

学位論文

大腸癌の腫瘍形成能に関わる
ノンコーディング RNA の探索及び機能解析
(Identification and characterization of
non-coding RNAs involved in the
tumorigenicity of tumor initiating 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

宮本 昌弥

概要

大腸癌は日本における主要な死因の一つである。早期の大腸癌に対しては手術による腫瘍の切除とアジュバント療法が有効であるが、転移や再発を起こした癌に対する治療薬は少ない。

近年のトランスクリプトーム解析によって、ゲノムの大部分が転写され、ロングノンコーディング RNA (lncRNA) を生み出すことが明らかとなった。lncRNA は癌を含む様々な病気で異所的な発現が起きていることが知られている。しかしながら、大腸癌発症における lncRNA が果たす役割はほとんど明らかにされていない。

本研究では、2 種類の探索法によって大腸癌の腫瘍形成能の維持に関わる lncRNA を同定した。RNA-seq を用いた網羅的遺伝子スクリーニングと RNAi スクリーニングによって大腸癌の腫瘍形成能に密接に関与する 2 つの新規 lncRNA、MYU と CASCA を見出した。MYU は c-Myc の直接の標的 lncRNA である。本研究では、MYU が機能未知タンパク質 Vps9d1 の内在性アンチセンス RNA であり、MYU が Vps9d1 の発現を制御することを示した。また、癌幹細胞において高発現する lncRNA、CASCA を見出した。本研究では MYU と CASCA の腫瘍形成能に関わる機能の一端を解き明かした。

Abstract

Colorectal cancer is one of the leading cause of death in Japan. Although surgicall resection combined with adjuvant therapies is effective at the early stage of colorectal cancer, there are few drugs for recurrent or metastatic cancer.

Recent transcriptome analysis have revealed that large part of genomic regions are transcribed into long non-coding RNAs (lncRNAs) . lncRNAs were found to be frequently dysregulated in various diseases, including cancer. But, littlee is known about the role of lncRNAs in colorectal cancer initiating cells.

Here we describe two approachs to identify lncRNAs that govern the maintenance of tumorigenic potential of colorectal cancer cells. By screening RNA-seq analysis and custom library of siRNAs targeting lnc RNAs, We identified novel lnc RNAs which we named MYU and CASCA that were required for tumorigenicity of colon cancer cells. We found MYU as the c-Myc direct target lnc RNA. MYU is natural antisense transcript of Vps9d1, which is the protein of unknown function. We showed MYU regulate the expression of Vps9d1. We also found CASCA that was highly expressed in colon cancer stem cells. This study unreveal oncogenic potential of the lncRNA MYU and CASCA and these functions in colorectal cancer cells.

目次	
概要	2
序論	5
材料と方法	11
結果	22
考察	38
結論	46
引用文献	48
図	65

序論

大腸癌

がんは日本人の死因の1番目であり、平成25年においては総死亡数の28.8%を占めるに至っており、今後も増加し続けると考えられている（厚生労働省「人口動態統計の概況」より）。中でも大腸癌は死亡率および罹患率が著しく増加している。死亡数は男性においては肺癌、胃癌について3番目、女性では1番であり、男女合わせて年間4万7千人が死亡している。これまでに多くの治療法、診断法が開発され大腸癌の治療成績は向上してきた。しかしながら2013年の死亡数は1950年の死亡数に対して12倍以上、2000年の死亡数と比較しても約1.3倍以上であり、増加に歯止めがかかっていないことがわかる。大腸癌の最も効果的な治療法は手術による腫瘍の摘出である。転移や浸潤を伴わないステージⅠにおいて5年生存率は90%以上と高いが、リンパ節へと転移がみられるステージⅢにおいては約60%、肝臓や肺等の臓器に遠隔転移を伴うステージⅣにおいては20%以下であり、悪性化した大腸癌に対する有効な治療法が確立されていないことが現状である。

大腸癌と Wnt/ β -catenin シグナル

Wnt/ β -catenin シグナルの古典的経路（図1）は、Wnt リガンドが細胞膜上の Frizzled 受容体に結合することで活性化される。Wnt シグナルの活性化は、伝達因子であり転写因子としても機能する β -catenin の安定化及び核移行を引き起こし、結果的に Wnt 標的遺伝子の発現を増加させる。Wnt リガンド非存在下において、 β -catenin は Adenomatous polyposis coli (APC)、glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)、Casein kinase1 (CK1)、Axin からなる β -catenin 分解複合体によりリン酸化を受けている。リン酸化された β -catenin はその後 β -TrCP に

より認識されユビキチン化を受け、プロテアソームにより分解される。一方で Wnt リガンド存在下においては、Frizzled 受容体はコレセプターである LRP と共に Wnt リガンドを受容し、LRP が活性化される。活性化した LRP は Dishveld (Dvl) ヘシグナルを伝え、Axin を膜に係留し、 β -catenin 分解複合体の形成を阻害する。このようにして、Wnt リガンド存在下においては分解複合体の機能が抑制された結果、 β -catenin は安定化する。安定化した β -catenin は核内へ移行し、T cell factor (TCF) /Lymphoid enhancer factor (LEF) と結合し、Axin2、c-Myc や CyclinD1 を含む Wnt ターゲット遺伝子の転写を活性化する。 β -catenin が核内に蓄積していない時には、TCF/LEF は Groucho と結合し、Wnt ターゲット遺伝子の転写を抑制している。(Behrens *et al.*,1996; Molenaar *et al.*,1996; Brunner *et al.*,1997; Ries *et al.*,1997; van de Wetering *et al.*, 1997; Tetsu *et al.*,1999; Jho *et al.*,2002)

大腸癌の発症において、Wnt/ β -catenin シグナルは重要な役割を担っている。(Clevers *et al.*,2006; Clevers *et al.*,2012) Wnt/ β -catenin シグナルの主要抑制因子である Adenomatous polyposis coli (APC) は家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis ; FAP) の原因遺伝子として同定された。(Cadigan *et al.*,1997; Bienz *et al.*,2000; Polakis *et al.*,2000; Fodde *et al.*, 2001) APC には散発性大腸癌において 70%以上という非常に高い確率で 変異が見られることが知られている (Kinzler *et al.*,1996) 。さらに APC に変異のない大腸癌においても、Wnt シグナル抑制遺伝子 Axin2 の変異や、 β -catenin の活性化型変異によって、核内への β -catenin の蓄積が起きている例が報告されている。(Liu *et al.*,2000; Lammi *et al.*,2004; Morin *et al.*,1997; Korinek *et al.*,1997) このように大腸癌の約 9 割において Wnt/ β -catenin シグナルの異常な亢進が起きており、大腸癌の発症において最も重要なシグナル経路であることは明白である。大腸癌以外においても、毛包腫瘍や肝臓癌等の癌や、二型糖尿病などの代謝病において Wnt/ β -catenin シグナルの伝達因子に変異が起き、シグナルの亢

