

# 学位論文

癌幹細胞の造腫瘍性に関わる因子の探索とその機能解析

(Identification and characterization of factors involved in the tumorigenicity of  
cancer stem cells)

平成 26 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

平岡 巧士

## Abstract

近年、癌組織の中には様々な性質を持つ癌細胞が存在することが示され、その中には、幹細胞様の性質を持ち高い造腫瘍性を示す癌幹細胞とよばれる細胞集団がいることが明らかとなった。この癌幹細胞を標的とした治療や研究には、癌幹細胞を同定し癌幹細胞の性質を評価することができる癌幹細胞マーカーが重要な役割を持つ。

そこで、本研究では近年の研究で癌幹細胞マーカーとして注目されてきた **LGR5** を指標とし、複数の癌種で癌幹細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子の同定とその機能解析を目指した。**LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5)** は、近年の研究により、リガンドである **R-spondins (RSPOs)** と複合体を形成することで **Wnt** シグナルを活性化することが明らかとなっている。本研究では **Wnt** シグナルが癌幹細胞の維持に重要な役割を持つグリオブラストーマ細胞と大腸癌細胞を用いることで **LGR5** を指標としたスクリーニングによる癌細胞の造腫瘍性に関わる因子の探索とその機能の解析を行った。まず、グリオブラストーマ細胞を用いたスクリーニングの結果、**LGR5** の転写を制御する **SOX9** の同定に成功した。さらに、この **SOX9** の機能を解析した結果、**SOX9** はグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性に関わることが分った。また、大腸癌幹細胞を用いたスクリーニングにより、**non-coding RNA** の **LOC332** の同定に成功した。**LOC332** は機能未知の **non-coding RNA** であったが、その機能を解析した結果、癌遺伝子の **SRSF1** と結合し、**SRSF1** の機能である選択的スプライシングの制御に関わることがわかった。さらにこのスプライシングの標的の遺伝子が癌細胞の造腫瘍性の維持に重要であるため、**LOC332** がこのパスウェイを介して造腫瘍に関わる遺伝子として機能することが予想された。

本研究において、**Wnt** シグナルが重要な役割を担う癌細胞のグリオブラストー

マ細胞と大腸幹細胞を用い、**LGR5** を指標としたスクリーニングを行うことで造腫瘍性に関わる因子を同定することに成功した。これらの因子の更なる解析により新たな癌幹細胞の治療薬の標的となる可能性が期待できる。

## Abstract

In recent studies, it was shown that tumor contains many different types of cancer cells, including cancer stem cells (CSCs). CSCs are regarded as a small subpopulation of tumor cells with stem cell like properties and high tumorigenicity. Development of novel therapies and studies targeting CSCs require CSC markers which identify CSC and evaluate their properties.

In this study, we performed CSCs research on several types of cancer using LGR5 gene which is regarded as a novel CSC marker. LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) has been reported to bind R-spondins and activate Wnt signaling in recent studies. We performed search for cancer associated genes and their functional analysis in glioblastoma and colorectal cancer cells in which Wnt signaling plays an important role using a screening focusing LGR5. Firstly, we identified SOX9 as a transcription factor involving LGR5 expression with a screen using glioblastoma stem cells.

Moreover, functional analysis of SOX9 showed that SOX9 remain tumorigenicity of glioblastoma cells. Secondary, we performed a screening using colorectal cancer stem cells and identified LOC332, an uncharacterized non-coding RNA. We analyzed the function of LOC332 and found that it interact SRSF1 which is an oncogene and influence function of SRSF1 including alternative splicing.

In the present study, we identified novel cancer associated factors in glioblastoma and colorectal cancer stem cell, using screening assay focused LGR5. We speculate that the detailed functional analysis of these factors

could develop a potentially promising target for the therapy of glioblastoma and colorectal cancer.

## 目次

### 第一章 序論

1.1. 癌幹細胞	1
1.2. LGR5	1
1.3. 癌幹細胞マーカー	2
1.4. 本研究の目的	3

### 第二章 材料と方法

2.1. 細胞培養	
2.2. siRNA のトランスフェクション	
2.3. real-time PCR	
2.4. プラスミドの作成	
2.5. ルシフェラーゼアッセイ	
2.6. 抗体	
2.7. ウェスタンブロット法	
2.8. Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) アッセイ	
2.9. Lipofectamine2000 (invitrogen)	
2.10. shRNA 発現レンチウィルスの感染	
2.11. 免疫不全マウスへの検体由来グリオブラストーマ幹細胞の移植	
2.12. 免疫不全マウスへの大腸癌細胞の皮下移植	
2.13. マウス脳切片の作製	
2.14. パラフィン切片の組織染色	
2.15. MTT アッセイ	

- 2.16. Sphere Assay
- 2.17. 生存曲線の作図
- 2.18. Cell Titer Glo アッセイ
- 2.19. 核分画
- 2.20. RNA プルダウンアッセイ、MS 解析
- 2.21. RIP アッセイ
- 2.22 スプライシング解析

### 第三章 結果

- 3.1. グリオブラストーマ細胞の造腫瘍性に関わる因子
  - の探索とその機能解析 15
  - 3.1.1. LGR5 によるグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性の制御 15
  - 3.1.2. LGR5 の転写制御因子の探索 16
  - 3.1.3. SOX9 による LGR5 の転写制御 17
  - 3.1.4. SOX9 によるグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性の制御 18
  - 3.1.5. 小まとめ① 19
- 3.2. 大腸癌幹細胞の造腫瘍性に関わる因子の探索とその機能解析 20
  - 3.2.1. LGR5 の発現と増殖能を指標としたスクリーニング 20
  - 3.2.3. LOC332 は大腸癌細胞の造腫瘍性に必要である 21
  - 3.2.4. LOC332 は SRSF1 と結合する 22
  - 3.2.5. LOC332 は SRSF1 を介した選択的スプライシングに必要である 23
  - 3.2.6. 小まとめ② 23

### 第四章 考察 25

第五章 結論	33
圖	35
参考文献	58
謝辭	63



## 第一章 序論

### 1.1. 癌幹細胞

近年、癌組織の中には様々な性質を持つ癌細胞が存在することが示され、その中には、幹細胞様の性質を持ち高い造腫瘍性を示す癌幹細胞とよばれる細胞集団がいることが明らかとなった<sup>1</sup>。この癌幹細胞は造腫瘍能に加え、抗癌剤や放射線への高い耐性を示すことから、悪性腫瘍の再発や転移に関わっていることが予想される<sup>2</sup>。そのため、癌幹細胞の性質と挙動を理解することが、悪性腫瘍に対する有効な治療法の開発に必要であると考えられている。

### 1.2. LGR5

LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) は GPR49 と呼ばれ、巨大な細胞膜外ドメインと七回膜貫通ドメインを持つ G タンパク質連結型受容体の一つであり、Wnt シグナリングの標的の一つとしても知られている<sup>3</sup>。近年の研究により、R-spondins (RSPOs) が LGR5 のリガンドとして同定され、RSPOs と LGR5 の複合体は Wnt リガンドと受容体の Frizzled-LRP 複合体と結合することで Wnt シグナリングを活性化することが明らかとなった<sup>4</sup>。RSPOs は LGR5 と結合することで細胞膜上から RNF43 及び ZNRF3 を除去する。RNF43 と ZNRF3 は膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼとして Frizzled 受容体を分解し Wnt シグナリングを阻害するため、RSPOs-LGR5 複合体の働きは Wnt-Frizzled 複合体の安定化に寄与する<sup>5</sup>。さらに、LGR5 は幹細胞の自己複製能に必要であり、小腸の腸管や毛包中で自己複製する幹細胞を同定するためのマーカーとしても使われている<sup>6</sup>。それに加えて、LGR5 は大腸癌やグリオブラストーマを含むいくつかの癌種で発現が亢進していることが報告されている<sup>7</sup>。

また、大腸癌やグリオブラストーマでは LGR5 は癌幹細胞の生存に必要であり、その発現は患者の予後不良と相関性があることが知られている<sup>8</sup>。

### 1.3. 癌幹細胞マーカー

癌幹細胞は腫瘍の中で自己複製能、多分化能、造腫瘍能といった性質を持つ小さな細胞集団であり、この癌幹細胞を標的とした治療や研究には、癌幹細胞を同定し癌幹細胞の性質を評価することができる癌幹細胞マーカーが重要な役割を持つ。癌幹細胞は今までの研究で多くの癌種で存在することが示されており、また共通の癌幹細胞の性質を持つことから、様々な癌種の癌幹細胞を同じように評価し研究することで癌幹細胞の更なる理解へとつながることが期待されている。しかし、様々な癌種で共通して発現し、癌幹細胞を同定し評価できる癌幹細胞マーカーについての報告はほとんどない。そういった数少ない共通の癌幹細胞マーカーとして今までに最も注目されてきたのが細胞膜貫通型糖タンパク質の一つである CD133 である<sup>9</sup>。CD133 は正常幹細胞でマーカーとして注目されていたが、後に癌幹細胞マーカーを同定することができる重要なマーカーであることが報告された<sup>10</sup>。今までに多くの論文でこの CD133 陽性の癌細胞は自己複製能、多分化能、増殖能そして造腫瘍能といった癌幹細胞性を持つことが報告され、さらに放射線や抗癌剤に対して高い耐性を示すことが証明されている<sup>11</sup>。しかし、これらの報告と同時に他の研究者達に CD133 陰性の癌細胞でも同様の癌幹細胞としての性質が報告され、実際に多くの研究で CD133 が癌幹細胞と非幹細胞の両方で発現していることが証明されている<sup>12</sup>。このように CD133 が癌幹細胞マーカーとして論争の的になる原因の一つとして CD133 の機能が未だに完全に解明されていないことが考えられる。CD133 の機能について今までに多くの研究がなされ様々な機能が報告されているが、それ

らの機能について否定する論文や不一致な機能を報告するものも同様に存在するため、CD133が癌幹細胞において実際にどのように機能し寄与しているのかは明らかになっていない<sup>13</sup>。

#### 1.4. 本研究の目的

癌幹細胞は様々な癌種で自己複製能や造腫瘍能といった性質を共通して示し、腫瘍の再発や難治性の原因となっている。本研究ではこの癌幹細胞に共通して用いることが期待できる癌幹細胞マーカーとして近年注目されてきたLGR5を指標としたスクリーニング系を行った。LGR5は前述の通り、Wntシグナルを昂進する働きを持つことが明らかになっているため、Wntシグナルが癌幹細胞の維持に重要な役割を持つグリオブラストーマと大腸癌において共通のマーカーとして評価できることが期待できる。そこで、本研究ではLGR5を指標としたスクリーニングによりグリオブラストーマと大腸癌における造腫瘍性に関わる遺伝子を探索し、その機能を解析することを目的とした。

## 第二章 材料と方法

### 2.1. 細胞培養

グリオブラストーマ幹細胞培養に用いたグリオブラストーマ検体は、東京大学医学部脳神経外科 TR センターより供与して頂いた。膠芽腫幹細胞 (GB-S) には、DMEM F-12 (Gibco) に B-27 supplement minus Vitamin A (50×) liquid (invitrogen) を添加し、上皮成長因子 (EGF、Wako) と塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF、Wako) をそれぞれ 20 ng/ml の終濃度で加えた培地を用いた。ウイルス作製の際にパッケージングに用いた HEK293FT 細胞 (invitrogen) は、DMEM (ニッスイ) に 10% FBS を添加した培地で培養した。HCT116 細胞 (ATCC) は、McCoy's Medium (Sigma) に 10% 牛胎児血清を添加した培地で培養した。SW403 細胞 (ATCC) は、L-15 (SIGMA) に 10% 牛胎児血清を添加した培地で培養した。細胞培養は全て 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。

### 2.2. siRNA のトランスフェクション

siRNA には Silencer Select Human Extended Druggable Genome siRNA Library (Life Technologies) を使い、トランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX (invitrogen) を使用した。siRNA をトランスフェクションしてから 72 時間後に細胞を回収し実験に用いた。コントロールとしては Silencer Select negative control siRNA #1 (Ambion) を用いた。

siRNA の配列は以下に示す。

siMEF2A#A GAACCAACUCGGAUAUUGUtt

siMEF2A#B GCAUCAAGUCCGAACCGAUtt

siMEF2A#B CCCAGACCCUGAUACUUCAtt

siSP3#A CUUCAACUCCAGUUAGUCUtt

siSP3#B	GACGGACAUUUGAUAAACAtt
siATF2#A	GUGAUACUGUCAAGGUCAtt
siATF2#B	GACAUUUCAGUGCCGAGUAtt
siATF2#C	CAAGUACUGUAAUCACCCAtt
siATF6#A	GGCUCAAAUUCUCAGCUGAtt
siATF6#B	CUCGGUCAGUGGACUCUAtt
siATF6#C	CCCUGAUGGUGCUAACUGAtt
siHES1#C	CACUGAUUUUGGAUGCUCUtt
siMAZ#A	AGGUUUUAACGAUUUGUUUtt
siMAZ#B	CAAUCUCCGGAGGCACGAAtt
siMAZ#C	CCUCAACAGUCACGUCAGAtt
siCDC5L#A	CCAGUACACUUUUGUCUGAtt
siCDC5L#B	GAACCGCCUUUAACAGAUUtt
siCDC5L#C	GAAUGCUCACAGUCAAGUUUtt
siSOX9#B	CGCUCACAGUACGACUACAtt
siSOX9#C	AGCCCGAUCUGAAGAAGGAtt
siLOC332#3	GGGAAACCUUCCUGAAAGAtt
siLOC332#8	UGCUGCUCUUCUUCUGCUtt
siSRSF1#A	GACCUAUGCAGUUCGAAAAtt
siSRSF1#B	GGAUAACACUAAGUUUAGAtt

### 2.3. real-time PCR

RNAの回収には TRIsure (BIOLINE) を用い、cDNAの合成には PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa)を使用した。Real-Time PCRには Light Cycler 480 System

(Roche) と Light Cycler480 SYBER Green I Master. を利用した。得られた結果は  $\Delta\Delta C_t$  法を用いて解析し、コントロールとして、ハウスキーピング遺伝子である HPRT1 または TBP を用いた。real-time PCR に用いたプライマーは以下のとおりである。

LGR5_qPCR_Fw	TCCAACCTCAGCGTCTTCAC
LGR5_qPCR_Rv	CGCAAGACGTAACCTCCTCCA
SOX9_qPCR_Fw	CTGGGAAACATTTGCACTCTT
SOX9_qPCR_Rv	CTTAAGACTGCAGTGAACAAGCA
CD133_qPCR_Fw	TCCACAGAAATTTACCTACATTGG
CD133_qPCR_Rv	CAGCAGAGAGCAGATGACCA
HPRT1_qPCR_Fw	GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA
HPRT1_qPCR_Rv	GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC
TBP_qPCR_Fw	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC
TBP_qPCR_Rv	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG
LOC332_Fw	ATCGAGACCCTACACAGGCT
LOC332_Rv	CCTGACCCAAAGACCCTTCC
SRSF1_Fw	CTCCAAGTGGAAGTTGGCAGGATT
SRSF1_Rv	ACACCAGTGCCATCTCGGTAAACA

#### 2.4. プラスミドの作成

SOX9 cDNA は ATCC から購入した。レポーターコンストラクトは LGR5 のプロモーター領域を PCR により増幅し pGL3 ベクター (Promega) に組み込んだ。全ての PCR 産物は KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を使用して増幅した。

## 2.5. ルシフェラーゼアッセイ

GB2 細胞にレポーターコンストラクトを Lipofectamine2000 (invitrogen) を用いてトランスフェクションした後、24 時間培養した。その後、Dual-luciferase reporter assay kit (Promega) を用いて細胞を溶解しルシフェラーゼ活性を測定した。測定にはルミノメーター (Mithoras LB 940, BERTHOLD) を使用した。

## 2.6. 抗体

抗  $\alpha$ -tubulin (CP-06) 抗体は CALBIOCHEM から、抗 SOX9 抗体 (AB5535) および Rabbit IgG、Mouse IgG は Millipore から、抗 GFP 抗体 (sc-8334) は Santa Cruz Biotechnology から、抗 SRSF1 抗体 (324500) は Invitrogen から購入した。

## 2.7. ウェスタンブロット法

細胞は Lysis バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 7 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM dithiothreitol) で溶解した。SDS-polyacrylamide gel で電気泳動を行い、Immobilon Membrane (Millipore) に転写した後、10%スキムミルクでブロッキングした。1 次抗体溶液を TBS (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1%) で希釈して用い、室温で 1 時間もしくは 4°C で一晩反応させた。2 次抗体は horseradish-peroxidase-conjugated donkey anti-mouse/rat/rabbit immunoglobulin G (IgG) (GE Healthcare) を用い、室温で 1 時間反応させた。発光反応には Enhanced Chemiluminescence Plus Western Blotting

Detection System (GE Healthcare)を用い、撮影には LAS-4000EPUVmini Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) を使用した。

