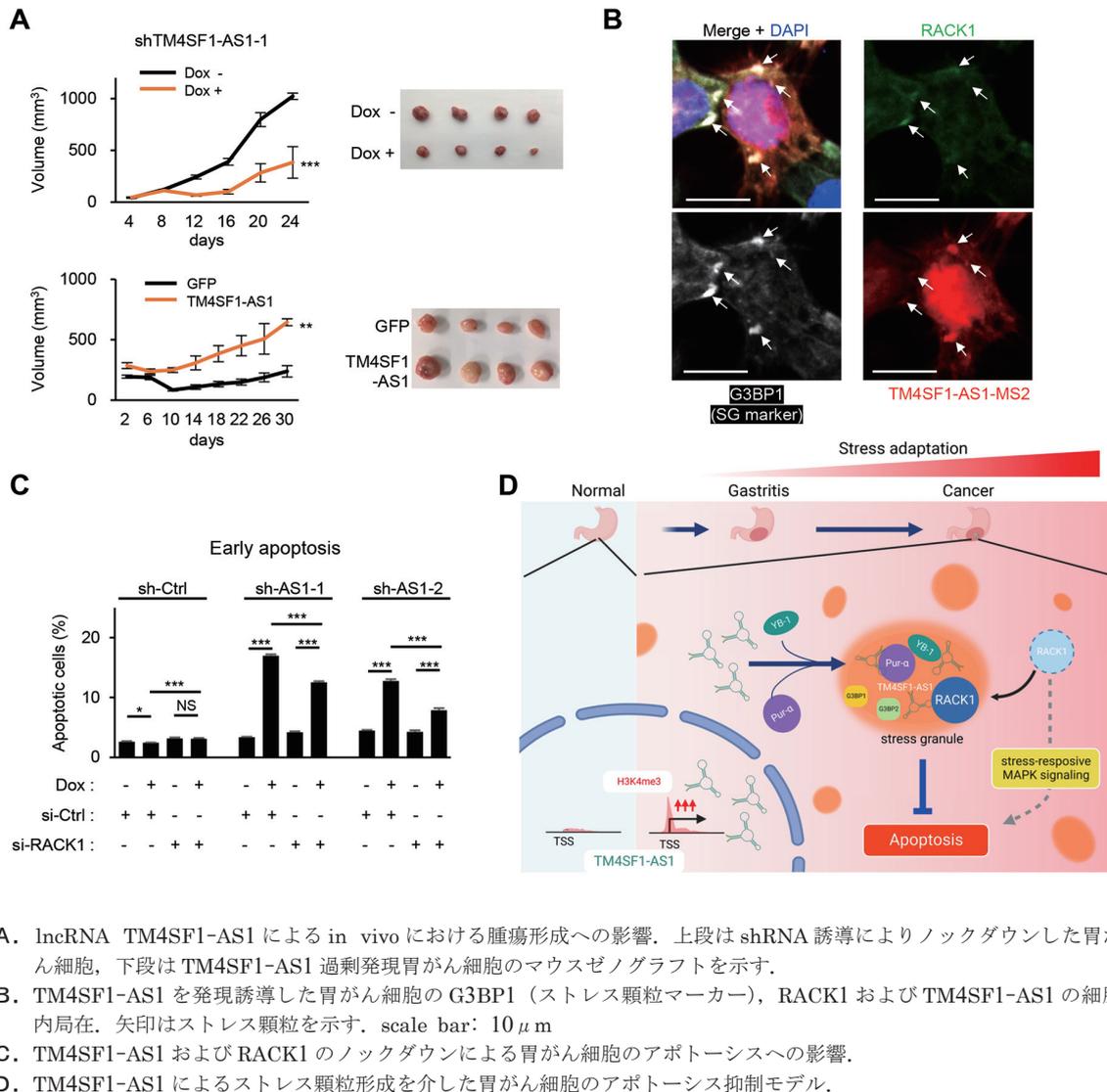
TM4SF1-AS1 の分子機能を明らかにするために、TM4SF1-AS1 の結合タンパク質を網羅的に同定した。ChIRP 法と質量分析 (ChIP-MS) を行い、同定した 143 個のタンパク質には、非膜性顆粒構造体であるストレス顆粒の構成因子が多数含まれていた。その中でストレス顆粒形成因子 G3BP1/2 に着目し免疫蛍

光染色を行った結果、TM4SF1-AS1 の過剰発現がストレス顆粒様構造の形成を促進することを見出した。さらに TM4SF1-AS1 のノックダウンでは顆粒構造体が減弱したことから、TM4SF1-AS1 はストレス顆粒の形成に関与することが示唆された。