進が起きていることが知られている。(Macdonald *et al.*,2009; Clevers *et al.*,2012)

c-Myc

Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子の中でも大腸癌の発症において重要な遺伝子の一つが癌原遺伝子 c-Myc である (He,T.c *et al.*,1998)。c-Myc 遺伝子はレトロウイルスから分離された v-myc のホモログとして発見された。(Sheiness *et al.*,1979; Vennstrom *et al.*,1982; Meyer *et al.*,2008) c-Myc は N-Myc、L-Myc と Myc ファミリーを構成する転写因子であり、増殖の促進、分化の抑制、細胞運動の促進など多岐にわたる生理現象に関わることが知られている。(Oster *et al.*,2002; Obaya *et al.*,1999; Langdon *et al.*,1986; Coppola *et al.*,1986; Chi *et al.*,2012)

c-Myc は N 末側に Myc box I -IV からなる転写制御ドメインを、C 末側に DNA 結合ドメインと helix-loop-helix-leucine zipper (HLH-Zip) ドメインを持つ。c-Myc は HLH-Zip ドメイン介して Max と 2 量体を形成することで転写を活性化することが知られている。(Amati *et al.*,1992; Amati *et al.*,1993; Blackwood *et al.*,1991; Grinberg *et al.*,2004; Kato *et al.*,1992; Kretzner *et al.*,1992) Max とヘテロ 2 量体を形成した c-Myc は、DNA 結合ドメインを介して Enhancer Box sequences : 5'-CACGTG-3' (E-Box) と呼ばれるコンセンサス配列に結合する。(Meyer *et al.*, 2008; Eilers *et al.*,2008; Fernandez *et al.*,2003; Patel *et al.*,2004) DNA に結合した c-Myc はさらに Myc box を介して Transcription factor 2H (TF II H) や Transcription domain-associated protein (TRRAP) といった転写制御因子と複合体を形成し、転写を正に制御する。(Fladvad *et al.*,2005; Liu *et al.*,2003; McEwan *et al.*,1996; McMahon *et al.*,2000; Nikiforov *et al.*,2002) これまでに c-Myc が転写を活性化する標的遺伝子としては、Cyclin-dependent kinase4 (CDK4) (Hermeking *et al.*,2000) 、

CyclinD2 (Bouchard *et al.*,2001) など細胞周期を正に制御する遺伝子が報告されている。一方、c-Myc が転写の抑制に働くことも知られている。Miz-1 と結合することで Cyclin dependent kinase (CDK) 抑制遺伝子である p15 や p21 の発現を抑制することが報告されている。(Seoane *et al.*,2001; Kleine-Kohlbrecher *et al.*,2006)

26 種類以上の癌腫において 3000 以上の検体を調べた結果、c-Myc は最も頻繁に増幅が起きている遺伝子であることが報告されている。(Beroukhi *et al.*,2010) 正常胎児線維芽細胞を用いた細胞レベルの研究により、c-Myc は細胞を形質転換する癌原遺伝子として知られるようになった。(Land *et al.*,1983) さらに遺伝子組み換えマウスを用いた個体レベルの研究においても、c-Myc の異所的な発現が癌化を引き起こすことが示されている。(Adams *et al.*,1985; Leder *et al.*,1986; Chesi *et al.*,2008) c-Myc は Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子であることが知られている(Brooks *et al.*,2010; Hurley *et al.*,2006; Levens *et al.*,2010)。大腸癌の発症モデルとして用いられている APC^{Min} マウスは癌抑制遺伝子 APC にヘテロに変異が入っており、加齢とともに腸管にポリープを形成する。この APC^{Min} マウスと c-Myc の腸管特異的なノックアウトマウスを掛け合わせると腸管におけるポリープの形成が抑制されることから、c-Myc は大腸癌の発症における Wnt/ β -catenin シグナルの重要な標的遺伝子であると考えられている (Ignatenko *et al.*,2006)。c-Myc は細胞周期、分化、細胞運動などに関わる多様な遺伝子を制御することが報告されているが、c-Myc の過剰発現が癌の発症を誘導する分子機構については不明な点が多く残されている。

c-Myc の標的コンセンサス配列である E box は promoter 領域において最も多く存在するモチーフの一つであり (Xie *et al.*,2005) 、c-Myc が活性化する標的遺伝子は細胞や組織ごとに多様に変化する。(Ji *et al.*,2011) これまでの研究はタンパク質をコードする遺伝子に着目して進められてきた。大腸癌細胞において c-Myc の標的となる long non-coding RNA ; lncRNA を探索することで、

c-Myc が細胞の癌化に寄与する分子機構について新たな知見が得られるのではないかと考えた。

長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA ; lncRNA)

ヒトゲノム研究によって、タンパク質をコードする 2 万以上の遺伝子の存在が明らかとなった。しかしながら、これらのタンパク質をコードする領域を合わせてもヒトゲノムのわずか 1.4%にしか満たない。(Szymanski *et al.*,2002) さらなる次世代シーケンス技術の発展と網羅的遺伝子解析によって、染色体のほぼ全ての領域から転写が起き、RNA が合成されていることが明らかとなった。(Birney *et al.*,2007) これらの RNA 産物の中にはタンパク質へと翻訳されることなく、自身が機能性 RNA として働くノンコーディング RNA が存在することが明らかとなってきた。(An,S *et al.*,2011) ノンコーディング RNA は micro RNA (miRNA) や PIWI-interacting RNA (piRNA) などの小分子 RNA (small RNA) と、200 塩基以上の長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) に分けられる。miRNA は Argonoute (AGO) を含む RISC 複合体と、piRNA は PIWI と結合して機能を発揮することが知られているように、多くのノンコーディング RNA は複合体を形成することで機能すると考えられている。small RNA と比べると、lncRNA に関して共通する複合体は存在せず、その結合相手は多岐にわたる。NEAT1 は NONO、SFPQ 等と結合してパラスペックルを形成する核となること (Sasaki *et al.*,2009; Sunwoo *et al.*,2009; Clemson *et al.*,2009; Chen *et al.*,2009) が知られている他、Xist や HOTAIR、Kcnq1ot1、Airn が Polycomb repressive complex 2 (PRC2) と結合し、それらを標的遺伝子座へリクルートすることで標的遺伝子群の転写の抑制を行うことが明らかとされてきた。(Zhao *et al.*,2008; Rinn *et al.*,2007; Pandey *et al.*,2008; Nagano *et al.*,2008) また、PTEN 遺伝子の偽遺伝子である PTENP1 は、PTEN の 3'UTR とよく似た配列を持ち、miRNA のデコイとして働くことで PTEN への miRNA

の結合を抑制し、PTEN の発現量増加を招くことが報告されている。(Poliseno *et al.*,2010) このように lncRNA はタンパク質の足場、ゲノム DNA へのガイド、miRNA のデコイなど、多様な結合相手と個別の機能を持ち、様々な生命現象に関わることが明らかとなってきた。これまでの研究はタンパク質をコードする遺伝子に焦点を当てて進められてきた。linRNA は細胞や組織、発生過程によって発現パターンが大きく異なるだけでなく (Mercer *et al.*,2009; Ponting *et al.*,2009)、癌などの病態と関連して発現が変動することが数多く報告されている。(Gibb *et al.*,2011; Yang *et al.*,2014; Spizz *et al.*, 2012; Huarte *et al.*,2011) 癌の腫瘍形成能において機能を持つ lncRNA を探索し、その分子機構を解明することは、癌の診断や治療の新たな標的を見出すことにつながると考えられる。