## 2.8. Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは抗 SOX9 抗体と Rabbit IgG (CHEMICON) を用い、主に Upstate Biotechnology 社のプロトコルに従って行った。沈降してきた DNA 断片は、LGR5 プロモーター上に予測された SOX9 結合領域周辺に対するプライマーを用い、real-time PCR によってこの領域を検出した。また、ネガティブコントロールとして Actin のプロモーター領域に対するプライマーを用いた。

Actin_promoter_ChIP_Fw	CACCAGGTAGGGGAGCTG
Actin_promoter_ChIP_Rv	GAAAGGACAAGAAGCCCTGAG
LGR5_promoter_ChIP_Fw	GGGACAAGTGGAGGGAAAGT
LGR5_promoter_ChIP_Rv	GCTTGCACGCTCGTTTTT

## 2.9. Lipofectamine2000 (invitrogen)

shRNA による各遺伝子の発現抑制には、文部科学省ゲノムネットワークプロジェクトで作成した shRNA ライブラリーを用いた。shRNA の各配列は、エントリーベクター pENTR (invitrogen) から、レンチウイルス発現用の最終ベクターである CS-RfA-CG (理化学研究所バイオリソースセンターより分与) に、Gateway LR Clonase II (invitrogen) を用いて組み換えた。この最終ベクターを、ウィルスパッケージングコンポーネント遺伝子が組み込まれた、pCMV-VSV-G-RSV-Rev と pCAG-HIVgp (理化学研究所バイオリソースセンターより分与) と共に HEK293FT 細胞にトランスフェクションした。8 時間後に行う培地交換の際には、ウィルス液への血清の混入を最小限に抑えるため、



DMEM F-12 に B-27 supplement minus Vitamin A (50×) liquid を添加した血清不含培地を用いた。37°C で 72 時間培養した後、培養上清から超遠心によってウイルスを沈殿させ、PBS に希釈してウイルス液とした。ウイルス感染の際は、24 穴プレートの各穴に GB2 細胞または HCT116 細胞を  $5 \times 10^4$  個ずつまいた。感染効率を上げるため、培地の体積は通常培養時に使用する体積より少ない 300  $\mu$ l とした。各穴にウイルス液を添加し、37°C で 1 時間ウイルスを吸着させた後、培地を 700  $\mu$ l 加えて全体積を 1 ml とした。CS-Rfa-CG を用いて作製したウイルスは、shRNA と独立して GFP を発現するため、各サンプル毎に蛍光顕微鏡下で GFP の蛍光を指標に感染効率を確認した。

#### 2.10. shRNA 発現レンチウイルスの感染

GB2 細胞を GFP でラベルする際に用いたレンチウイルスの作成には、まずレンチウイルス発現用のベクターである CS-Rfa-CG を、ウィルスパッケージングコンポーネント遺伝子が組み込まれた pCMV-VSV-G-RSV-Rev と pCAG-HIVgp (理化学研究所バイオリソースセンターより分与) と共に HEK293FT 細胞に Lipofectamin 2000 (invitrogen) を用いてトランスフェクションし、8 時間後に培地交換を行った。GB2 細胞に感染させるウイルスを作戦するには培地交換にはウイルス液への血清の混入を最小限に抑えるため、DMEM F-12 (Gibco) に B-27 supplement without Vitamin A (50×) liquid を添加した血清不含培地を用いた。37°C で 72 時間培養した後、培養上清から超遠心によってウイルスを沈殿させ、PBS に希釈してウイルス液とした。ウイルス感染の際には培地量を通常培養時の 1/10 とし、ウイルス溶液を添加して 37°C で 1 時間培養することでウイルスの吸着効率をあげた。ウイルス感染後は、通常培養時の培地量を加えて 3 日以上培養し、蛍光顕微鏡下で GFP の発現を確認した。

SOX9#5           GCAAGCTCTGGAGACTTCTGA  
SOX9#6           GCGACGTCATCTCCAACATCG  
LGR5#1           ATGGACGACCTTCATAAGAAAGA  
shLOC332#2       GTAGGTACCGTGATTCTGA  
shLOC332#3       GTGAACTCACCTGAACT

#### 2.11. 免疫不全マウスへの検体由来グリオブラストーマ幹細胞の移植

レンチウイルスを GB2 細胞に感染させた後、培養 3 日目に GFP の発現を確認した。発現を確認できた細胞について  $5 \times 10^3$  個/ $\mu\text{l}$  になるよう PBS を用いて調整し、免疫不全マウスに移植した。免疫不全マウスには、4 週齢の雄の BALB/cA-nu/nu を用いた。マウスをネンブタールによって麻酔後 (1 mg/kg)、大脳皮質 (ブレグマより 1 mm 前方、2 mm 右方、頭蓋表面より深さ 3 mm) に細胞懸濁液を 2  $\mu\text{l}$  ずつ注入した。

#### 2.12. 免疫不全マウスへの大腸癌細胞の皮下移植

LOC332 をターゲットとした shRNA を発現するレンチウイルスを HCT116 細胞に感染させ、3 日後に細胞を 6 週齢の免疫不全マウス (BALB/cAJcl-nu/nu, CLEA Japan) に皮下注射し、経過観察及び腫瘍の大きさを測定した。すべての動物実験は the Animal Ethics Committee of the University of Tokyo のガイドラインに基づいて行われた。

#### 2.13. マウス脳切片の作製

GB2 細胞移植 3 ヶ月後のマウスから脳を取り出し、3.7%中性ホルマリンで固定した。ハイパーセンターXP (Thermo Shandon)を用いてパラフィン包埋後、

デイスペンシングコンソールIV (Tissue-Tek)を用いてブロックに成形し、RM2145 (Leica)で厚さ 4  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、APS コートスライドガラス上で伸展し貼り付けた。切片を APS コートスライドガラスに貼り付けてから 42°C で一晩放置した後、免疫染色に用いた。

#### 2.14. パラフィン切片の組織染色

マウス脳切片は脱パラフィン処理を行った後、10 mM クエン酸 (pH6.0) に浸して 105°C、20 分でオートクレーブすることで賦活化し、次に 3%過酸化水素水/PBS に浸して室温で 10 分間静置することで、内在性のペルオキシターゼの非働化を行った。10% goat serum/0.2% TritonX100-PBS を用いて室温で 30 分間、ブロッキング処理を行った。1 次抗体反応には 0.2% TritonX100-PBS で、抗 GFP 抗体 (Santa Cruz、SC-8334)を 100 倍希釈して用いた。反応は湿箱に入れ 4°C 中で一晩行った。次に、VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (VECTORLABORATORIES, INC)を用いて DAB 染色を行った。具体的にはビオチン化抗 IgG 抗体を PBS で 200 倍に希釈し、室温で 30 分間反応させた後、室温で 30 分間 ABC 反応を行った。Imm Pact DAB (VECTORLABORATORIES, INC)を用いて発色させ、その後ヘマトキシリン染色液を用いて核染色を行った。パラフィン透徹処理後、Permount (Fisher chemicals)を用いて封入した。観察には顕微鏡の AX70 (OLYMPUS)を使用した。

#### 2.15. MTT アッセイ

MTT アッセイは GB2 細胞にレンチウィルスを感染後、6 日間培養し、24 ウェルプレートにまき直した。さらに 12 時間培養し MTT を終濃度 0.5 mg/ml になるように添加し、37 °C で 4 時間インキュベートした。その後、上清を除去し、

可溶化溶液(0.01M HCl 10%SDS)を加えて溶かした。溶液の吸光度は Mithras LB 940 (BERTHOLD TECHNOLOGIES)を用いて 570nm の波長を測定することで計測した。

#### 2.16. Sphere Assay

GB2 細胞にレンチウイルスを感染させた後、培養 6 日目に細胞をトリプシン処理し、200,500,1000 の細胞数で 96 ウェルプレートに撒きなおしたその後、細胞を 2 週間培養しスフィアの数計測した。計測には In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) を用い、解析には Developer 1.9.1 software (GE Healthcare)を使用した。

#### 2.17. 生存曲線の作図

GB2 細胞の移植後の各免疫不全マウスの生存日数を記録し、カプラン・マイヤー生存曲線を作図した。二群間の腫瘍形成能の差を評価するためログランク検定を行った。

#### 2.18. Cell Titer Glo アッセイ

Cell Titer Glo アッセイでは Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて細胞内の ATP レベルを測定することにより間接的に細胞の生存率を算出した。蛍光強度は Mithras LB 940 (BERTHOLD TECHNOLOGIES) を用いて測定した。

#### 2.19. 核分画

細胞ペレットを低張バッファー (10 mM HEPES pH7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Nonidet-P40 (NP40)) に懸濁し、氷上で 15 分静置し、ピペットマンを用いて 10 回ピストン運動した後、1,000 x g, 4° C, 10 min 遠心した。上清を取り、細胞質画分とし、沈殿を高張バッファー (20 mM HEPES pH 7.5, 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP40) に懸濁し、4° C, 30 min ローテーションした。その後、6,000 x g, 4° C, 15 min で遠心して上清を取り、核画分とした。

## 2.20. RNA プルダウンアッセイ、MS 解析

CTP と Biotin-14-CTP (Invitrogen) の量比を 4:1 として MAXI script T7 Kit (Ambion) を用いてビオチン標識 RNA の合成を行った。細胞の抽出液 (200 μg) とビオチン標識 RNA を混和し、4° C, 1 h でインキュベートした。

Streptavidin-Coupled Dynabeads (Invitrogen) を用いてビオチン標識 RNA 及び RNA に結合するタンパク質を回収した。結合タンパク質は SDS-PAGE により分離した後、銀染色またはウェスタンブロッティングにより検出した。銀染色には SilverQuest Silver Staining Kit (Invitrogen) を用いた。泳動バンドを切り出し、nanoflow LC system (Dina-2A, KYA Technologies) と linear ion trap-orbitrap mass spectrometer (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific) により含まれるタンパク質を同定した。タンパク質の同定には Mascot ver. 2.4.01 (Matrix Science) プログラムを用いた。

## 2.21. RIP アッセイ

細胞は Lysis バッファー (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 0.5% NP40, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, ptotease inhibitors, RNase Inhibitor (Promega)) を用いて溶解した。その上清に各抗体 (抗 SRSF1 抗体, mouse IgG) を添加し、4° C, 1 h ローテーションした。その後、30  $\mu$  L の Protein G Dynabeads (Invitrogen)を加え更に 4° C, 1 h ローテーションした。ビーズは Wash buffer (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% NP40) を用いて 3 度洗った後に、PBS で 2 度洗い、Total RNA Isolation kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて共沈された RNA を回収し、real-time PCR により解析した。

## 2.22 スプライシング解析

細胞から回収した total RNA 500 ng を SuperScript III Reverse Transcriptase ( Life Technologies)を用いて mRNA の全長を逆転写した。プライマーには Olig dT を用いた。PCR 産物は Blend Taq (TOYOBO) を用いて増幅した。使用したプライマーは以下に示す。

BIN1-ex11F	CCTCCAGATGGCTCCCCTGC
BIN1-ex14R	CCCGGGGGCAGGTCCAAGCG

## 第三章 結果

### 3.1. グリオブラストーマ細胞の造腫瘍性に関わる因子の探索とその機能解析

#### 3.1.1. LGR5 によるグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性の制御

当研究室ではグリオブラストーマの解析のため、ヒトグリオブラストーマ検体から癌細胞株 GB2 細胞を樹立している。GB2 細胞は既に報告されている通り、無血清培地培養下で神経幹細胞様のスフィアを形成し、幹細胞マーカーの Nestin と SOX2 の発現が見られた<sup>14</sup>。また、GB2 細胞を免疫不全マウスに移植した際、GB2 細胞が極めて高い腫瘍形成能を示し、浮遊培養及びラミニンコーティングによる接着培養による継代でもこの性質を維持することを確認している<sup>15</sup>。以上のことから GB2 細胞はグリオブラストーマ幹細胞を豊富に含み高い造腫瘍能を維持した細胞株であると考えられるため、本研究ではこの GB2 細胞を用いグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性に関わる因子の研究を行った。

LGR5 がグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性に必要であることを確認するため、GB2 細胞に LGR5 を標的とした small hairpin RNA (shRNA) を発現するレンチウイルスを感染させた。その結果、LGR5 の発現抑制により GB2 細胞の増殖が低減することが分かった (図 1-1A、B)。さらに、GB2 細胞を免疫不全マウスの前頭葉に移植し生存期間を測定した結果、LGR5 をノックダウンした GB2 細胞を移植したマウス群の生存曲線がコントロール群に比較して改善することが分かった(図 1-1C)。これらの結果は、以前の研究で報告されているグリオブラストーマでの LGR5 発現の亢進や増殖活性への寄与と一致するため、GB2 細胞においても LGR5 の発現が造腫瘍性に貢献していることが示唆された<sup>7</sup>。

### 3.1.2. LGR5 の転写制御因子の探索

LGR5 のノックダウン実験の結果から、LGR5 の発現を維持する因子がグリオブラストーマの造腫瘍性に寄与している可能性が考えられる。そこで、LGR5 の発現を正に制御する転写因子を同定することを目的としたスクリーニングを行った。まず初めに、LGR5 のプロモーター領域を同定するために上流 1985 bp から下流 300 bp、上流 300 bp から下流 300 bp、そして転写開始点から下流 300 bp をそれぞれクローニングしルシフェラーゼ遺伝子上流に導入することでレポーターコンストラクトを作成した (図 1-2 A、LGR5-P1、LGR5-P3 及び LGR5-P4)。GB2 細胞にレポーターコンストラクトをトランスフェクションしたところ、LGR5-P4 及びコントロールベクターの pGL3-basic に比べ LGR5-P1,3 で高いルシフェラーゼ活性が見られた (図 1-2 B)。この結果により、上流 300 bp から転写開始点の領域でプロモーター活性がある可能性が示唆された。

次に、このプロモーター領域に結合し LGR5 の発現を制御する転写因子を同定するために、転写因子の結合モチーフ解析を解析ソフトの TRANSFAC を用いて行い、40 個の転写因子を候補因子として同定した。さらにこれらの候補因子から GB2 細胞で高い発現を示す 8 個の転写因子に絞り込んだ。これらの 8 遺伝子に対して siRNA ライブラリーを用いた RNAi スクリーニングを行った結果、SOX9 (Sry-related high-mobility group (HMG) box 9) を標的とした全ての siRNA で LGR5 の転写が抑制された (図 1-3 A、B)。このため、グリオブラストーマ幹細胞において LGR5 の発現を維持する転写因子が SOX9 である可能性が示唆された。



### 3.1.3. SOX9 による LGR5 の転写制御

SOX9 の発現を抑制することで GB2 細胞における LGR5 の発現が抑制することが見出されたため、次に、転写因子である SOX9 が LGR5 の転写を直接制御しているかを検証した。まず、GB2 細胞での SOX9 過剰発現による LGR5 のプロモーター活性への影響をルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。その結果、SOX9 の過剰発現により LGR5-P3 でのみルシフェラーゼ活性が昂進し、LGR5-P4 では昂進が見られなかった (図 1-4)。次に、LGR5-P3 に含まれる LGR5 の上流 300 bp から転写開始点の領域に存在する SOX9-binding site (上流 42bp) に部位特異的ミュータジェネシスによりミューテーションを導入し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだコンストラクトを作成した(図 1-5 A、LGR5-P3-mut)。これらのコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、LGR5-P3 に比べ LGR5-P3-mut でプロモーター活性の顕著な減少が見られた (図 1-5 B)。以上の結果より、LGR5 のプロモーター上において上流 42bp に存在する SOX9-binding site に SOX9 が結合し、LGR5 の転写活性を制御していることが示唆された。

さらに LGR5 のプロモーター上に直接的に SOX9 が結合していることを確かめるため、抗 SOX9 抗体を用いて Chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイを行った (図 1-6 A、B)。その結果、上流 42bp に存在する SOX9-binding site を含む DNA 断片に SOX9 が結合していることが見出された。以上により、SOX9 は LGR5 のプロモーター上に直接結合して LGR5 の転写を正に制御していることが考えられた。