我々は TM4SF1-AS1 の相互作用因子の一つとして同定した RACK1 に注目した。ストレス応答性 MAPK シグナルの活性化によりアポトーシスが促進することが知られるが、ストレス顆粒はストレス応答 MAPK シグナルの活性化因子である RACK1 を顆粒内に隔離・阻害することで、結果的にアポトーシスを抑制することが報告されている¹⁾。TM4SF1-AS1 のノックダウンはアポトーシスを亢進し、さらにストレス応答 MAPK p38 のリン酸化レベルを促進することをウェスタンブロットで明らかにした。さらに TM4SF1-AS1 の発現誘導により形成されたストレス顆粒に RACK1 が共局在することを確認した (図 B)。そして、TM4SF1-AS1 と RACK1 がストレス顆粒を介してアポトーシスに与える影響を検討した。まず TM4SF1-AS1 をノックダウンし、次にストレス顆粒の減弱とアポトーシスが誘導されるタイミングで siRNA による RACK1 のノックダウンを行った。細胞をアネキシン V と Propidium Iodide 染色し FACS 解析を行った結果、TM4SF1-AS1 ノックダウンにより誘導されるアポトーシスは、RACK1 のノックダウンにより減弱することが示唆された (図 C)。以上の結果から、TM4SF1-AS1 はストレス顆粒を介してアポトーシスの抑制に関与することが明らかとなった (図 D)。

3. 考察

ストレス顆粒は、ヒートショック、低酸素、低栄養、酸化ストレスや免疫応答などへの細胞のストレス応答に関与することが知られる。ストレス顆粒の機能は明らかではないが、神経変性疾患、ウイルス感染、炎症性疾患やがんに関与することが報告された²⁾。近年がん



A. lncRNA TM4SF1-AS1 による in vivo における腫瘍形成への影響. 上段は shRNA 誘導によりノックダウンした胃がん細胞, 下段は TM4SF1-AS1 過剰発現胃がん細胞のマウスゼノグラフトを示す.
B. TM4SF1-AS1 を発現誘導した胃がん細胞の G3BP1 (ストレス顆粒マーカー), RACK1 および TM4SF1-AS1 の細胞内局在. 矢印はストレス顆粒を示す. scale bar: 10 μ m
C. TM4SF1-AS1 および RACK1 のノックダウンによる胃がん細胞のアポトーシスへの影響.
D. TM4SF1-AS1 によるストレス顆粒形成を介した胃がん細胞のアポトーシス抑制モデル.

において, 変異 KRAS 依存的なストレス顆粒の発現上昇がストレス刺激に対する抵抗性の獲得に関与すること, また 5-フルオロウラシルなどの化学療法に対する耐性への関与が示唆された^{3, 4)}.

本研究により, TM4SF1-AS1 が RACK1 をストレス顆粒内に隔離することにより胃がん細胞のアポトーシスを阻害することが明らかとなった. RACK1 は, X 線や遺伝毒性薬物によるストレス下でストレス応答 MAPK シグナルを活性化し, アポトーシスを誘導する. 一方, 低酸素や熱ショックによるストレスでは, RACK1 はストレス顆粒に隔離されストレス応答 MAPK シグナルは抑制される¹⁾. ここで注目すべきは, TM4SF1-AS1 はストレスのない状態でがん細胞のストレス顆粒形成を促し, ストレス誘導性アポトーシスへの抵抗性を付与することである.

ストレス応答は, 過酷な環境に対する細胞の脆弱性を克服するための防御機構であり, その強化はがん細胞にとってストレスの強いがん微小環境下で生き残るための重要な戦略の一つであると考えられる. がん細胞は, 潜在的に生存に不利に働く分子をストレス顆粒内に隔離することにより, ストレスへの耐性を獲得する可能性がある. 我々の結果は, TM4SF1-AS1 がス

トレス顆粒を介してストレス応答を強化し腫瘍形成に寄与する可能性があることを示唆している.

参考文献

1. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1324-1332.
2. Anderson P, Kedersha N, Ivanov P. Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1849: 861-870.
3. Grabocka E, Bar-Sagi D. Mutant KRAS enhances tumor cell fitness by upregulating stress granules. *Cell* 2016; 167: 1803-1813.
4. Kaehler C, Isensee J, Hucho T, Lehrach H, Krobitsch S. 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 6436-6447.

北嶋 洋志

略歴

2001年 弘前大学農学部卒業

2003年 弘前大学大学院農学研究所修士課程修了

2004年 東北化学薬品株式会社生命システム情報研究所研究員

2013年 札幌医科大学医学部分子生物学講座研究支援員

2016年 札幌医科大学医学部分子生物学講座助教