癌幹細胞

癌は多様な細胞から構成されており、一部の「癌幹細胞」が強い腫瘍形成能を持つことが明らかとなってきた。(Reya *et al.*,2001; Pardal *et al.*,2003) 癌幹細胞は急性骨髄性白血病において初めて報告され (Bonnet *et al.*,1997)、その後固形癌においても癌幹細胞の存在が示唆されてきた。(Al-Hajj *et al.*,2003) 癌幹細胞は自己複製能や多分化能、さらには高い薬剤排出能力や DNA 修復能といった正常組織幹細胞と共通した性質を持つことが報告されている。(Feuring-Buske *et al.*, 2001; Bao *et al.*,2006; Lessard & Sauvageau *et al.*,2003; Iwama *et al.*,2004; Reya *et al.*,2005) これにより従来の放射線や抗癌剤に抵抗性を持つために治療後も生き残り、組織や体液中に浸潤し、さらにその強い腫瘍形成能によって新たな癌細胞を生み出すことで、再発や転移の直接の原因となるのではないかと考えられている。(Reya *et al.*,2001; Parda *et al.*,2003) このため、癌幹細胞こそが癌根治療法の真の標的であると考えられている。

材料と方法

細胞培養

HT29 細胞及び DLD-1 細胞は 10%FBS を添加した RPMI1640 培地を用いて培養した。HCT116 細胞は 10%FBS を添加したマッコイ 5A 培地を用いた。HEK293 細胞及び 293FT 細胞は 10%FBS を添加した DMEM 培地を用いた。HeLa 細胞及び HT1080 細胞は 10%FBS を添加した MEM 培地を用いた。すべての細胞は、37°C、5%CO₂ 存在下において培養した。

無血清三次元培養

マトリゲルに懸濁し、シャーレの底に液滴状にして包埋した。37°C に 10 分間静置しマトリゲルを固まらせた後に培地を加え、37°C、5%CO₂ 存在下において培養した。無血清培地は DMEM/F12 (invitrogen) に B-27 supplement without Vitamin A (invitrogen) と N2 supplement (invitrogen) を加え、EGF (WAKO) を終濃度 20ng/ml で加えた培地を用いた。

大腸癌幹細胞の無血清浮遊培養

DMEM/F12 (invitrogen) に B-27 supplement without Vitamin A (Gibco) を加え、EGF (WAKO)(20 ng/ml) 、WNT3A (R&D)(20 ng/ml) 、R-Spondin1 (R&D) (500 ng/ml)、Noggin (PEPROTECH)(100 ng/ml) 、HGF (R&D)(20 ng/ml) を加えた培地で培養した。培地は用事調整し、3 日に一度交換した。

生細胞数の計測

細胞を PBS-EDTA で洗浄したのち、トリプシン処理を行った。生細胞の計測には Trypan Blue を用いた。2 x Trypan Blue staining solution (GIBCO) と混

合し、染色されない細胞を血球計算盤を用いて数えた。

細胞増殖の測定

三次元培養した細胞の増殖の測定は Cell-Titer Glo 3D (Promega) を用いて行った。培地を取り除いたのちに PBS で 2 倍希釈した Cell-Tite Glo 3D を添加し、室温で 20 分溶解した。検出は Plate reader Mithras LB 940 (BERTHOLD) を用いて行った。

トランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションは Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて行った。siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。

用いた siRNA は以下に示した。

si-Contol (AM4636 Ambion) 、 si-Control (GL2 コスモバイオ) 、 si-c-Myc#1 (s9129 Ambion) 、 si-c-Myc#2 (s9130 Ambion) 、 si- β -catenin#1 (s436 Ambion) 、 si- β -catenin#2 (s437 Ambion) 、 si-hnRNPL#1 (s6740 Ambion) 、 si-hnRNPL#2 (s6742 Ambion) 、 si-IL6ST#1 (s7317 Ambion) 、 si-IL6ST#2 (s7319 Ambion)

si-MYU#1:CCCTGCAAGCCATGGGTAATT (コスモバイオ)

si-MYU#2:CAAGAAGGCTGGTCACAGTTT (コスモバイオ)

si-CASCA#1: CCCTAGAGCACTACATAAATT (コスモバイオ)

si-CASCA#2: CAGGACATCTGAAGCTAAATT (コスモバイオ)

shRNA 発現レンチウイルスの作製と感染

ウイルスベクターには、CS-RfA-CG を用いた。shRNA 発現カセットを組み込んだ pENTR ベクター (Invitrogen) と LR 反応を行い、最終ベクターを作製

した。最終ベクター、pCMV-VSV-G-RSV-Rev 及び pCAG-HIVgp を 293FT 細胞に同時にトランスフェクションした。37°Cで 72 時間培養した後、培養上清を回収し、遠心 (15,000g、1.5 時間) によりウイルスを濃縮した。上清を除いたのちに PBS を加え、ウイルス液として用いた。全てのウイルス液は HT1080 細胞を用いてタイターチェックを行った。感染は、接着細胞に希釈したウイルス液を混合し、15 分おきに攪拌しながら 1 時間、吸着反応を行った。HT29 細胞及び HCT116 細胞への感染は MOI (multiplicity of infection) 100 で行った。CS-RfA-CG、pCMV-VSV-G-RSV-Rev 及び pCAG-HIVgp は理化学研究所バイオリソースセンターより分与していただいた。

shRNA の配列は以下に示した

shRNA-Luciferase:GATTTTCGAGTCGTCTTAATGT

shRNA-DsRec:GCCCCGTAATGCAGAAGAAGA

shRNA-MYU#1: GGACACCAGAGGAGTCTCTCT

shRNA-MYU#2: GGAGCTGGGTGCAGAGTCAAG

shRNA-c-Myc:GAACAGCTACGGAACTCTTGT

shRNA-β-catenin:GAGGGCATGCAGATCCCATCT

sh-CASCA#1: CCCTAGAGCACTACATAAAGC

sh-CASCA#2: CTCTGAAAGCTACAATCAAAG

RNA の抽出及び cDNA の作成

細胞からの total RNA の抽出・精製には TRIsure (BIOLINE) を用いた。5 x 10⁶細胞あたり 500 μl の TRIsure に懸濁し、プロトコルに従って精製を行った。回収した RNA は MilliQ に溶解し、-80°C で保存した。RNA 1 μg から Prime Script RT Master Mix (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。

qRT-PCR

合成した cDNA や ChIP により回収したゲノム領域を鋳型とし、Primer と 2 x Sybergreen master mix (Roche) を混合し、LightCycler480 (Roche) により PCR 反応と測定を行った。遺伝子の発現量は、GAPDH 及び b-Actin をコントロールとした $\Delta\Delta Ct$ 法によって求めた。