#### 3.1.4. SOX9によるグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性の制御

これまでの研究結果から、グリオブラストーマにおいてはSOX9によるLGR5の発現上昇がグリオブラストーマの高い造腫瘍能に寄与していることが示唆された。SOX9は小腸や肝臓といった様々な組織の幹細胞や前駆細胞の増殖や自己複製に重要な役割を持つ転写因子であると同時に分化多能性にも必須であることが報告されている<sup>16</sup>。また、大腸癌や乳がんといった多様な癌種で発現が上昇し、予後不良との相関性も示されている<sup>17</sup>。そこで、SOX9そのもののグリオブラストーマ幹細胞に対する寄与を調べるため、SOX9の発現を抑制しGB2細胞の増殖とスフィア形性能を調べた。GB2細胞にSOX9を標的としたshRNAを発現するレンチウイルスを感染させ発現を抑制したところ、siRNAによるノックダウンと同様にLGR5の発現が抑制され、癌幹細胞マーカーとして知られるCD133の発現も抑制された(図1-7)。また、MTTアッセイによりSOX9のノックダウンによりGB2細胞の増殖が低減されることが明らかになり、スフィアフォーメーションアッセイにより自己複製能の指標の一つであるスフィア形成能の減衰が見出された(図1-8、9)。次に、SOX9のGB2細胞における造腫瘍能に対する重要性を調べるため、GB2細胞を免疫不全マウスの前頭葉に移植し生存期間を測定し Kaplan-Meier 生存曲線を作図した。その結果、SOX9の発現を抑制することでコントロールのマウス群と比較して有意な延命効果が認められた(図1-10)。以上の結果を踏まえると、グリオブラストーマにおいてSOX9の発現が癌細胞の増殖能や造腫瘍能に大きく寄与することで、グリオブラストーマの悪性度を亢進しているのではないかと推察された。そこで、実際にSOX9がグリオブラストーマの患者の予後に与える影響を調べるため The Cancer Genome Atlas (TCGA)の臨床データと遺伝子発現のデータを比較した

ところ SOX9 が高発現している患者で予後が有意に悪化していることが見出された (図 1-11)。

### 3.1.5. 小まとめ①

GB2 細胞を用いた本研究のスクリーニングにより LGR5 の転写因子として新たに SOX9 を同定した。また、*in vitro* 及び *in vivo* の実験により SOX9 のノックダウンによる GB2 細胞への増殖能の抑制効果が見られたことから、SOX9 による LGR5 の発現制御はグリオブラストーマの維持に重要であることが予想される (図 1-12)。しかし、SOX9 は転写因子であることから LGR5 以外の遺伝子の発現制御にも関わっていることが予想されるため、SOX9-LGR5 のパスウェイの重要性を検証することを目的とした SOX9 をノックダウンした際の LGR5 レスキュー実験等の更なる詳細な解析が今後必要であると考えられる。

## 3.2. 大腸癌幹細胞の造腫瘍性に関わる因子の探索とその機能解析

### 3.2.1. LGR5 の発現と増殖能を指標としたスクリーニング

LGR5 は Wnt シグナルの標的遺伝子の一つであり大腸癌においても発現が亢進していることが報告されている<sup>4</sup>。さらに、LGR5 をノックダウンすることで大腸癌幹細胞の造腫瘍能が減衰し、癌幹細胞性に必須であることが示唆されているため、大腸癌幹細胞においても LGR5 を指標としたスクリーニングにより未知の造腫瘍性に重要な遺伝子を同定することが期待できる<sup>7</sup>。現在、多くの研究で大腸癌幹細胞の造腫瘍性に重要な遺伝子が同定され、その機能が明らかになっている。しかし、タンパク質をコードしない長鎖 non-coding RNA (ncRNA) の領域では未だ大腸癌幹細胞の重要な因子は報告されていない。ncRNA は近年のシーケンサーの発達により膨大な種類が存在すると共に、通常タンパク質をコードする遺伝子と比べて組織特異性が高い発現を示すことから ncRNA が細胞の性質に大きく影響している可能性が示唆され、同時に、ncRNA は mRNA の転写やプロセッシング、翻訳等の多様な機能があることが報告されている<sup>18,19</sup>。そのため、大腸癌幹細胞において LGR5 の発現に影響する ncRNA の探索により大腸癌幹細胞の造腫瘍性に関わる ncRNA を同定できることが期待できる。

当研究室では先行研究によって、検体由来のヒト大腸癌組織から癌幹細胞をソートすることに成功している。細胞表面抗原 CD133, CD44 を指標とした FACS により得られた CD133+/CD44+大腸癌細胞と CD133-/CD44-大腸癌細胞を免疫不全マウスに皮下移植したところ CD133+/CD44+大腸癌細胞で高い造腫瘍性が確認された。これにより、CD133+/CD44+大腸癌細胞に大腸癌幹細胞が豊富に含まれていることが示唆されたため、当研究室ではこの細胞集団で発現

が昂進している ncRNA の同定が行われた。CD133+/CD44+ と CD133-/CD44- それぞれの大腸癌細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、CD133+/CD44+大腸癌細胞において発現が上昇している 73 種類の ncRNA が同定された。そこで本研究では、次に、これらの候補因子の中から癌幹細胞の造腫瘍性に関わる因子を絞り込むことを目的としたスクリーニングを行った。大腸癌幹細胞に対して siRNA ライブラリーを用いた RNAi スクリーニングを行い、LGR5 の発現量の変化と増殖能の変化を real-time PCR と Cell-titer Glo を用いて調べた。その結果、siRNA により発現を抑制することで大腸癌幹細胞の癌幹細胞マーカーの発現と増殖能を減衰させる 6 種類の機能未知な ncRNA を見出した (図 2-1)。ここまでのスクリーニングを共同研究として行い、続いて機能解析を行うにあたり、これらの 6 種類の長鎖 ncRNA から、悪性度の高い大腸癌で発現が昂進している LOC332 を選択し解析を進めた (図 2-2)。

### 3.2.3. LOC332 は大腸癌細胞の造腫瘍性に必要である

まず、大腸癌細胞株の SW403 細胞に対して LOC332 を標的とした siRNA によるノックダウンを行った結果、SW403 細胞の増殖が減衰することが Cell-titer Glo を用いた実験により示された (図 2-3)。また、他の大腸癌細胞株である HCT116 細胞に対して LOC332 を標的とした shRNA を発現するレンチウイルスを感染させ恒常的に発現を抑制し、免疫不全マウスに皮下移植したところ、コントロールの HCT116 細胞に比べ腫瘍形成能が有意に減少していることが見出された (図 2-4)。これらの実験結果から LOC332 の造腫瘍性に寄与する機能は大腸癌細胞株でも維持されている可能性が示唆されたため、大腸癌細胞株を用いた LOC332 の機能解析を行った。

#### 3.2.4. LOC332 は SRSF1 と結合する

現在多くの ncRNA で結合タンパク質を介した機能が報告されているため、LOC332 の機能解析を目的とした結合タンパク質の同定を試みた。まず、LOC332 の細胞内での局在を調べるため HCT116 細胞を用いて分画を行い、real-time PCR によって LOC332 の存在量を調べたところ、核分画中に顕著に存在することが分かった (図 2-5)。そこで、大腸癌細胞の核分画タンパク質の抽出液を用い LOC332 をベイトとした RNA-pulldown アッセイを行い、LOC332 に結合するタンパク質の抽出液を得た。次に、このタンパク質の抽出液から LOC332 に特異的に結合するタンパク質を選別するため銀染色を用いて LOC332 の正配列で特異的にみられるバンドを識別し、このバンドに含まれるタンパク質を MS 解析を用いて検出した (図 2-6)。その結果、LOC332 の結合タンパク質として癌遺伝子の SRSF1 を同定した。

SRSF1 (Serine/arginine-rich Splicing Factor 1) は主に選択的スプライシングによってターゲットとなる mRNA の特定のエクソンをスキップし増殖促進やアンチアポトーシスに働くバリエーションを生成することで癌細胞に寄与していることが知られている<sup>20</sup>。そこで、実際に SRSF1 を標的とした siRNA を SW403 にトランスフェクションし、増殖に与える影響を調べた。その結果、SRSF1 の発現を抑えることで SW403 の増殖活性が有意に抑えられることが Cell titer glo アッセイにより示された (図 2-7)。以上の結果から LOC332 による大腸癌細胞の増殖や造腫瘍性の昂進はこの SRSF1 を介した効果であることが予想されたため、この SRSF1 に与える LOC332 の影響を検証した。まず、LOC332 と SRSF1 の結合検証実験を行い、LOC332 を用いた RNA-pulldown と抗 SRSF1 抗体を用いたウェスタンブロッティングで LOC332 と SRSF1 の結合を確認した (図 2

ー8 A)。次に、抗 SRSF1 抗体を用いて SRSF1 を免疫沈降し結合している RNA を real-time PCR で検出する RIP アッセイを行った結果、SW403 細胞内で内在性の SRSF1 と LOC332 が結合していることが示された (図 2-8 B)。さらに詳細な結合部位の特定のため、LOC332 のデリーションミュータントを作成し結合実験を行い LOC332 の 5'末端側、421~541 bp の領域で結合していることが明らかとなった (図 2-9)。

### 3.2.5. LOC332 は SRSF1 を介した選択的スプライシングに必要である

前述のように SRSF1 は主に選択的スプライシングによって癌細胞に寄与していることが知られているため、この選択的スプライシングへの LOC332 の影響を検証した。LOC332 の発現を抑制した HCT116 細胞で SRSF1 を過剰発現し SRSF1 のターゲットとなる mRNA のバリエーションの生成の変化を RT-PCR で検出した。その結果、ターゲットの一つである BIN1 で SRSF1 の過剰発現により見られるバリエーションの変化が LOC332 のノックダウンにより抑制されることが分かった (図 2-10)。BIN1 は SRSF1 の選択的スプライシングによりエクソン 12a が含まれるバリエーション BIN1+12a が生成されることが知られている。このエクソン 12a の付加により BIN1 が本来持っている癌抑制遺伝子としての機能が失われるため、BIN1 は SRSF1 の癌遺伝子としてのターゲットの一つと考えられている<sup>20</sup>。このことから、大腸癌細胞の造腫瘍性を LOC332 と SRSF1 の複合体が維持する機構はこの BIN1 のバリエーションの生成を介したものである可能性が考えられる (図 2-11)。

### 3.2.6. 小まとめ②

本研究の LGR5 を指標としたスクリーニングにより大腸癌の造腫瘍性に関わ

る因子として新たに ncRNA の LOC332 を同定した。さらに、この LOC332 の機能を解析した結果、癌遺伝子である SRSF1 と結合し、SRSF1 の選択的スプライシングを制御する機能に影響することで大腸癌の造腫瘍性を亢進する遺伝子のバリエントを生成していることが考えられた。本研究では LOC332 のノックダウンにより SRSF1 のターゲットの一つである BIN1 の選択的スプライシングが制御され腫瘍抑制機能を持つ通常の BIN1 が増加し抑制機能を持たないバリエントの BIN1+12a の減少が見られたが、実際に LOC332 による大腸癌の腫瘍形成能の促進に、この BIN1 のバリエントの変化を介したものであるか明らかとなっていない。本研究での LOC332 の発現抑制により生成された BIN1 のバリエントは癌細胞の造腫瘍性に寄与する転写因子 c-MYC への阻害作用が失われていることが知られている<sup>21</sup>。そのため、この LOC332 のさらなる詳細な機能解析は、大腸癌で重要な役割を担う c-MYC の新たな制御機構の解明につながる事が期待できる。



## 第四章 考察

癌細胞の造腫瘍性に重要な遺伝子の探索から、グリオブラストーマの LGR5 の発現を制御する転写因子として SOX9 を同定した(図 1-3)。LGR5 は大腸癌やグリオブラストーマで発現が亢進し、患者の予後不良と相関があることや癌幹細胞の生存に必要であることが報告されていることから、LGR5 の発現を制御する因子はグリオブラストーマや大腸癌の造腫瘍性に寄与している可能性が考えられた<sup>7,8</sup>。当研究室の大腸癌に関する研究により LGR5 の転写を直接制御する因子として GATA6 を既に報告している<sup>22</sup>。GATA6 による LGR5 の転写制御は大腸癌細胞の造腫瘍性に極めて重要な役割を担っていることが示されているが、本研究でグリオブラストーマ細胞として用いた GB2 細胞では RNA-seq のデータより GATA6 の発現が極めて低いことが既にわかっており、このことは GATA6 の発現がグリオブラストーマの造腫瘍性を低下させる働きを持つことを報告した論文と矛盾しない<sup>23</sup>。また、GB2 細胞を用いて行ったルシフェラーゼアッセイでは LGR5 の上流 300 bp から転写開始点までの領域でプロモーター活性を示したが、大腸癌細胞を用いた場合では同じ領域でプロモーター活性が見られなかった<sup>22</sup>。そのため、グリオブラストーマ細胞においては GATA6 ではなく、本研究で同定された SOX9 が LGR5 の発現の維持に重要な役割を担っている可能性がある。

本研究の LGR5 の発現量を指標とした siRNA スクリーニングにより得られた転写因子 SOX9 は、その発現を抑制することで GB2 細胞の増殖能やスフィア形成性能の低下、そして造腫瘍性が抑えられることがわかった。SOX9 以外にも 8 つの転写因子が LGR5 の転写制御に関わる候補因子として残っているが(図 1

ー3)、その中にはグリオブラストーマの造腫瘍性への寄与が報告されている因子が残っている。例えば、その一つである MAZ はグリオブラストーマでの発現の亢進や、血管内皮細胞増殖因子の VEGF の転写を促進することが知られ、グリオブラストーマにとって重要である可能性が示唆されている因子の一つである<sup>24</sup>。これらの因子について SOX9 と同様の更なる詳細な解析を行うことにより、SOX9 以外にも LGR5 の転写を制御し、グリオブラストーマ細胞の造腫瘍性を制御する因子が同定されることが期待できる。

GB2 細胞に対して SOX9 と LGR5 の発現を抑制した結果、どちらの遺伝子でも細胞増殖や造腫瘍性が抑制されることがわかり、二つの遺伝子が GB2 細胞にとって重要な因子であることが確かめられた。しかし、SOX9 による細胞増殖や造腫瘍性の制御に LGR5 の転写制御がどの程度重要であるのかを確かめることができなかった。このことを検証する実験としては SOX9 をノックダウンしたうえで LGR5 を過剰発現させるリカバリー実験が必須である。しかし、GB2 細胞は従来の試薬による LGR5 の過剰発現がうまくいかず、これはトランスフェクション効率が非常に低いことが原因と考えられる。そのため、近年開発された細胞融合による遺伝子導入法のひとつであるセンダイウィルスを利用したプラスミドのトランスフェクションや、近年の技術開発により効率が改善したエレクトロポレーション法等の検討が必要である。

GB2 細胞の増殖能への影響を評価した MTT アッセイでは LGR5 をノックダウンした細胞に比べ SOX9 のノックダウン細胞でより強く増殖が抑制された。shRNA を用いて SOX9 をノックダウンした際の LGR5 の発現量は LGR5 をノックダウンした際の発現量より高いため SOX9 のノックダウンによる GB2 細胞

の増殖抑制の効果は、LGR5 だけでなく他の SOX9 の転写標的の発現量が減少したことも影響していると考えられる。また、GB2 細胞を免疫不全マウスの脳に異種移植することによって造腫瘍性への影響を評価する実験では、増殖実験とは逆に SOX9 をノックダウンした GB2 細胞を移植したマウス群に比べ LGR5 をノックダウンしたマウス群でより延命効果が表れた (図 1-1C、1-10)。このことは LGR5 ノックダウンによる造腫瘍性の抑制効果が SOX9 ノックダウンによるものより高いことを示唆し、細胞増殖への影響を調べた実験結果と一致しない (図 1-1B、1-8)。そのため、マウスの脳に移植した GB2 細胞ではディッシュ上での環境と異なりマウス脳内の微小環境により SOX9 以外の転写因子が LGR5 の発現の促進に関わっている可能性があり、グリオブラストーマ細胞では LGR5 の発現は複数の転写因子によって厳密に維持されていることが推測される。

これらの仮説を検証するためには更なる実験が必要である。まず、SOX9 が他の標的を介した増殖制御を行っている可能性について調べる実験では、SOX9 ノックダウンによる遺伝子発現の網羅的な変化を測定できるマイクロアレイを用いた実験と、SOX9 の全ゲノム上での結合を網羅的に調べることができる ChIP-seq による実験を組み合わせることで SOX9 の標的候補遺伝子を絞り込み、さらに LGR5 の発現を指標とした RNAi スクリーニングを用いた実験や臨床データをを用いた予後との比較により SOX9 による発現促進により GB2 細胞の増殖を亢進させる遺伝子の同定ができるのではないかと考えている。また、マウスの脳内の微小環境において LGR5 の発現を制御する転写因子が SOX9 以外にも存在する可能性について検証する実験としては、H3K27ac 抗体による ChIP アッセイにより転写因子の結合領域を同定する手法を用いた実験が考えられる<sup>25</sup>。免疫不全マウスの脳に GB2 細胞を移植することで形成させた腫瘍を摘出し、こ

の腫瘍を用いた抗 H3K27ac 抗体による ChIP アッセイにより LGR5 のプロモーター上で活性化している領域を特定し、その DNA 配列に含まれるコンセンサス配列を調べることで LGR5 の転写制御を行っている転写因子を予測できることが期待できる。ここで得られた候補となる転写因子について、ディッシュ上での GB2 細胞での発現量とマウス脳で形成した腫瘍中での発現量を比較し、腫瘍中でのみ高い発現を示す候補因子に絞り込み、最終的には shRNA ウィルスを用いて実際に候補因子をノックダウンした GB2 細胞を免疫不全マウスへ移植することで、マウスの脳内の環境で GB2 細胞の LGR5 の発現を制御している転写因子を同定できるのではないかと考えている。