使用した primer 配列は以下に示した。

GAPDH Fw:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC

GAPDH Rev:TGGTGAAGACGCCAGTGGA

β -catenin Fw: GCTTTCAGTTGAGCTGACCA

β -catenin Rev: CAAGTCCAAGATCAGCAGTCTC

c-Myc Fw: CACCAGCAGCGACTCTGA

c-Myc Rev: GATCCAGACTCTGACCTTTTGC

Axin2 Fw: GCCAATGGCCAAGTGTCTC

Axin2 Rev: GGCTCTCCAACCTCCAGCTTC

MYU Fw: GTGTCTGGACACCAGAGGAGT

MYU Rev: GGGGCAGAGTCACAAAGC

Vps9d1 Fw: GGGAGGCATACACGGAATAC

Vps9d1 Rev: GCACAGTTTCCCCAGCTTC

LGR5 Fw: TCCAACCTCAGCGTCTTCAC

LGR5 Rev: CGCAAGACGTAACCTCCTCCA

CASCA Fw: GAGTGAAAGTCATCCGGGGC

CASCA Rev: AGCTTTCAGAGGGGATCCAT

hnRNPL Fw: GGAGGTGACCGAGGAGAACT

hnRNPL Rev: CGCTCACTTTTGCCTGAGA

IL6ST Fw:AGGACCAAAGATGCCTCAAC

IL6ST Rev:GAATGAAGATCGGGTGGATG

クロマチン免疫沈降 (ChIP)

培養した細胞の培地に 1/10 量の 10%ホルマリン溶液を加え、室温で 10 分間固定を行った。2.5M グリシンを加えて反応を終結させ、PBS で wash したのちに細胞を回収した。細胞を Lysis buffer (1%SDS、1%Triton X100、16.7 mM Tris-HCl pH 8.0) で溶解し、Handy sonic (TOMY) を用いて破碎した (Power5、30 秒 ON、45 秒 OFF、10 回)。得られた細胞抽出液を遠心し、上清を希釈 buffer (0.01%SDS、1%Triton X100、20 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA、150 mM NaCl) で 10 倍希釈した。抗体を加え、4°C で 2 時間反応させた。反応液に Protein G dynabeads を加え、4°C で 30 分間反応させた後、洗浄 buffer1-4 を用いて 4 回洗浄を行った。洗浄 buffer1 (0.1%SDS、1%Triton X100、20 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA、150 mM NaCl)、洗浄 buffer2 (0.1%SDS、1%Triton X100、20 mM Tris-HCl pH 8.0、2 mM EDTA、500 mM NaCl)、洗浄 buffer3 (1% Np-40、1% deoxycholate、10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA) 洗浄 buffer4 (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、250 mM LiCl)。その後、溶出 buffer (1%SDS、0.1 mM EDTA、10 mM DTT) で 3 回に分けて溶出した。サンプルを 65°C で O/N 処理し、脱架橋した。さらにサンプルに Proteinase K を加えて 45°C で 1 時間処理した後、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) を用いて DNA を回収した。サンプルは qRT-PCR によって測定した。

免疫沈降

細胞を Lysis buffer (1%Triton X100、10 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA) に溶解し、氷上で 20 分間静置したのちに 15,000 rpm、20 分遠心し上清を回収した。上清に抗体を加え、4°C で 1 時間攪拌した。Protein G dynabeads (Invitrogen) を加えて 4°C で 1 時間攪拌して抗体と beads を結合させた。Lysis buffer で 3 回洗浄したものを免疫沈降サンプルとして用いた。

IgG (CHEMICON) 、FLAG (M2 sigma aldrich) 、c-Myc (sc-764 SantaCruz) 、Grb2 (sc-255 SantaCruz) 、hnRNPL (ab6106 ambion)

ウェスタンブロット解析

細胞を Lysis buffer (0.1%SDS、0.5% deoxycholate、1%NP-40、20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、50 mM Naf、1 mM DTT) に溶解し、氷上で 20 分間静置したのちに 15,000rpm,20 分遠心し上清を回収し、タンパク質サンプルとした。サンプルに 6 x sample buffer を加えて 95°C で 5 分間ボイルした。サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し展開した後に、Immobilon Membrane (Millipore) にセミドライ法で転写した。5%スキムミルク中で振盪し、ブロッキングを行った。メンブレンを TBST で洗浄し、TBST に希釈した一時抗体を加え、4°C で反応させた。一時抗体反応を終えたメンブレンを TBST で洗浄し、TBS で希釈した二次抗体 (HRP-conjugate) を加え室温で 1 時間反応させた。検出は HRP substrate (Millipore) を用い、LAS4000 (Fujifilm) で行った。

Vps9d1 (ab121767 ambion 1:1000) 、 β -catenin (sc-1496 SantaCruz 1:1000) 、c-Myc (sc-764 SantaCruz 1:1000) 、Grb2 (sc-8034 SantaCruz 1:1000) 、EGFR (sc-03 SantaCruz 1:1000) 、hnRNPL (ab6106 ambion 1:1000) 、FLAG (M2 1:1000)

蛍光免疫染色

細胞をカバーガラス上で培養した。ブロッキング buffer (0.2%Triton X-100、1%BSA、3%FBS/TBS) で希釈した一次抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回 wash し、ブロッキング buffer で希釈した二次抗体を加えて室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回 wash し、VECTORSHIELD Mounting Medium を用いて封入し、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 510) を用いて観察、撮影した。

EEA1 (sc-33585 Santa Cruz 1:200) 、 LAMP1 (sc-5570 SantaCruz 1:200)

In vitro translation

TNT Coupled Reticulocyte Lysate System Kit (Promega) を用いて in vitro translation を行った。候補タンパク質をクローニングしたプラスミド 1 μ g、メチオニン 1 μ l、Master mix 40 μ l、dH₂O 8 μ l を混合し、30 °C で 90 分間反応させ、in vitro translation (IVT) タンパク質とした。

GST pull-down アッセイ

大腸菌 BL21 に発現コンストラクトをトランスフォーメーションし、培養したのちに IPTG を添加しタンパク質を合成させた。タンパク質の精製は氷上で行った。大腸菌を L-buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5、25% スクロース) に懸濁し、終濃度 0.05%、5 mM となるように NP-40 及び MgCl₂ を加えたのちに、sonication を行った。20,000 rpm、30 分遠心したのちに上清を回収した。WE-buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、2 mM MgCl₂、1 mM DTT) で wash した Glutathione Sepharose 4B (GE) を加え 4°C で 1 時間反応させた。WE-buffer+NaCl (20mM Tris-HCl pH 7.5、2mM MgCl₂、1mM DTT、1M NaCl) で 5 回 wash したのちに WE-buffer で 5 回 wash した。WE-buffer を加えて GST 融合タンパク質とした。EIA buffer 500 μ L、 In vitro translation タンパク質溶液 10 μ L、 GST 融合タンパク質 1 μ g、 Glutathione-Sepharose 4B 40 μ L を混ぜ合わせ、4 °C で 1 時間反応させた。EIA buffer で 3 回、PBS で 1 回洗浄したのちに 2×sample buffer をビーズと等量 (20 μ L) 加えボイルし、pull-down 産物とした。