本研究で用いた GB2 細胞は既に報告されている癌幹細胞を含んだ状態で継代可能な培養法により樹立され、当研究室の先行研究により癌幹細胞が豊富に含まれていることが既に報告されている<sup>14</sup>。そのため、本研究の GB2 細胞で見られた SOX9 による LGR5 の発現制御及び SOX9、LGR5 による造腫瘍性の亢進はグリオブラストーマ幹細胞においても機能していることが予想される。この仮説を検証するためには、より厳密なグリオブラストーマ幹細胞であるヒト検体から直接 CD133、CD15 を指標とした FACS により単離した細胞を用いたノックダウン実験や造腫瘍実験が必要である。LGR5 は近年の研究で大腸癌を始めとした多くの癌腫で重要な役割を持つことが示されており、LGR5 を標的とした抗癌剤の研究が進められている<sup>26</sup>。そのため、LGR5 の発現を制御し癌幹細胞の造腫瘍性を制御する可能性がある SOX9 は癌治療の有望なターゲットとなることが期待される。

大腸癌幹細胞を用いたスクリーニング系では ncRNA の一つである LOC332 を新たな造腫瘍因子として同定した。ncRNA は近年の研究により様々な機能があることが報告され、癌においても重要な役割を持つものが報告されている。前立腺癌で発現が亢進している ncRNA の PRNCR1 と PCGEM1 が前立腺癌の重要な癌遺伝子である Androgen receptor (AR) と結合することで活性を調節し造腫瘍性に寄与することが報告されている<sup>27</sup>。本研究において同定された LOC332 についても癌遺伝子として報告されている SRSF1 との結合がわかり(図 2-6, 2-8)、また LOC332 と SRSF1 のノックダウンによる大腸癌細胞の増殖抑制の効果が見られたため(図 2-3, 2-7)、PRNCR1/PCGEM1 と AR の相互作用と同様に LOC332 も SRSF1 と相互作用することで癌遺伝子としての活性を制御している可能性が予想された。SRSF1 は癌遺伝子として多くの報告があり、その中でも選択的スプライシングにより癌細胞の増殖やアンチアポトーシスの性質に寄与することが注目されている<sup>20</sup>。そこで、本研究でも LOC332 による SRSF1 の選択的スプライシング活性の制御が行われているか検証する実験を行い BIN1 で選択的スプライシングによるバリエーションの変化が見られた(図 2-10)。SRSF1 の選択的スプライシングの標的として、様々な遺伝子が示されているが、その中でも BIN1 の選択的スプライシングによるバリエーションの変化と癌細胞の造腫瘍性への寄与は詳しい作用機序が明らかになっているもののひとつである。そのため、LOC332 による BIN1 の選択的スプライシングへの影響を詳細に解析することは SRSF1 の活性制御メカニズムの解明につながると考えられる。

LOC332 が SRSF1 と相互作用し BIN1 の選択的スプライシングを制御する作用機序には様々な可能性が考えられる。近年の研究で mRNA のスプライシング

に関わる ncRNA が報告され、その作用機序が明らかとなっている。これらの ncRNA の中でも mRNA に作用する natural antisense transcript (NAT) とタンパク質のスプライシング因子に作用する MALAT1 の二つが代表的なものとして挙げられる<sup>28,29</sup>。

NAT は細胞中に存在する特定の遺伝子の逆配列 (antisense) をとる RNA として発見され、その中の一つである Zeb2 NAT は Zeb2 の mRNA にある 5'-UTR 領域のイントロンと逆配列をとりイントロン部位と相補結合する。この mRNA と NAT の相補結合により mRNA のこのイントロン部位で起こる選択的スプライシングが阻害されることが報告されている<sup>28</sup>。LOC332 の配列と BIN1 で観察された選択的スプライシングを受ける部位のイントロンには逆配列と呼ばれるほどの相補性は確認されなかったため、LOC332 と BIN1 の pre-mRNA の相補結合によるスプライシングの制御の可能性は考え難いが、この作用機序の可能性についてさらなる検討をするためには LOC332 を断片化したミュータントを作成し、BIN1 のスプライシング部位と相補性が低い領域のみを含む断片と相補性が高い領域を含む断片を過剰発現することで BIN1 の選択的スプライシングへの影響を検証する必要があると考えられる。

また、スプライシング制御に関わるもう一つの代表的な ncRNA である MALAT1 は結合するスプライシング因子の局在に影響することでスプライシングの制御に関わることが報告されている。MALAT1 は細胞の核内構造体に局在し、スプライシング因子をスプライシングを受ける前の pre-mRNA から隔離することで選択的スプライシングの抑制を行う<sup>29</sup>。本研究により LOC332 が核内に局在することが示唆され(図 2-5)、SRSF1 については多くの論文で核内に局在することが示されている。このことから、LOC332 では逆の作用として SRSF1 を pre-mRNA が存在する核質内に局在させることで選択的スプライシングを促

進する可能性が考えられる。そのため、局在変化による SRSF1 の活性制御の可能性を検討するためには LOC332 ノックダウンにより SRSF1 の核局在が変化し、pre-mRNA のスプライシングが抑制される細胞質への局在移行や核内構造体への隔離が見られるかを調べる必要が考えられる。

これらの可能性以外にも相互作用による結合タンパク質側の修飾への影響の可能性が考えられる。本研究の LOC332 と SRSF1 の結合検証を行った RNA-pulldown と Western blot の実験で見られた INPUT と LOC332 pull-down のサンプル間での SRSF1 のバンドのずれは(図 2-8)、SRSF1 のリン酸化修飾によるものである可能性が考えられる。また、本研究で LOC332 との結合が示唆された SRSF1 の RRM2 ドメインは SRSF1 の活性調節ドメインである RS ドメインをリン酸化するリン酸化酵素との結合が報告されている。このことから、LOC332 が SRSF1 の RRM2 ドメインと結合することでリン酸化酵素との結合を阻害し、SRSF1 のリン酸化を抑制している可能性が予想される。SRSF1 は細胞質で翻訳されるとリン酸化酵素の SRPK1 により活性調節ドメインである RS ドメインの N 末側がリン酸化され核内移行が始まり、そのまま核内構造体に凝集する。そして、次にリン酸化酵素の CLK によって C 末側がリン酸化され SRSF1 が核内構造体から遊離し、スプライシングを行う複合体であるスプライソソームと結合することで pre-mRNA の選択的スプライシングを開始する<sup>30</sup>。スプライソソームと結合した SRSF1 がリン酸化状態から脱リン酸化状態へと変わるサイクルにより pre-mRNA の選択的スプライシングが進行するため、LOC332 が核内において SRSF1 の脱リン酸化の制御に関わることで選択的スプライシングの活性を促進する可能性が考えられる<sup>31</sup>。また、pre-mRNA 上でスプライシング因子が結合する exonic splicing enhancer (ESE) 配列への結合能が SRSF1 が脱リン酸化状態のときに亢進されることがわかっているため、

LOC332の結合はスプライシングの進行過程だけでなく SRSF1が選択的スプライシングの標的を選択する段階にも影響している可能性が考えられる。

本研究により SRSF1 と LOC332 が協調して働くことで選択的スプライシングの標的である BIN1 のバリエーションが c-Myc への結合阻害効果のあるものから無いものへ変化することが示唆された(図 2-10, 2-11)。c-Myc は癌遺伝子として知られる転写因子で大腸癌においても癌を亢進する遺伝子の転写を促進する機能が報告されている。そのため、本研究で示唆された LOC332 の大腸癌細胞での造腫瘍因子としての機能は SRSF1 と BIN1 を介して c-Myc の活性を制御することによるものである可能性が期待できる。c-Myc は大腸癌で重要な Wnt signal の標的遺伝子として知られ、この遺伝子の活性を制御する LOC332 は大腸癌の新たな治療標的となる可能性が期待できる。



## 第五章 結論

本研究では、当研究室で樹立されたグリオブラストーマ細胞と大腸癌細胞を用いたスクリーニングにより、それぞれの癌細胞で造腫瘍性に関わる因子を同定した。

グリオブラストーマ細胞を用いたスクリーニングでは造腫瘍に重要な転写因子を同定することを目指した。癌幹細胞マーカーであり、本研究でグリオブラストーマ細胞株として用いた GB2 細胞の造腫瘍性に寄与する LGR5 の転写因子に焦点を当てたスクリーニングを行い、ルシフェラーゼアッセイと *in silico* の解析、そして RNAi スクリーニングを組み合わせた系を用いることで転写因子の SOX9 を同定した。また、大腸癌幹細胞を用いたスクリーニングでは non-coding RNA に限定して造腫瘍性に重要な遺伝子を探索した。このスクリーニングで用いた系ではまず、大腸癌幹細胞で発現が上昇している non-coding RNA を RNA-seq による解析で同定した。さらにこれらの候補因子に対して RNAi スクリーニングによるノックダウンで LGR5 の発現を減少させるとともに細胞増殖を抑制させるものを絞り込み、non-coding RNA の LOC332 を同定した。

次に、これらのスクリーニング系で同定された各遺伝子に対して機能解析を行った。グリオブラストーマ細胞では SOX9 を標的とした shRNA ウィルスを用いた実験により細胞増殖やスフィア形性能、そして造腫瘍能の促進に関わることがわかり SOX9 による LGR5 の転写活性の制御がグリオブラストーマ細胞の造腫瘍性に重要な役割を果たす可能性が考えられた。また、大腸癌細胞では LOC332 はスプライシング因子の SRSF1 との相互作用を介した機能が予想され、SRSF1 の標的として知られる BIN1 の選択的スプライシングに LOC332 が影響

していることを示唆する結果が得られた。この BIN1 の選択的スプライシングにより変化するバリエントは癌の造腫瘍性に寄与していることが多くの論文で報告されているため、LOC332 が SRSF1 に結合し選択的スプライシングの制御を行うことで大腸癌細胞の造腫瘍性に寄与している可能性が予想された。

グリオブラストーマ細胞と大腸癌細胞で同定された 2 つの遺伝子はそれぞれ癌の造腫瘍を促進する制御機構と結び付く可能性が期待できるため、これらの遺伝子の更なる詳細な解析は癌治療の新たな治療法の開発につながる可能性が期待できる。

図

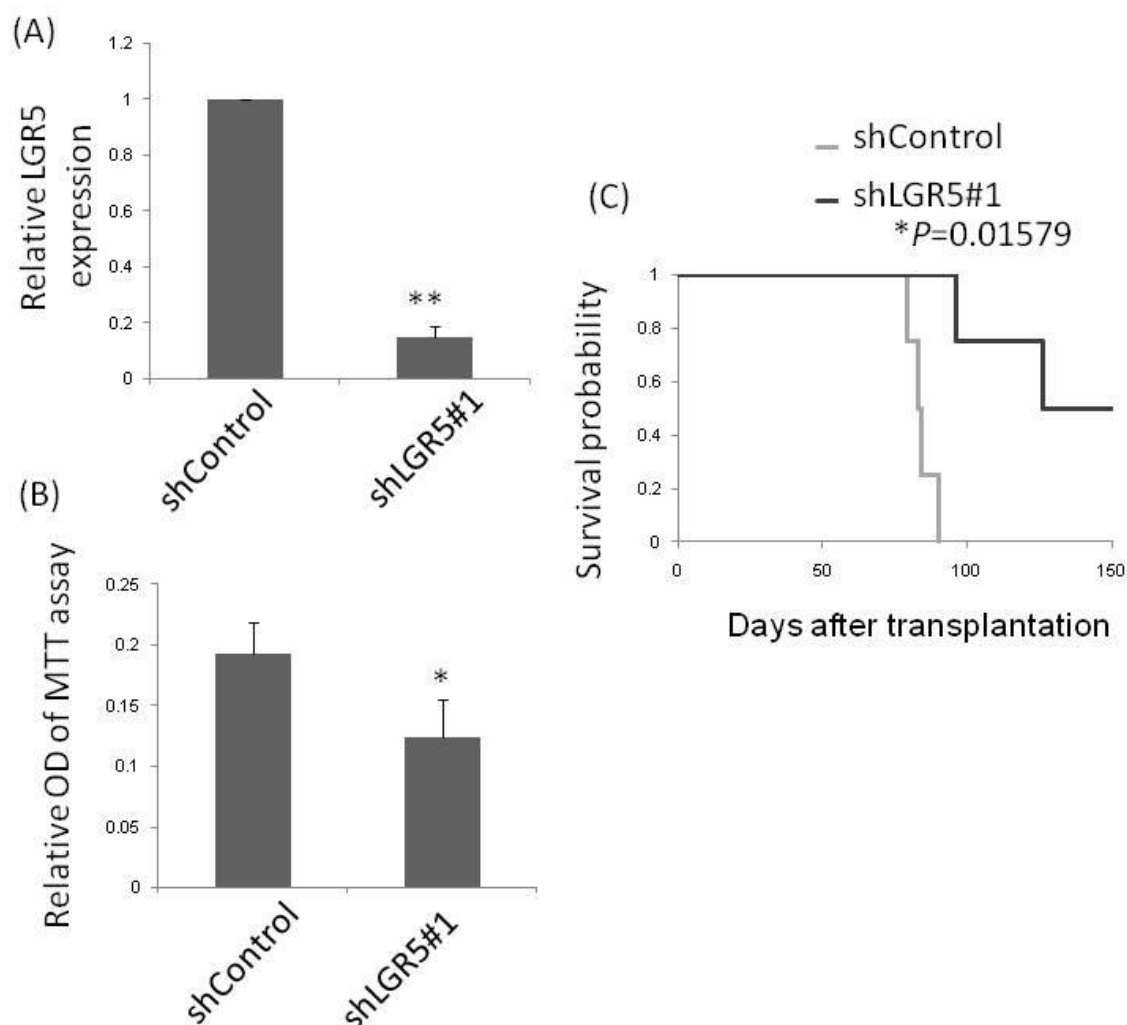


図1-1 LGR5の発現抑制によるGB2細胞の増殖能、造腫瘍能の低減

(A) LGR5を標的としたshRNAを発現するレンチウイルスを感染させたGB2細胞のLGR5の発現量をreal-time PCRを用いて解析した。ハウスキーピング遺伝子はHPRT1を使用した。(B) LGR5の発現抑制によるGB2細胞の増殖能への影響を示す。測定にはMTTアッセイを使用し、吸光度の値で増殖能を表す。(C) LGR5を発現抑制したGB2細胞を移植したマウスのカプランマイヤー生存曲線。エラーバーは標準偏差を示す(n=4)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

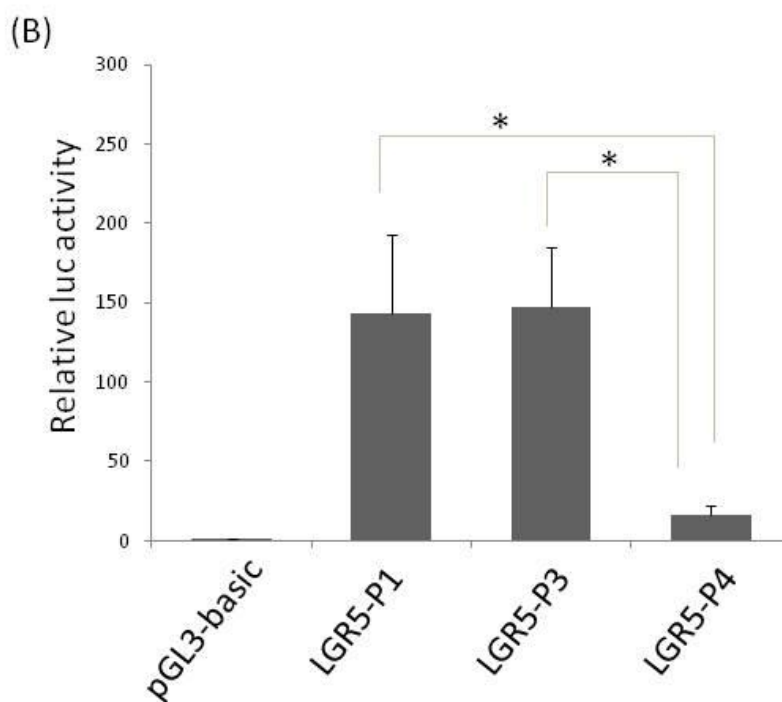
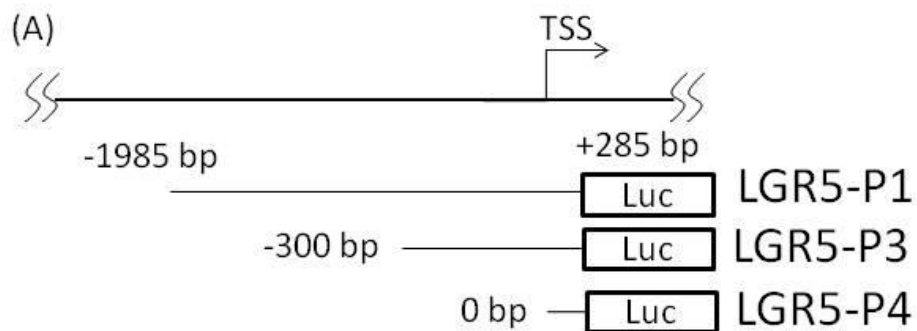
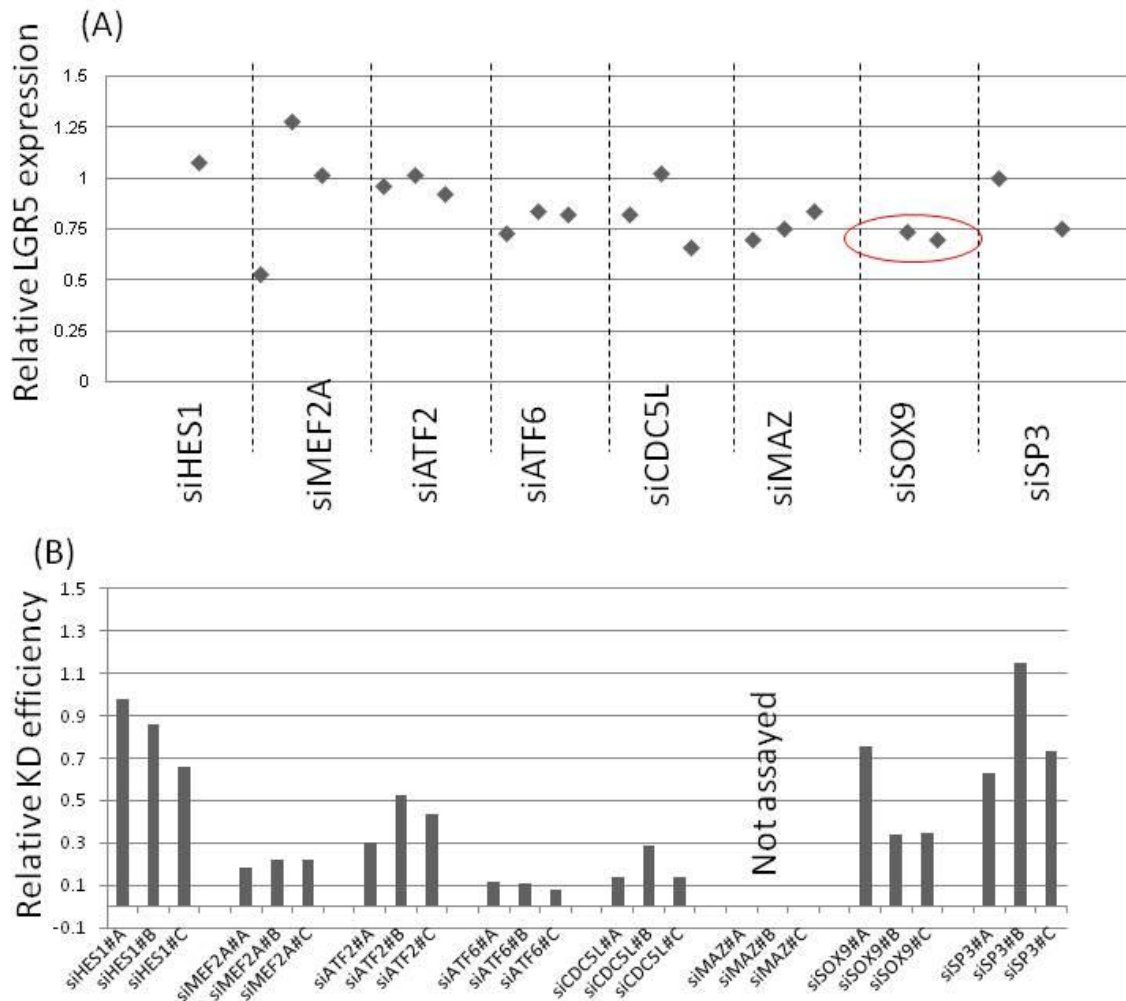


図1-2 GB2細胞においてLGR5のプロモーター活性がある領域  
 (A) 模式図はルシフェラーゼアッセイで用いたレポーターコンストラクトと組み込んだLGR5のプロモーター領域を表す。LGR5のプロモーター領域はルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ。(B) LGR5のプロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトをGB2細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。インターナルコントロールとしてpRL-SV40を使用した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.01$



### 図1-3 LGR5の発現を制御する転写因子のスクリーニング

(A) スクリーニングにより同定された候補遺伝子を標的としたsiRNAをトランスフェクションした各GB2細胞でのLGR5の発現量をreal-time PCRを用いて解析した。ハウスキーピング遺伝子はHPRT1を使用した。標的遺伝子を十分にノックダウンできたもののみ値を示す。円はSOX9を標的としたsiRNAをトランスフェクションした際のLGR5の発現量を表す。(B) 候補遺伝子を標的としたsiRNAをトランスフェクションした各GB2細胞での標的遺伝子のノックダウン効率をreal-time PCRを用いて解析した。十分にノックダウンできたもののみ値を示す。

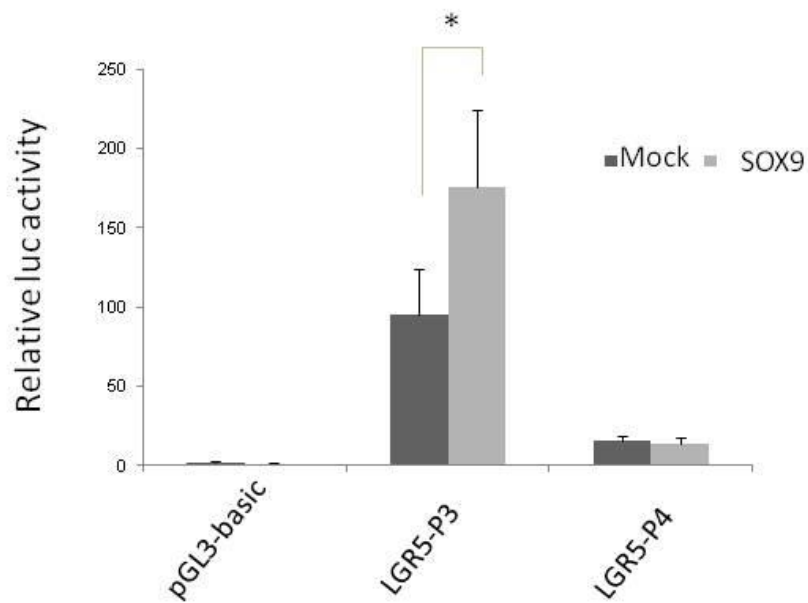


図1-4 SOX9によるLGR5のプロモーター活性の昂進

pcDNA-SOX9またはpcDNA-MockをLGR5のプロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトと共にGB2細胞にトランスフェクションし、プロモーター活性の変化をルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

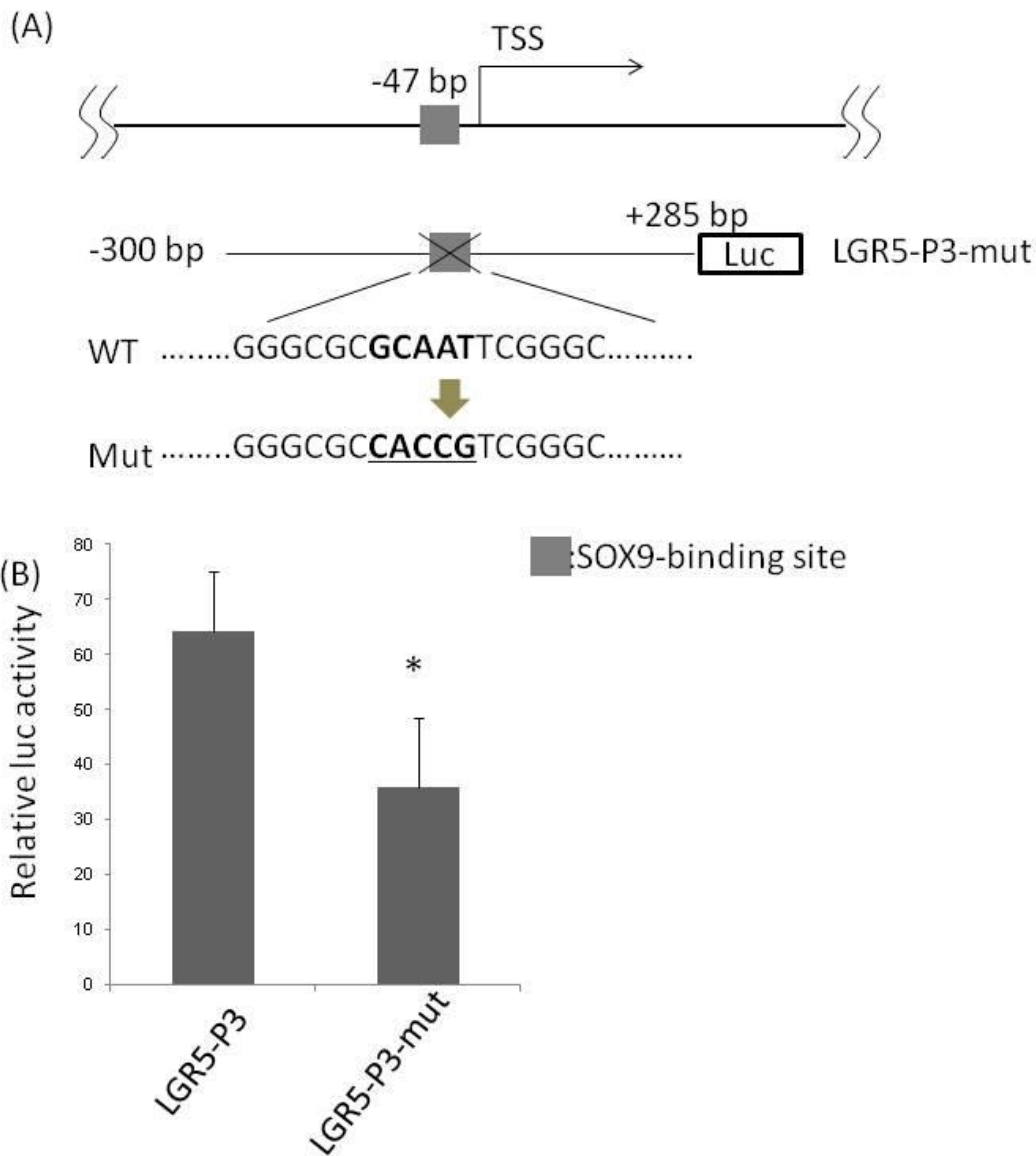


図1-5 SOX9 binding siteへの変異導入によるLGR5のプロモーター活性の抑制

(A) 模式図はルシフェラーゼアッセイで用いたレポーターコンストラクトとLGR5のプロモーター領域に導入したミュートレーションの配列を示す。ミュートレーションはTRANSFACにより示されたSOX9 binding siteのコアモチーフに導入した。グレーのボックスはSOX9 binding siteを示す。(B) 変異を導入したLGR5のプロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトをGB2細胞にトランスフェクションし、プロモーター活性の変化をルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$

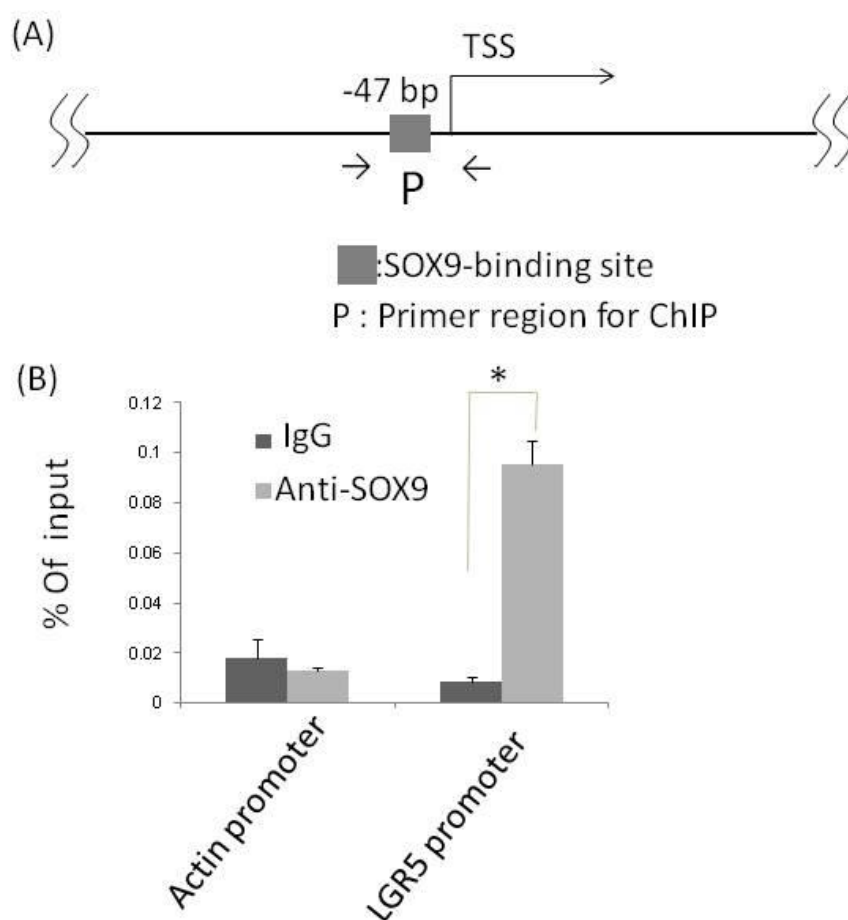


図1-6 SOX9のLGR5のプロモーター領域への直接結合  
 (A) 模式図はLGR5のプロモーター領域を示す。グレーのボックスはSOX9 binding site、Pと矢印はChIPアッセイに用いるプライマーがアニーリングする位置を示す。(B) 抗SOX9抗体とコントロールIgGを用いChIPアッセイを行った。ネガティブコントロールとしてActinのプロモーター領域を検出するプライマーを使用した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$



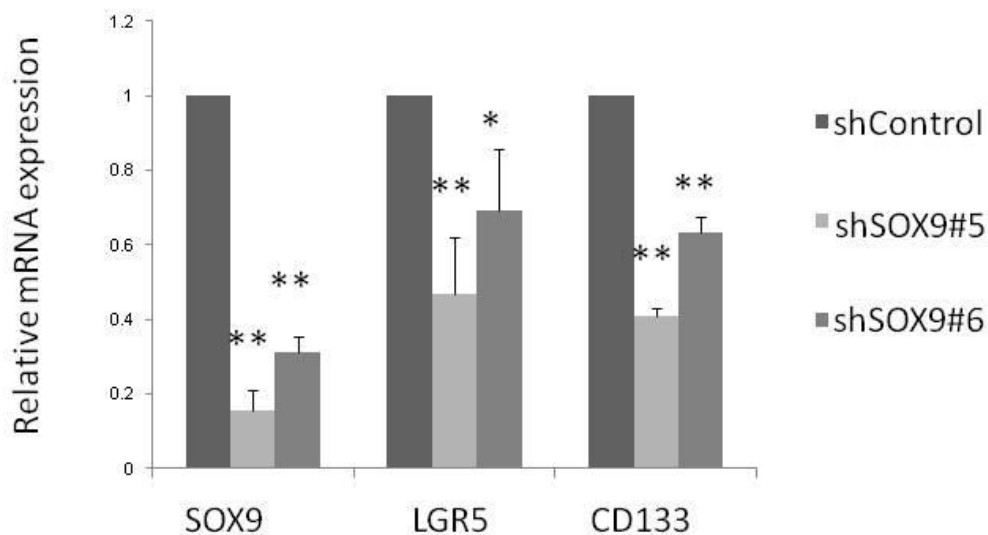


図1-7 SOX9の発現抑制によるGB2細胞の幹細胞マーカーの低減  
 SOX9を標的としたshRNAを発現するレンチウイルスを感染させたGB2細胞のSOX9、LGR5、CD133の発現量をreal-time PCRを用いて解析した。ハウスキーピング遺伝子はHPRT1を使用した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

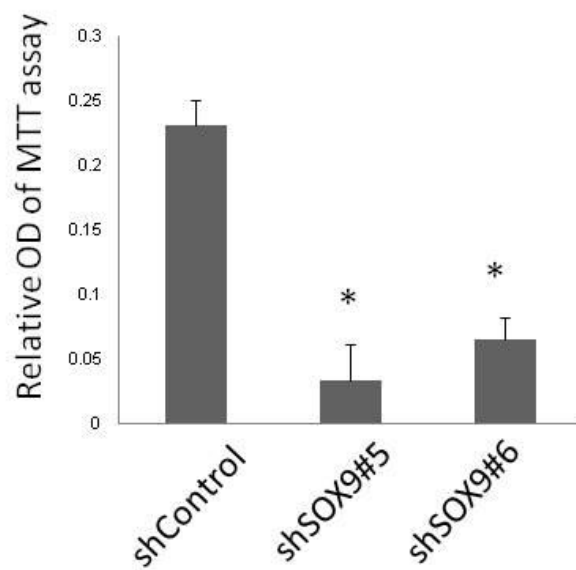


図1-8 SOX9の発現抑制によるGB2細胞の増殖能の低減  
 SOX9の発現抑制によるGB2細胞の増殖能への影響を示す。測定にはMTTアッセイを使用し、吸光度の値で増殖能を表す。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.01$