GEF アッセイ

各低分子量 G タンパク質(Rab5/21/22/31)は 20 倍量の mant-GDP (M-12414

Invitrogen) と共に反応バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂、5 mM DTT、5% glycerol) 中で室温 20 分間反応させ、複合体を形成させた。その後 15 mM MgCl₂ を加えたのち、NAP-5 column (GE Healthcare) を用いてゲルろ過し複合体を形成していない mant-GDP を除いた。反応バッファーを用いて溶出し、mant-GDP 結合型 G タンパク質とした。GEF 活性は 200 mM mant-GDP 結合型 G タンパク質と 100 倍量の 20 μM GDP (蛍光ラベル無し) (SIGMA-ALDRICH) 、18 μM GEF (Vps9d1) を反応バッファー中で混合し、蛍光強度の変化を Mithras LB940 (BERTHOLD) を用いて 200 秒毎に 200 分間計測した。

in vitro transcription

MAXIscript T7 kit (Life Technologies) を用いて in vitro transcription を行った。DNA テンプレート 0.5 μg、transcription buffer 2 μl、ATP 1 μl、GTP 1 μl、UTP 1 μl、CTP 0.6 μl、Biotin-14-CTP (Life Technologies) 0.4 μl、Enzyme mix 2 μl を混合し、37°C で 1 時間反応させ biotin 化 RNA を合成した。DNase を加えて DNA を分解したのち、EDTA で DNase 反応を抑制したのち、合成した RNA を G-50 Sephadex Quick Spin cucom (Roche) を用いて精製した。

biotin RNA pull-down アッセイ

RIP Lysis buffer (0.5% NP-40、25 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM KCl、1 mM DTT) を用いて DLD1 細胞からタンパク質を抽出した。抽出タンパク質 400 μg と in vitro transcription により合成した biotin 化 RNA 200ng と混ぜ合わせ、4°C で 2 時間反応させた。streptoavidin dynabeads を加え、4°C で 30 分間反応させた。RIP Lysis buffer で 4 回 wash したのち、サンプルバッファー (ナカライテスク) を加えて 95°C で 5 分間ボイルし、pull-down 産物とした。MS 解析を行う際には SDS-PAGE によりタンパク質を展開したのち SilverQuest 銀染色

キット (Invitrogen) を用いて銀染色を行った。目的のバンドを切り出した後に SilverQuest 銀染色キットの脱銀試薬を用いて脱銀を行い、TrypsinGold (Promega) を用いてゲル内消化を行った後抽出し MS サンプルとした。

RIP アッセイ

細胞を RIP Lysis buffer で溶解した、氷上で 20 分間静置したのちに 15,000 rpm, 20 分遠心し上清を回収した。上清に抗体を加え、4°C で 1 時間攪拌した。Protein G dynabeads (Invitrogen) を加えて 4°C で 1 時間攪拌して抗体と beads を結合させた。RIP Lysis buffer で 3 回洗浄したものを免疫沈降サンプルとした。沈降産物から RNA を抽出し、qRT-PCR によって沈降産物中に含まれる RNA の量を定量した。

ヒト大腸癌検体

ヒト大腸癌検体及び周辺正常組織は informed consent によって合意を得た患者から東京大学医学部腫瘍外科が得たものを提供していただいた。

免疫不全マウスへの移植

トリパンプルを用いて生細胞数をカウントした後、移植する細胞数/50 μ l の濃度で PBS に懸濁したのち、マトリゲル (BD) 50 μ l と混ぜ合わせた後、1 匹あたり 100 μ l を免疫不全マウスの皮下に移植した。免疫不全マウスには、5 ~ 6 週齢の BALB/cA-nu/nu の雌を用いた。

腫瘍サイズの計測

腫瘍の大きさは免疫不全マウスへの移植後 3 週間後から週 1 回測定した。デジタルノギスで長径 (L) と短径 (S) を測定し、 $(L) \times (S) \times (S) \times \pi / 6$ により腫瘍体積の算出を行った。

FACS

マウスから Xenograft を摘出し、解剖鋏で細かく刻んだ。HBSS 培地で Wash した後 Accutase (life technologies) を加え 37°C でインキュベートした。1 時間ごとにピペッティングを行い、顕微鏡で観察しシングルセルが現れるまでインキュベートを続けた。HBSS 培地で 2 回 Wash した後に 100 μ m、70 μ m、40 μ m のセルストレイナーを通し、シングルセルを分離した。percoll (GE) と 10 x PBS を 9:1 の割合で混ぜ合わせ、100%percoll 溶液とした。さらに 100%percoll 溶液を PBS で希釈し 30%percoll 溶液を作成した。30%percoll 溶液の上に得られた細胞懸濁液を重層し、2000g で 5 分間遠心して沈殿を回収し生細胞の濃縮を行った。細胞を PBS で 2 回 Wash した後に MACS Buffer に 1×10^7 細胞/ml となるように懸濁した。FcR Blocking reagent (MACS) を 1/4 量加え、4°C で 15 分インキュベートした後、抗体を加え、4°C で 30 分反応させた。細胞を PBS で 3 回 Wash した後、 1×10^6 細胞/ml となるように懸濁しサンプルとした。PI 溶液を 1/500 量加えた後、FACS Moflo (BD) を用いて解析及び細胞の分取を行った。PI 染色によりの細胞の生死、EpCAM (ヒト上皮細胞マーカー) によりヒト上皮細胞の選別を行った。FACS に用いた抗体と希釈濃度は以下に示した。
CD326 (EpCAM) -FITC (MACS) (1:100) 、 CD133/1 (AC133) -APC (MACS) (1:100) 、 CD44-PE (BD) (1:200)

次世代シーケンサーによる RNA-seq

c-Myc に対する shRNA 発現ウイルスを HT29 細胞に感染させ、5 日後の細胞から Nucleo Spin RNA column (MACHEREY-NAGEL) を用いて RNA を回収した。Luciferase に対する shRNA をコントロールとして用いた。次世代シーケンサー解析は理研林崎グループとの共同研究により Solexa を用いて行った。CD44+/CD133+細胞と CD44-/CD133-細胞は FACS ソート後、Nucleo Spin

RNA column(MACHERY-NAGEL)を用いて RNA を回収した。次世代シーケンサーによる解析は東京大学白髭研究室との共同研究により行った。

CD44+/CD133+細胞と CD44-/CD133-細胞を比較し、CD44+/CD133+細胞において 3 倍以上発現が高い遺伝子を絞り込んだ。

マイクロアレイ解析

HCT116 細胞において siRNA を用いて CASCA をノックダウンし、48 時間後に RNA を回収した。マイクロアレイ解析は Affymetrix one-color microarrays(Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array(Affymetrix))を用いて行った。正規化とデータの解析には Gene Spring version 12.6.1(Agilent Technologies)を用いた。si-Control と比較し、si-CASCA#1、si-CASCA#2 のどちらにおいても Fold Change が 1.5 以上、あるいは-1.5 以下に変動している遺伝子を絞り込んだ。