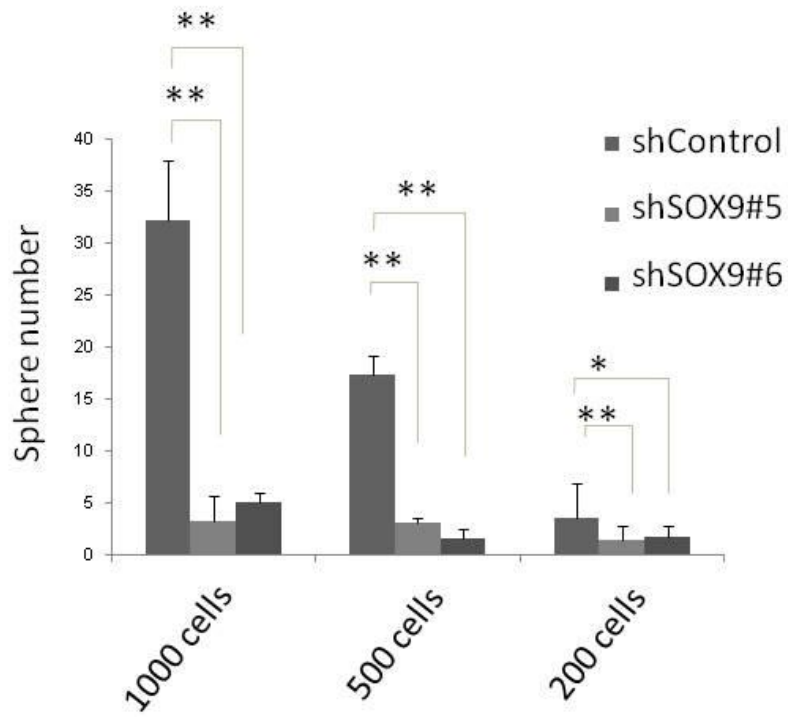


図1-9 SOX9の発現抑制によるGB2細胞のスフィア形性能の低減  
 SOX9の発現抑制によるGB2細胞のスフィア形性能への影響を示す。トリプシン処理後、200,500,1000の細胞数で撒きなおし、2週間培養したスフィアの数を示す。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

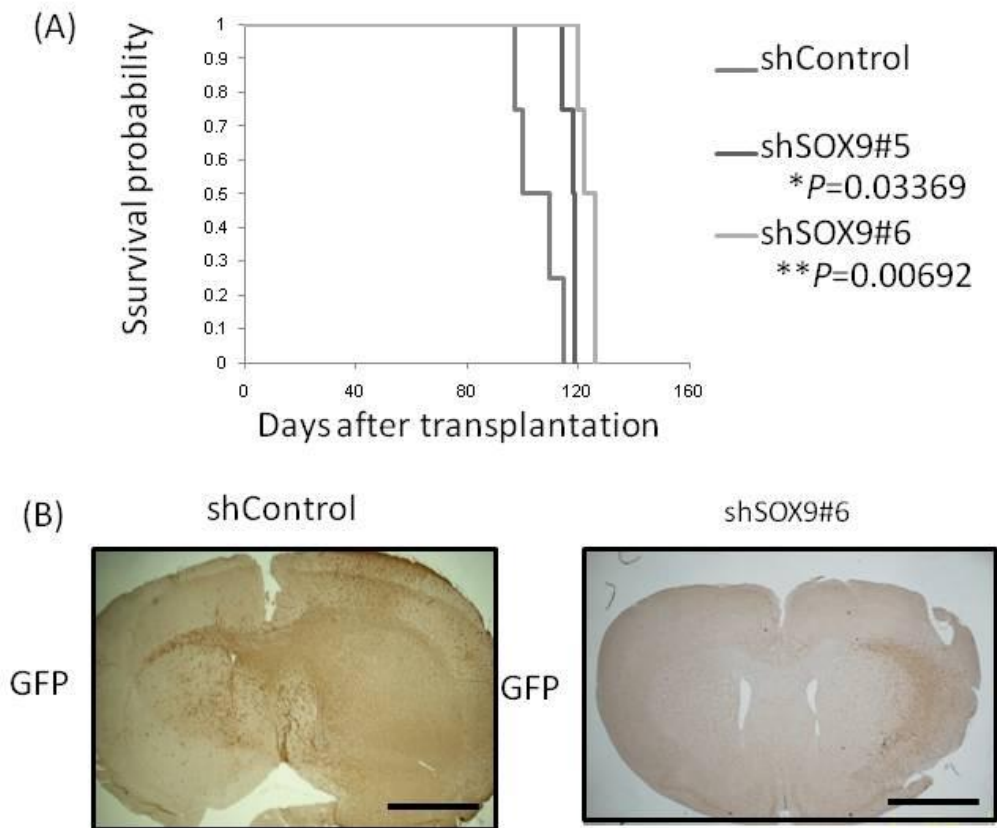


図1-10 SOX9の発現抑制によるGB2細胞の腫瘍形成性能の低減  
 (A) SOX9を発現抑制したGB2細胞を移植したマウスのカプランマイヤー生存曲線 (n=4)。スチューデント検定で\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  (B) (A)で用いたマウスの組織染色。抗GFP抗体を用いた。スケールバーは2 mmを表す。

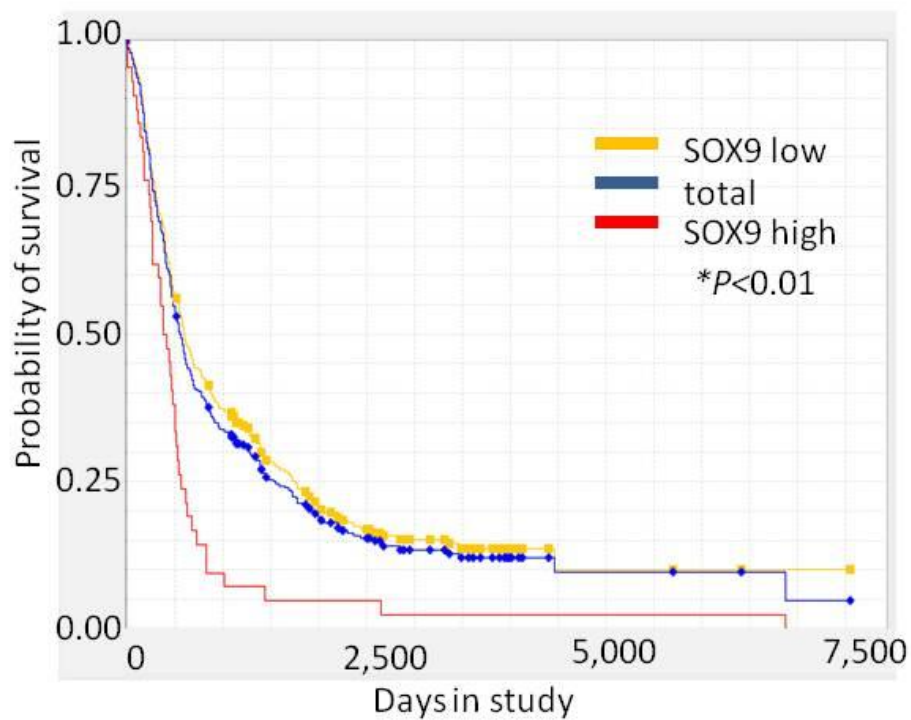


図1-11 SOX9の発現とグリオブラストーマの予後の相関性  
 SOX9の発現が高いグリオブラストーマの患者と発現が低い患者で治療後の生存期間を Kaplan-Meier 生存曲線で示す。データは The Cancer Genome Atlas (TCGA) から得たものを Cancer Genomics Browser を用いて作図した。

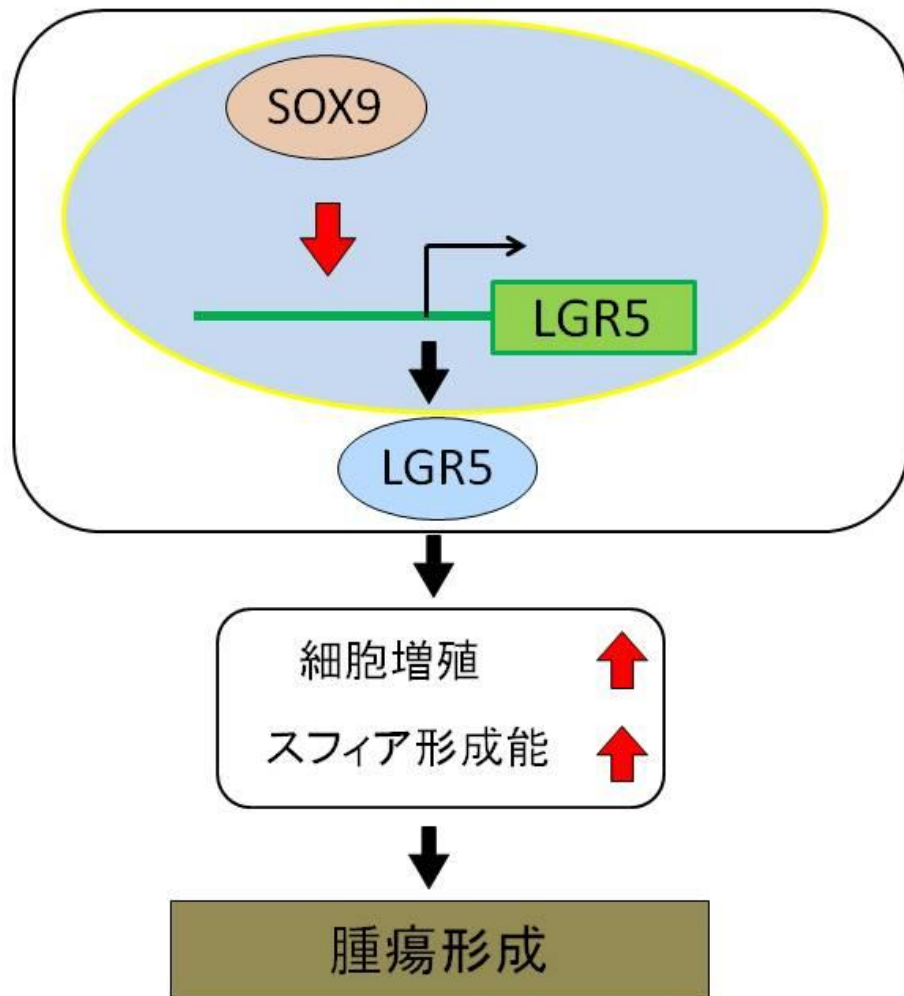


図1-12 SOX9はLGR5の転写を制御することでグリオブラストーマ幹細胞の造腫瘍性に寄与する(モデル図)  
 SOX9はグリオブラストーマ幹細胞内でLGR5の転写を促進する。LGR5はWnt pathwayを促進することが報告されているため、このシグナル系を介して癌細胞の増殖やスフィア形成能を促進し、腫瘍形成に寄与する可能性が考えられる。

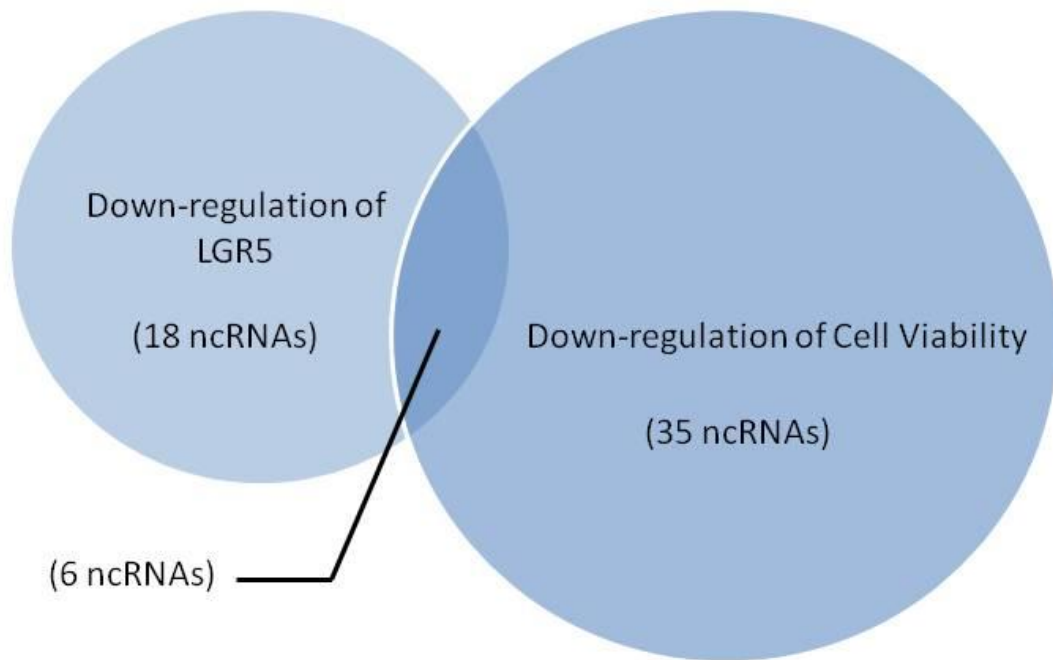


図2-1 LGR5の発現量と増殖能を指標としたスクリーニング  
 模式図は大腸癌幹細胞で発現が高い72個のncRNAを標的とした  
 siRNAをトランスフェクションし、各GB2細胞でLGR5の発現量が顕著に  
 抑制されたものと増殖能が顕著に低減したものについてそれぞれの  
 標的ncRNAの数と重なりを表す。

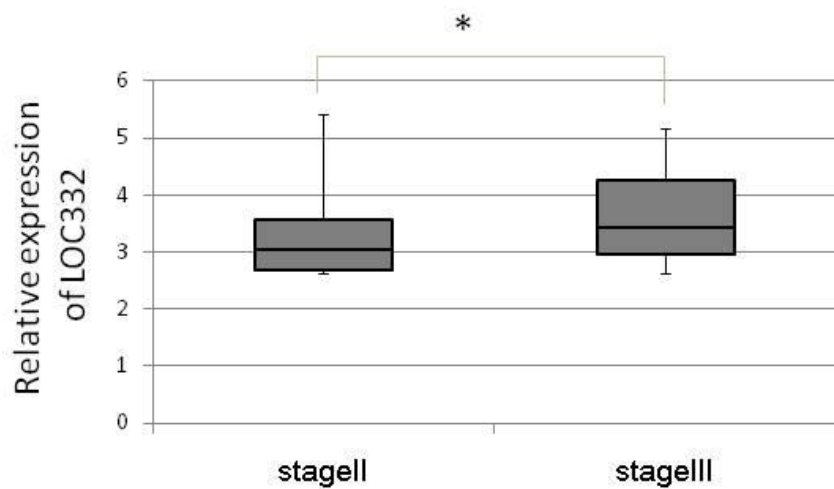


図2-2 悪性度の高い大腸癌でのLOC332の発現量の昂進  
 大腸癌のステージ2とステージ3のそれぞれの検体でのLOC332の発現  
 を箱髴図で示す。データはNational Center for Biotechnology  
 Informationで得られたマイクロアレイデータ: GSE37892から用いてい  
 る。スチューデント検定で\* $p < 0.01$