結果

大腸癌細胞を用いた c-Myc 標的 lncRNA の探索

c-Myc もしくは Luciferase に対する shRNA を感染させ、遺伝子をノックダウンした HT29 細胞から RNA を精製した。RNA-seq による網羅的トランスクリプトーム解析を行い、Luciferase コントロールと c-Myc ノックダウン細胞において発現が変動している lncRNA の探索を行った。発現が 0.6 倍以下、あるいは 1.7 倍以上に変動している遺伝子を c-Myc 標的候補遺伝子として絞り込んだ。その結果、90 の lncRNA を c-Myc 標的候補因子として絞り込んだ。

絞り込んだ lncRNA が Wnt/ β -catenin シグナルの下流因子であるかどうかを調べるために、 β -catenin をノックダウンした細胞における候補因子の発現量の変化を検討した。HT29 細胞、DLD-1 細胞において siRNA を用いて β -catenin をノックダウンし、qRT-PCR によって発現を確認した。その結果 β -catenin のノックダウンにより発現が変動する 7 つの lncRNA を見出した。これらを Wnt/ β -catenin/c-Myc の標的 lncRNA と考えた。

さらに c-Myc により直接制御されている lncRNA を絞り込むために、c-Myc 抗体を用いた ChIP アッセイを行った。HT29 細胞の抽出液から c-Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、得られた沈降物に存在するゲノム領域を qRT-PCR によって検出した。各遺伝子のプロモーター領域においては c-Myc 結合配列 (E-box) を中心としてプライマーを作成した。E-box が存在しない遺伝子に関しては転写開始点の上流 600bp、1200bp、1800bp にプライマーを設計した。ChIP アッセイの結果、c-Myc 抗体によってプロモーター領域が沈降される 2 つの lncRNA を見出した。これら 2 つの lncRNA を c-Myc の直接の標的遺伝子であると考えた。さらにその中でも siRNA を用いて発現抑制した場合に大腸癌の増殖に影響を与えることが確認された LOC100128881/ (Myc-upregulated lncRNA/MYU)

について詳細に解析を進めた。

MYU のノックダウンは大腸癌細胞の増殖抑制を引き起こす

大腸癌細胞において *c-Myc* や *β-catenin* を発現抑制すると、細胞増殖が抑制されることが知られている。事実、大腸癌細胞株 LS180 において siRNA を用いて *c-Myc* または *β-catenin* をノックダウンすると、増殖が抑制される(図 2 左)。*c-Myc* の標的遺伝子として同定した MYU に関して、LS180 細胞において siRNA を用いて MYU をノックダウン際の細胞の増殖を測定すると、コントロールと比べて増殖が抑制されることが明らかとなった(図 2 右)。さらに、MYU を発現抑制した際に大腸癌細胞の腫瘍形成能に与える影響を免疫不全マウスへの皮下移植実験により検討した。HT29 細胞において Luciferase、*c-Myc*、*β-catenin*、MYU の各遺伝子に対する shRNA を用いて発現を恒常的に抑制し、免疫不全マウスへの皮下移植実験を行った。免疫不全マウス 1 匹に対して 1×10^3 細胞ずつ、1 遺伝子あたり 8 匹のマウスの皮下に大腸癌細胞を移植し、時間経過ごとに腫瘍のサイズを観察した。その結果、MYU をノックダウンすると *c-Myc* や *β-catenin* を発現抑制した時と同様に大腸癌細胞の腫瘍形成能が顕著に抑制されることが明らかとなった (図 3)。このことから、*c-Myc* の標的遺伝子として同定した MYU は大腸癌細胞の腫瘍形成能に強く関わっていることが示唆された。

MYU の in silico 解析

ヒトゲノム解析及び近年の大規模トランスクリプトーム解析によって、ゲノム DNA 上において +strand 及び -strand の両方の鎖が転写されている領域は 6000 箇所以上も存在することが明らかとなった。このような領域からはセンス RNA-アンチセンス RNA のペアが転写される。このような内在性アンチセンス RNA の機能の一つとして、センス RNA の発現を制御することが報告されている (Wahlestedt *et al.*, 2013; Modarresi *et al.*, 2012)。MYU の遺伝子が存在す

るゲノム領域の反対鎖には、機能未知のタンパク質をコードする Vps9d1 遺伝子が存在している(図 4)。そこで、MYU が内在性アンチセンス RNA として機能し、センス RNA の Vps9d1 の発現を制御する可能性があると考えられた。

MYU は Vps9d1 の発現を抑制する

MYU が Vps9d の発現量に与える影響を検証した。HT29 細胞及び DLD-1 細胞において siRNA を用いて MYU をノックダウンし、それぞれの細胞において Vps9d1 の発現量に与える影響を qRT-PCR を用いて解析した。その結果、MYU をノックダウンすると Vps9d1 の発現量が上昇することが明らかとなった(図 5 左)。一方で、Vps9d1 をノックダウンしても MYU の発現量には影響を与えなかった。さらに MYU が Vps9d1 のタンパク質量に与える影響の検討を行った。HT29 細胞及び DLD-1 細胞において siRNA を用いて MYU をノックダウンし、Vps9d1 の発現量をウェスタンブロットによって解析した。その結果 MYU の発現抑制により Vps9d1 のタンパク質量が増加することが明らかとなった(図 5 右)。これらの結果から、MYU が内在性アンチセンス RNA として機能し、Vps9d1 の発現を抑制する機構が考えられた。さらに、MYU は Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルの標的遺伝子であることから、Wnt/ β -catenin シグナルが Vps9d1 の発現量に与える影響を検討した。HT29 細胞及び DLD-1 細胞において siRNA を用いて c-Myc、 β -catenin をノックダウンし、Vps9d1 の発現量に与える影響を qRT-PCR 及びウェスタンブロットを用いて解析した。その結果、c-Myc や β -catenin をノックダウンした際にも Vps9d1 は発現上昇することが明らかとなった(図 6)。以上の結果より、Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルが MYU の発現上昇を介して、Vps9d1 の発現を制御する機構が示唆された。

MYU が Vps9d1 に与える影響をより詳細に解析するため、MYU の強制発現実験を行った。MYU は Vps9d1 と相補する 5 つの領域 (OL1A、OL1B、OL2、OL3A、OL3B) を持つ。MYU 及び Vps9d1 のオーバーラップ領域を欠損した

変異体を作成した (図 7)。HEK293 細胞において、作成した MYU の変異体を強制発現し、内在性 Vps9d1 mRNA の発現量に与える影響を qRT-PCR を用いて検討した。その結果、MYU の全長 (MYU-full) を強制発現すると Vps9d1 の mRNA 量が減少することが明らかとなった (図 8)。また、MYU の全長を強制発現した細胞と比較してオーバーラップ領域を減らした変異体 (MYU-OL1、MYU-OL2-3、MYU-OL3、MYU- Δ OL1-2) を強制発現した際には Vps9d1 の減少の割合が抑えられることが明らかとなった。また、オーバーラップ領域を全て欠損させた変異体 (MYU- Δ OL1-3) を強制発現した場合は Vps9d1 の mRNA 量は減少しなかった。これらの結果から MYU が Vps9d1 とのオーバーラップ領域を介して Vps9d1 の mRNA 量を制御していることが示唆された。

MYU 及び Vps9d1 の大腸癌検体における発現解析

9 割以上の大腸癌において Wnt/ β -catenin シグナルの異常な亢進が起きていることが知られている。Wnt/ β -catenin/c-Myc 経路の標的遺伝子として同定した MYU と、さらに MYU が発現を制御している Vps9d1 について、大腸癌検体における発現量の解析を行った。大腸癌検体の正常組織部分、腫瘍組織部分から回収した RNA を用いて qRT-PCR 解析を行った。腫瘍組織部分では正常組織部分と比較して、Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子である c-Myc や Axin2 が発現上昇していると同時に、MYU が高発現していた (図 9)。また、MYU が発現を抑制していると考えられる Vps9d1 は正常組織部分において発現が高く、腫瘍組織部分では発現が低下していた。さらに大腸癌組織における各遺伝子の発現を標準化したのち、UPGMA 法を用いてクラスタリングを行った (図 10)。その結果、Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子である c-Myc や Axin2 と MYU は発現パターンが近く、Vps9d1 は c-Myc、Axin2、MYU とは発現パターンが遠いことが明らかとなった。

Vps9d1 の強制発現は大腸癌細胞の増殖を抑制する

Vps9d1 が大腸癌の増殖に与える影響を調べるため、HT29 細胞においてレンチウイルスにより Vps9d1 を強制発現し、増殖に与える影響を調べた。その結果、LacZ 遺伝子を強制発現したコントロールと比較し、Vps9d1 を強制発現すると大腸癌の増殖が抑制されることが明らかとなった(図 11)。

Vps9d1 のドメイン構造解析

Vps9d1 は N 末端側に Microtubule interacting and trafficking domain (MIT domain) 、C 末端側に VPS9 ドメインを有する 631 アミノ酸のタンパク質である (図 12) 。VPS9 ドメインは酵母において小胞輸送に関わるタンパク質である Vacuolar protein sorting-associated protein9 (Vps9p) において見出されたドメインである。酵母において Vps9p の機能を阻害すると液胞へのタンパク輸送が正常に行われなくなる。(Burd *et al.*,1996) Vps9p は、酵母における Rab5 のホモログである Vps21p に対する guanine-nucleotide exchange factor (GEF) 活性を持つことが知られている。(Hama *et al.*,1999) VPS9 ドメインを持つタンパク質はヒトにおいて 10 種類以上が存在しており、Rab タンパク質の中でも Rab5 サブファミリーの中に属する Rab5、Rab21、Rab22、Rab31 に対して GEF 活性を持つと考えられている。これまでに Rab5 サブファミリーに対する GEF 活性を持つ遺伝子として、Rabex-5 (Horiuchi *et al.*,1997) 、Rin1 (Tall *et al.*,2001) 、Rin2 (Saito *et al.*,2002) 、Rin3 (Kajiho *et al.*,2003) 、RME-6/Gapex-5 (Sato *et al.*,2005) 、Alsin (Otomo *et al.*,2003) 、ALS2CL (Hadano *et al.*,2004) 、RINL (Kajiho *et al.*,2012) が報告されている。Rabex-5 が Rab5、Rab21 (Delprato *et al.*,2004) 、Rab22 に対して GEF として作用する一方で、Rin3 は Rab31 特異的な GEF として作用する (Kajiho *et al.*,2011) など、それぞれのタンパク質によって Rab タンパク質の選択性を持つことが示唆されている。

Rab ファミリータンパク質

Rab タンパク質は Ras スーパーファミリーに属する GTP 結合タンパク質であり、膜輸送における重要な制御因子として知られている。Rab タンパク質は Guanosine triphosphate (GTP) に結合した活性化型と、Guanosine diphosphate (GDP) と結合した不活性化型の二つの状態が存在し、分子スイッチとして働くことが知られている。(Pereira-Leal *et al.*,2001; Zerial *et al.*,2001; Harald *et al.*,2009) Rab タンパク質の活性化と不活性化は、Rab guanine-nucleotide exchange factor ; Rab-GEF) と、Rab GTPase activating orotein ; Rab-GAP) によって制御されている。(Ryan *et al.*,2009; Francis *et al.*,2010; Mitsunori *et al.*,2011) GEF は GDP と結合した Rab タンパク質から GDP を取り除き、GTP と置き換えることにより Rab タンパク質を活性化する。また、GAP は Rab に備わる GTPase 活性を更新し、GTP を GDP へと加水分解させることにより Rab タンパク質を不活性化する。

Rab タンパク質は C 末端領域に脂質化修飾を受けており、オルガネラや小胞の膜上に局在することが可能である。GDP と結合した不活性化型の Rab タンパク質は Rab GDP-dissociation inhibitor (Rab-GDI) と結合し、脂質化修飾部分をコートされて細胞質に係留される。一方で GTP と結合した活性化型は脂質化修飾を介して膜上に局在し、さらに構造変化によってエフェクタータンパク質と結合する。Rab タンパク質ごとに異なるエフェクタータンパク質と結合することにより、様々な機能を発揮することが可能となる。(Preffer *et al.*, 2005)

ヒトにおいては 66 種類の Rab タンパク質が存在し、それぞれが特異的なオルガネラに局在して膜輸送を制御している (Klopper *et al.*,2012) 。Rab5 は細胞膜及び早期エンドソームに局在し、エンドサイトーシスと、取り込んだ物質の輸送を制御することが知られている (Somsel *et al.*,2000) 。

Vps9d1 は Rab5 選択的 GEF として機能する

Vps9d1 は VPS9 ドメインを持つことから、Vps9d1 が Rab タンパク質の GEF として機能する可能性があると考えた。VPS9 ドメインを持つタンパク質は Rab5、Rab21、Rab22、Rab31 に対する GEF として働くことが知られている。まず、Vps9d1 がこれらの Rab ファミリーと結合するかどうかを、GST pull-down アッセイによって検証した。GST タグを融合させた Rab5、Rab21、Rab22、Rab31 を大腸菌に発現させ、アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製した GST 融合タンパク質と、in vitro translation により合成した Vps9d1 タンパク質を用いて pull-down アッセイを行った結果、Vps9d1 は Rab5 と選択的に結合することが示された (図 13)。さらに Vps9d1 が Rab5 の GEF として働くかどうかを in vitro GEF アッセイによって検証した。Mant 蛍光色素を融合させた GDP (Mant-GDP) は、タンパク質と結合することで蛍光強度が増大する。Mant-GDP を Rab5、Rab21、Rab22、Rab31 に結合させたのちに Vps9d1 とインキュベーションし、Mant-GDP の解離を蛍光強度の減衰によって計測した。すでに Rab5GEF として報告されている Rin1 をポジティブコントロールとして用いた。その結果 Vps9d1 は Rab5 の GEF として機能することが示された (図 14)。