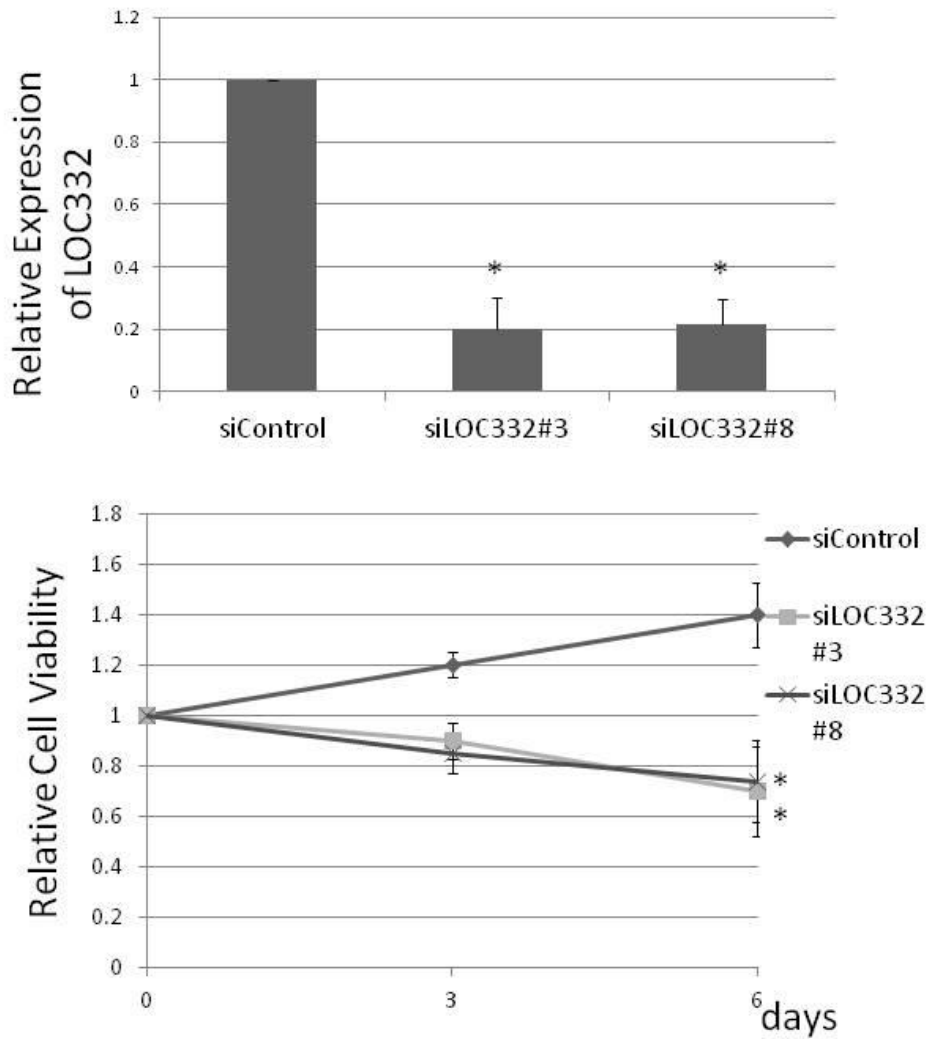


図2-3 LOC332ノックダウンによる大腸癌細胞の増殖抑制

(A) 大腸癌細胞株SW403に対してLOC332を標的としたsiRNAをトランスフェクションしLOC332の発現量の変化をreal-time PCRで測定した。(B) トランスフェクションから72時間後と144時間後にCell titer gloを用いて増殖能を測定した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.01$

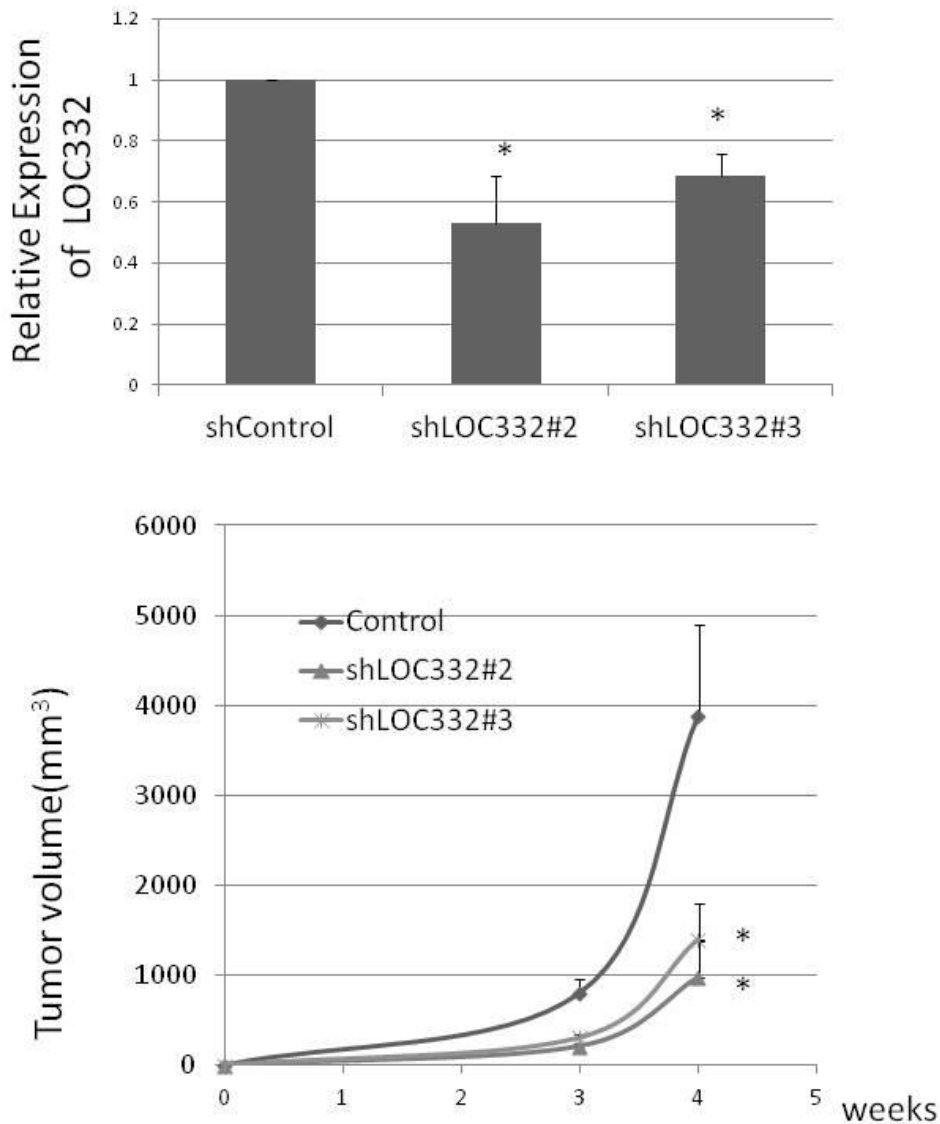


図2-4 LOC332ノックダウンによる大腸癌細胞の造腫瘍能の抑制  
 (A)大腸癌細胞株HCT116に対してLOC332を標的としたshRNAを発現するレンチウイルスを感染させ、LOC332の発現の変化をreal-time PCRを用いて測定した(n=3)。(B)感染から72時間後のHCT116細胞を免疫不全マウスに皮下移植し腫瘍の大きさを経時的に測定した(n=4)。エラーバーは標準偏差を示す。スチューデント検定で\* $p < 0.05$

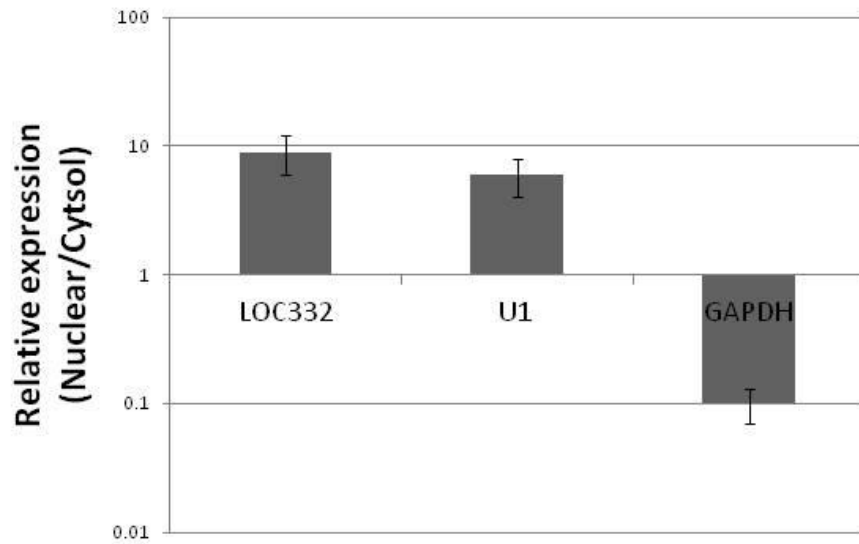
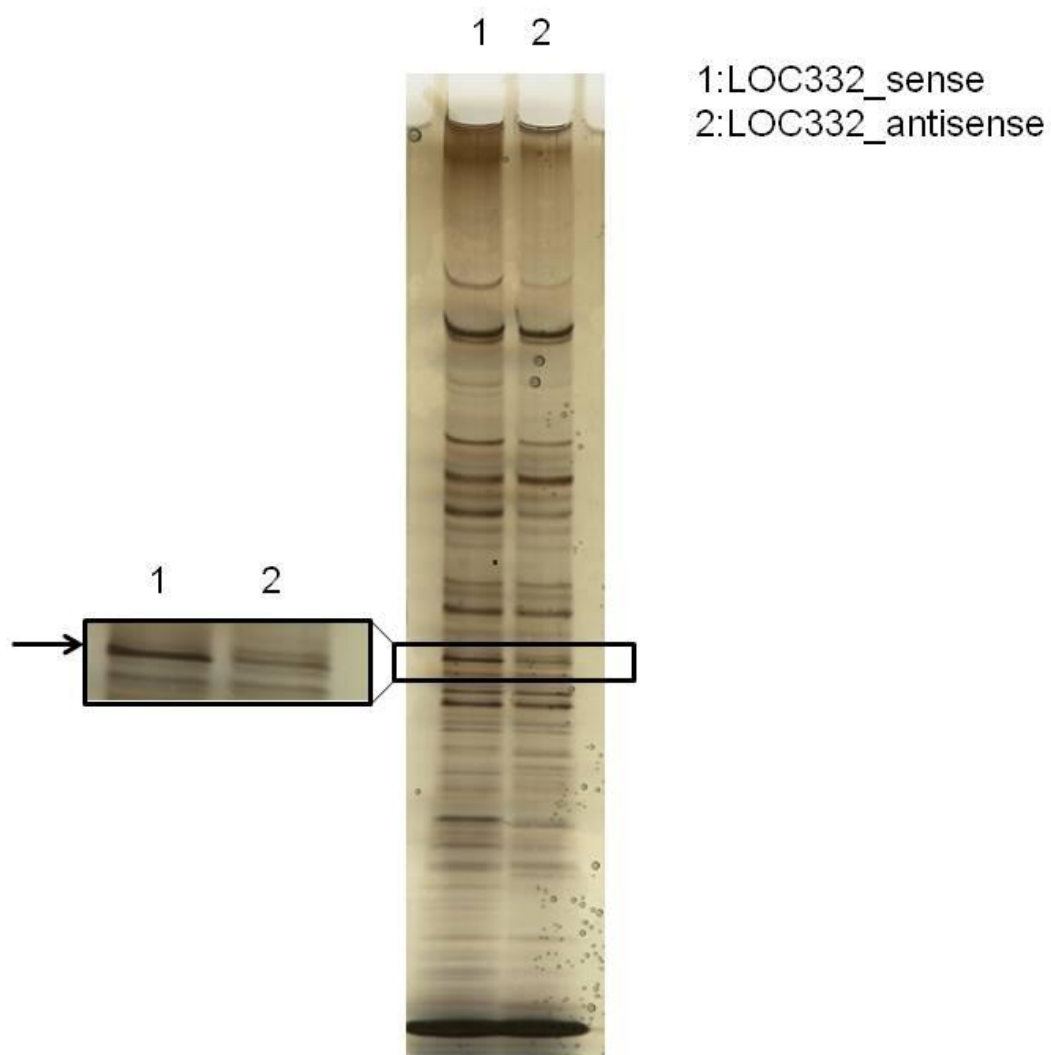


図2-5 LOC332の大腸癌細胞での局在  
 大腸癌細胞の細胞質画分と核画分からそれぞれRNAを抽出しLOC332の量をreal-time PCRを用いて解析した。核局在のコントロールにはU1を用い、細胞質局在にはGAPDHを使用した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。



#### 図2-6 LOC332の結合タンパク質の同定

LOC332に結合するタンパク質の抽出液をSDS-PAGEで電気泳動し、銀染色で検出した。

結合タンパク質の抽出液は合成RNAをベイトとしたRNA-pulldownアッセイで取得した。、LOC332\_senseはLOC332によるpulldownを示し、LOC332\_antisenseはネガティブコントロールとして用いたLOC332の逆配列のRNAによるpulldownを示す。黒い枠と矢印はMS解析に用いた特異的なバンドを示す。

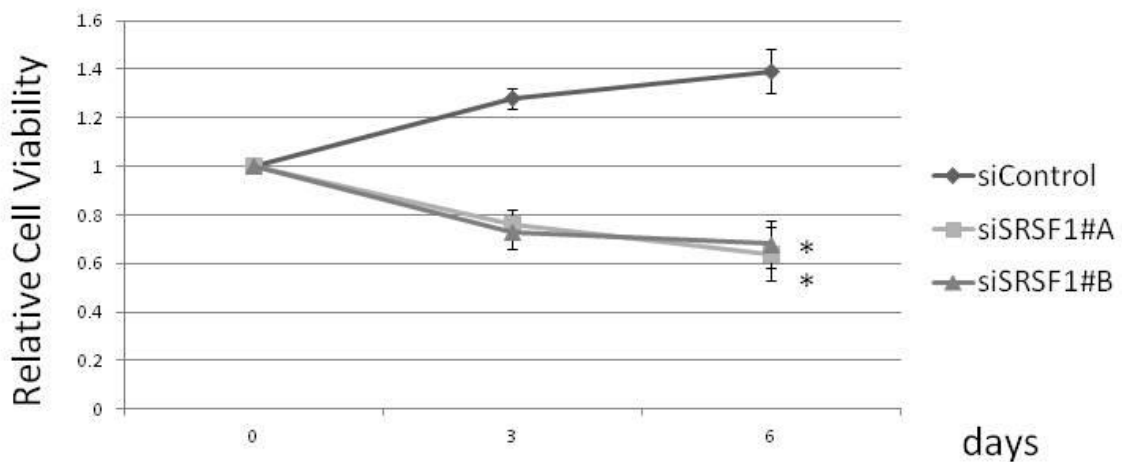
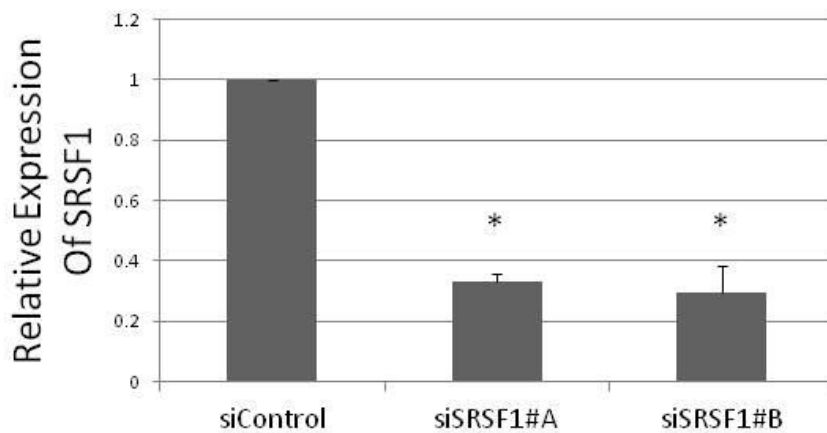
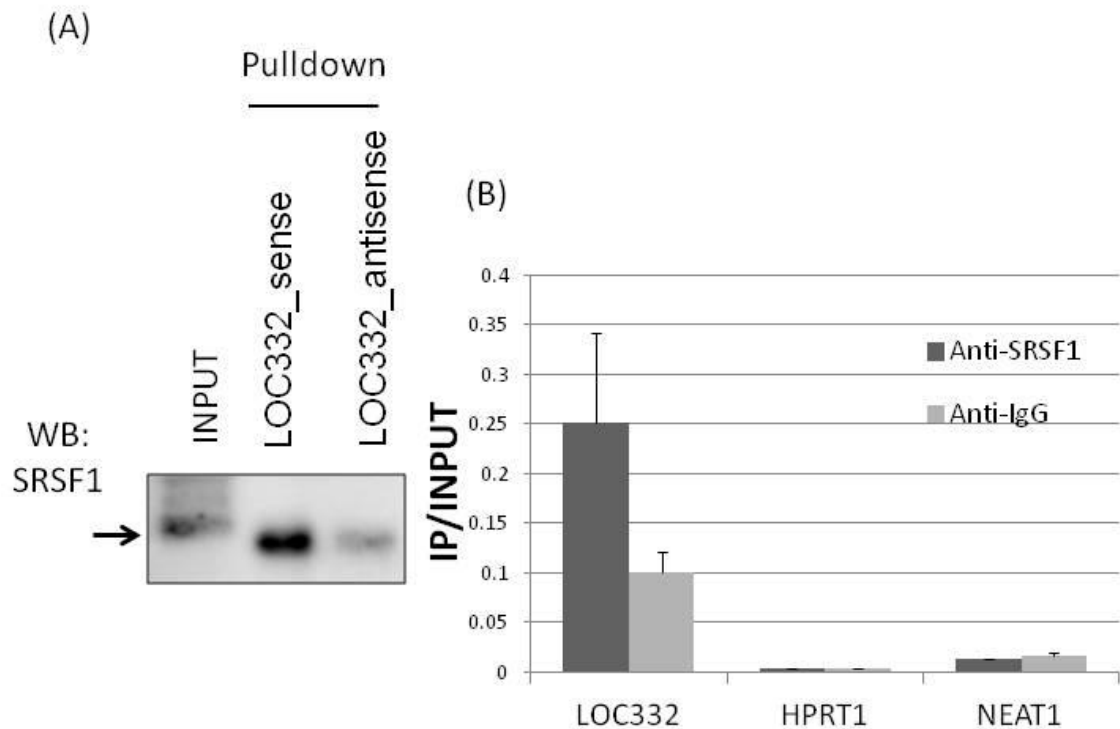


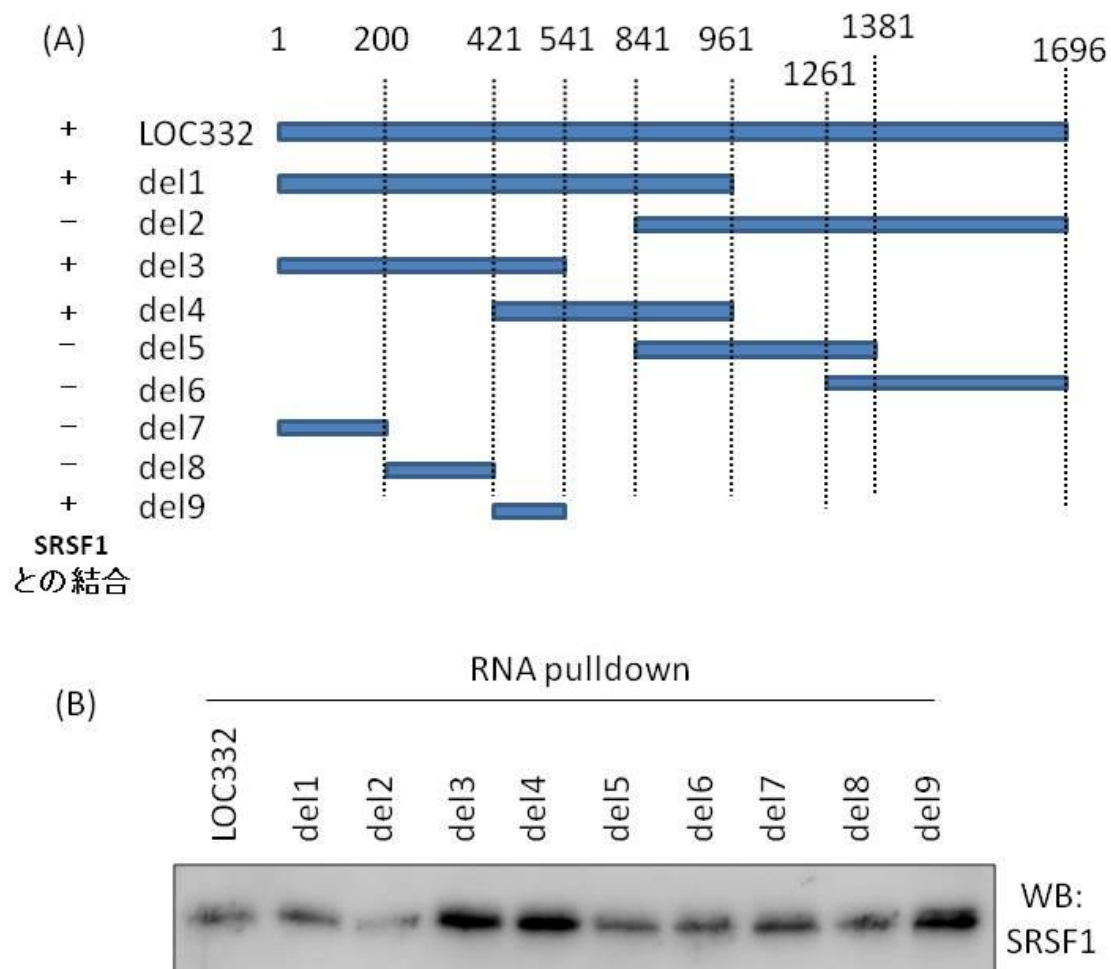
図2-7 SRSF1ノックダウンによる大腸癌細胞の増殖抑制

(A) SW403細胞に対してSRSF1を標的としたsiRNAをトランスフェクションしSRSF1の発現量の変化をreal-time PCRで測定した。(B)トランスフェクションから72時間後と144時間後にCell titer gloを用いて増殖能を測定した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.01$



### 図2-8 LOC332とSRSF1の結合

(A) RNA-pulldownアッセイで沈降させたSRSF1を抗SRSF1抗体で検出した。INPUTのレーンはRNA-pulldownアッセイで用いたSW403細胞の核分画を用い、LOC332\_senseとLOC332\_antisenseのレーンはそれぞれLOC332の正配列と逆配列のRNAを用いたRNA-pulldownアッセイで得たものを示す。矢印はSRSF1のバンドを示す。(B) 抗SRSF1抗体とコントロールIgGを用いSW403細胞に対してRIPアッセイを行った。SRSF1に結合するLOC332の量をreal-time PCRで測定した。ネガティブコントロールとして細胞質に存在するHPRT1と核に存在するNEAT1を使用した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。スチューデント検定で\* $p < 0.01$



### 図2-9 SRSF1と結合するLOC332の領域の特定

(A) 模式図はLOC332のデリーションミュータントを示す。SRSF1との結合の有無を左に示す。(B) SW403細胞の核分画を用い、LOC332の各デリーションミュータントによるRNA pulldownアッセイを行った。Pulldownで沈降させたSRSF1は抗SRSF1抗体で検出した。

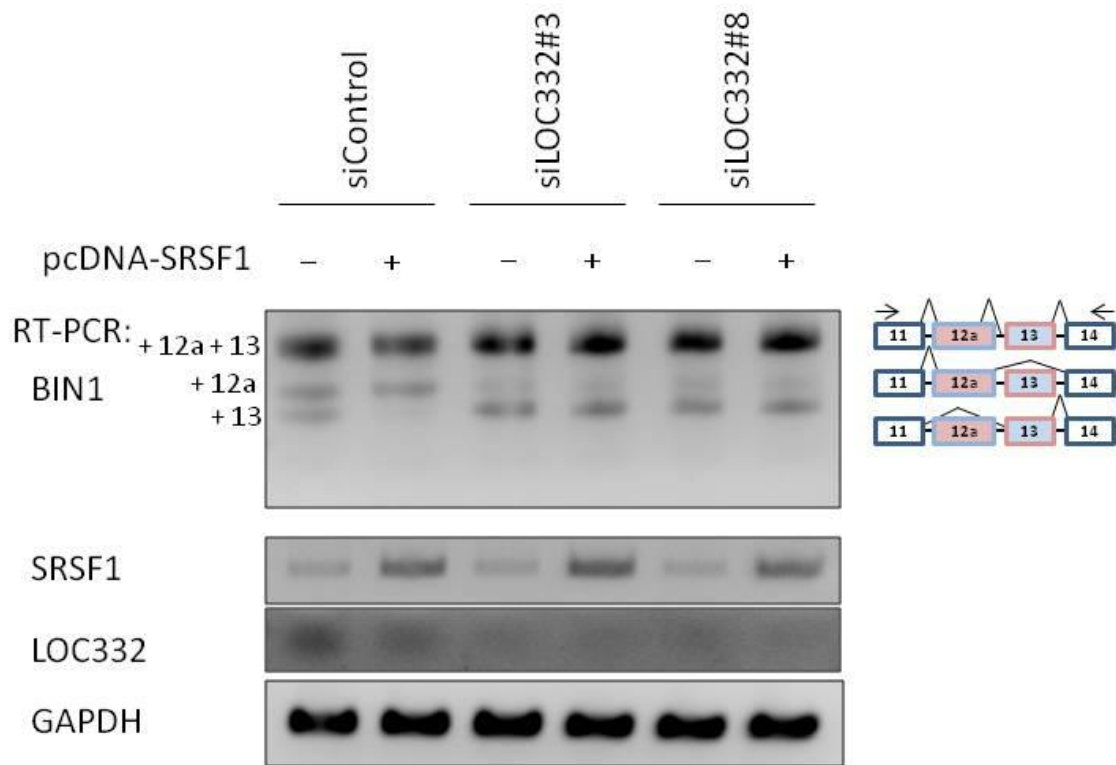


図2-10 LOC332ノックダウンによるSRSF1を介したBIN1の選択的スプライシングの抑制

HCT116細胞に対してLOC332を標的としたsiRNAをトランスフェクションし、24時間後にSRSF1強制発現ベクターを導入した際のBIN1のバリエーションの変化をRT-PCRで測定した。コントロールとしてGAPDHを用いた。模式図はBIN1のスプライシングパターンとRT-PCRに用いたプライマーの位置を示す(矢印)。



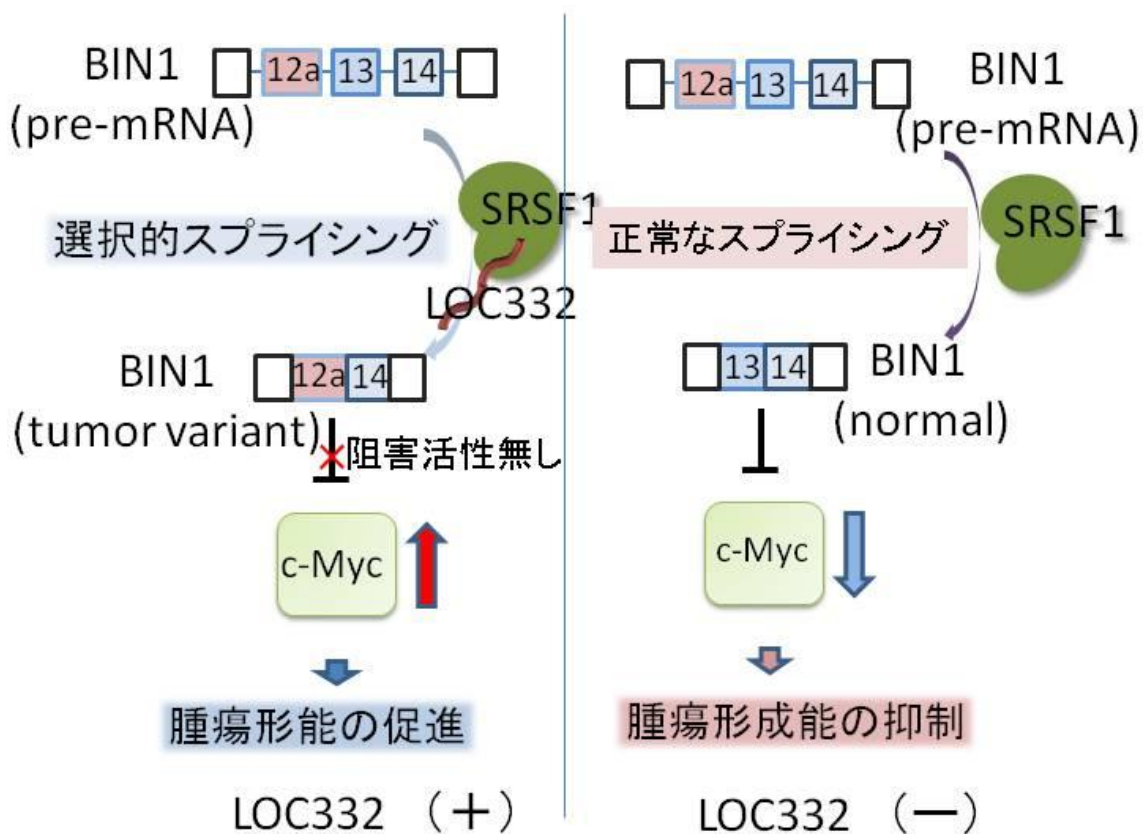


図2-11 LOC332はSRSF1による選別的スプライシングに寄与することで大腸癌細胞の腫瘍形成を促進する(モデル図)  
 LOC332はSRSF1に結合し、選別的スプライシングに必須な役割を担う。このスプライシングにより癌抑制遺伝子のBIN1はその活性を失い、大腸癌の腫瘍形成が促進される。

## 参考文献

- 1 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828 (2003).
- 2 Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14228-14233, doi:10.1073/pnas.0400067101 (2004).
- 3 Hsu, S. Y. *et al.* The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol* **14**, 1257-1271, doi:10.1210/mend.14.8.0510 (2000).
- 4 Van der Flier, L. G. *et al.* The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* **132**, 628-632, doi:10.1053/j.gastro.2006.08.039 (2007).
- 5 Hao, H. X. *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* **485**, 195-200, doi:10.1038/nature11019 (2012).
- 6 Jaks, V. *et al.* Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature genetics* **40**, 1291-1299, doi:10.1038/ng.239 (2008).
- 7 Nakata, S. *et al.* LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathol* **23**, 60-72, doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00618.x (2013).

- 8 McClanahan, T. *et al.* Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. *Cancer biology & therapy* **5**, 419-426 (2006).
- 9 Corbeil, D., Fargeas, C. A. & Huttner, W. B. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. *Biochemical and biophysical research communications* **285**, 939-944, doi:10.1006/bbrc.2001.5271 (2001).
- 10 Yin, A. H. *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-5012 (1997).
- 11 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111, doi:10.1038/35102167 (2001).
- 12 Meng, X., Li, M., Wang, X., Wang, Y. & Ma, D. Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer science* **100**, 1040-1046, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01144.x (2009).
- 13 Irollo, E. & Pirozzi, G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *American journal of translational research* **5**, 563-581 (2013).
- 14 Koyama-Nasu, R. *et al.* The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* **33**, 2236-2244, doi:10.1038/onc.2013.168 (2014).
- 15 Echizen, K. *et al.* PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochemical and biophysical research*

- communications* **444**, 13-18, doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.138 (2014).
- 16 Sekido, R. & Lovell-Badge, R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends in genetics : TIG* **25**, 19-29, doi:10.1016/j.tig.2008.10.008 (2009).
- 17 Wang, L. *et al.* Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Med Oncol* **29**, 3484-3490, doi:10.1007/s12032-012-0267-z (2012).
- 18 Carninci, P. *et al.* The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**, 1559-1563, doi:10.1126/science.1112014 (2005).
- 19 Ponting, C. P. & Belgard, T. G. Transcribed dark matter: meaning or myth? *Human molecular genetics* **19**, R162-168, doi:10.1093/hmg/ddq362 (2010).
- 20 Karni, R. *et al.* The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature structural & molecular biology* **14**, 185-193, doi:10.1038/nsmb1209 (2007).
- 21 Ge, K. *et al.* Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9689-9694 (1999).
- 22 Tsuji, S. *et al.* The miR-363-GATA6-Lgr5 pathway is critical for colorectal tumorigenesis. *Nature communications* **5**, 3150, doi:10.1038/ncomms4150 (2014).
- 23 Kamnasaran, D., Qian, B., Hawkins, C., Stanford, W. L. & Guha, A. GATA6 is an astrocytoma tumor suppressor gene identified by gene

- trapping of mouse glioma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8053-8058, doi:10.1073/pnas.0611669104 (2007).
- 24 Smits, M. *et al.* Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 2639-2647, doi:10.1096/fj.11-202820 (2012).
- 25 Zhang, B. *et al.* A dynamic H3K27ac signature identifies VEGFA-stimulated endothelial enhancers and requires EP300 activity. *Genome research* **23**, 917-927, doi:10.1101/gr.149674.112 (2013).
- 26 Naujokat, C. Targeting Human Cancer Stem Cells with Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* **01**, doi:10.4172/2155-9899.s5-007 (2012).
- 27 Yang, L. *et al.* lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature* **500**, 598-602, doi:10.1038/nature12451 (2013).
- 28 Beltran, M. *et al.* A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes & development* **22**, 756-769, doi:10.1101/gad.455708 (2008).
- 29 Tripathi, V. *et al.* The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell* **39**, 925-938,

- doi:10.1016/j.molcel.2010.08.011 (2010).
- 30 Montecucco, A. & Biamonti, G. Pre-mRNA processing factors meet the DNA damage response. *Frontiers in genetics* **4**, 102, doi:10.3389/fgene.2013.00102 (2013).
- 31 Cho, S. *et al.* Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8233-8238, doi:10.1073/pnas.1017700108 (2011).

## 謝辞

本研究にあたり、終始ご指導頂きました東京大学分子細胞生物学研究所分子情報研究分野 秋山徹教授、日々様々な面で支えて下さった秋山研の皆様には心より感謝いたします。特に、川崎善博先生、林寛敦先生には幅広く、また細部に至るまで懇切に指導していただきましたことを、深く御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたり、大腸癌検体の提供をしていただいた、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 北山丈二博士、日吉雅也博士、そしてグリオブラストーマ検体を提供いただいた、東京大学医学部脳神経外科 TR センター 藤堂 具紀 教授、稲生 靖 准教授に感謝いたします。

最後に、日々、研究生活を共にし、多くのアドバイスを頂くと共に、研究以外の面でも様々な支えていただいた、分子情報研究分野の皆様には心より感謝いたします。