Vps9d1 はアダプタータンパク質 Grb2 と結合する

Vps9d1 の機能をより詳細に調べるために、結合タンパク質の探索を行った。HEK293 細胞に FLAG タグを融合させた Vps9d1 を強制発現し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。SDS-PAGE によって展開したのち、銀染色によってバンドを確認した。FLAG-Vps9d1 を強制発現した細胞においてのみ確認されるバンドを切り出し、MS 解析を行った。その結果、Vps9d1 結合候補タンパク質として Grb2 を見出すことに成功した (図 15)。

Vps9d1 と Grb2 の結合を GST pull-down アッセイによって確認した。Grb2

は N 末側と C 末側に 1 つずつ、計 2 つの SH3 ドメインと、1 つの SH3 ドメインを持つアダプタータンパク質である。GST タグを融合した Grb2 を大腸菌に発現させ、精製した。また、Grb2 との結合部位を検討するため、2 つの SH3 ドメイン (Grb2-SH3-N、Grb2-SH3-C) 及び SH2 ドメイン (Grb2-SH2) のみを GST タグと融合させたタンパク質も作成した。精製した GST タンパク質を、in vitro translation によって合成した Vps9d1 と混ぜ合わせ、pull-down を行った。その結果、Vps9d1 が Grb2 と結合すること、またその結合は二つの SH3 ドメインを介することが示された (図 16 上)。

Vps9d1 と Grb2 が細胞内においても相互作用するかどうかを検証するため、共免疫沈降実験を行った。HEK293 細胞に FLAG タグを融合させた Vps9d1 を強制発現したのち、FLAG 抗体、Grb2 抗体によって免疫沈降し、ウェスタンブロットにより検出した。その結果、細胞内においても Vps9d1 と Grb2 は相互作用することが示された (図 16 下)。

Grb2 はアダプタータンパク質であり、EGF シグナル伝達において重要な役割を果たすだけでなく、EGFR のエンドサイトーシスによる取り込みにおいても機能することが知られている。EGF と結合した EGFR は 2 量体を形成し、自己リン酸化を行う。Grb2 はリン酸化された EGFR と SH2 ドメインを介して結合し、同時に SH3 ドメインを介して Son of sevenless (Sos) と結合することで細胞内にシグナルを伝えるアダプタータンパク質として働く。活性化された Sos は GTP 結合タンパク質 Ras の GEF として機能し、Ras を活性化する。活性化された Ras は MAP キナーゼカスケード、PI3K シグナルを活性化させ、細胞内にシグナルが伝えられる。このように、リガンドと結合した EGFR は細胞内へ EGF シグナルを伝達し、細胞の増殖を正に制御する。EGFR は細胞内へシグナルを伝えた後に、活性を抑えるためにエンドサイトーシスによって取り込まれ、早期エンドソームへ輸送される。この早期エンドソームへの取り込みには G タンパク質 Rab5 が関与する (Gorvel *et al.*,1991; Parton *et al.*,1992; Barbieri *et*

al.,2004))。Rab5-GEF を抑制すると EGFR のエンドサイトーシスが減弱することや、Rab5 の向上活性化型変異体を強制発現することで EGF による刺激がなくても EGFR がエンドサイトーシスされることが明らかになっている (Balaji2012 *et al.*; Dinnen *et al.*,2004)。アダプタータンパク質 Grb2 は細胞膜からのエンドサイトーシスに必須の機能を担っており、Grb2 を欠損すると EGFR の取り込みが正常に行われなくなる (Testuo *et al.*,2002)。Grb2 はリン酸化し活性化した EGFR に SH2 ドメインを介して結合し、さらに SH3 ドメインを介して E3 ユビキチンリガーゼ Cbl と複合体を形成する。EGFR と Grb2 を介して複合体を形成した Cbl は EGFR をユビキチン化する。Cbl による EGFR のユビキチン化はリサイクリングと分解のスイッチとなる。ユビキチン化された EGFR は ESCRT-0 (endosomal sorting complex required for transport) の HRS が持つユビキチン結合モチーフによって認識される。ESCRT-0 の結合は連続的に ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III の会合を引き起こす。ESCRT-III が結合した EGFR はやがて小胞内小胞 (intraluminal vesicle : ILV) にとりこまれ、細胞質と物理的に隔離されることで EGF シグナルが抑えられる。ESCRT の会合に伴って早期エンドソームは多胞体 (multi vesicular body : MVB) へ成熟し、リソソームと融合することで内部のタンパク質が分解される (図 17)。

Vps9d1 は早期エンドソームに局在する

Vps9d1 の細胞内における局在を免疫染色によって観察した。FLAG タグを融合させた Vps9d1 を HeLa 細胞において強制発現し、FLAG 抗体を用いて染色した。Vps9d1 は後期エンドソーム及びリソソームのマーカータンパク質である LAMP1 よりも、早期エンドソームマーカータンパク質である EEA1 と強い共局在を示した (図 18)。この結果から、Vps9d1 は早期エンドソームに局在すると考えられた。

Vps9d1 はエンドサイトーシスされた EGF と共局在する

Vps9d1 が EGF 刺激に伴う EGFR の取り込みへ与える影響を検討した。FLAG タグを融合した Vps9d1 (FLAG-Vps9d1) を強制発現した HEK293 細胞を EGF によって刺激し (100 ng/ml) 、その後の時間経過に伴う EGFR と Vps9d1 の結合の変化を調べるために、EGFR の免疫沈降により共沈する Vps9d1 をウェスタンブロットによって解析した。EGF 刺激の後に EGFR はエンドサイトーシスされ、やがてリソソームに運ばれ分解される。実際に EGF 刺激を行った 60 分後から 180 分後にかけて EGFR が減少することが観察された (図 19) 。また、EGFR がエンドサイトーシスを受けリソソームへと輸送されると考えられる 30 分後から 120 分後にかけて EGFR に結合する Vps9d1 が増えていることが確認された (図 19) 。この結果から、Vps9d1 は EGF 刺激に伴い EGFR と結合することが示唆された。

EGF 刺激した細胞における Vps9d1 と EGF の共局在を確認した。FLAG-Vps9d1 を強制発現した HEK293 細胞を、Alexa488 蛍光タンパク質を融合した EGF (Alexa488-EGF) で刺激し、30 分後に細胞を固定して FLAG 抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果 FLAG-Vps9d1 が強く局在するエンドソームにおいて、Alexa488-EGF が共局在していることが確認された (図 20) 。

大腸癌幹細胞の分離

FACS を用いた表面抗原マーカーに基づく分画によって、癌組織中にわずかに含まれる癌幹細胞を多く含む細胞集団を取得することができる。大腸癌幹細胞においては、細胞表面抗原 CD133 を用いて単離した細胞集団が大腸癌幹細胞を多く含むことが報告されている。(O'Brien *et al.*,2007; Ricci-Vittani *et al.*,2007) 予後診断法や治療法の開発を目的とし、さらなる表面抗原マーカーの

探索も行われている。しかしながら、多くのマーカータンパク質は正常組織幹細胞においても発現しており、癌幹細胞特異的なマーカーの発見にはいたっていない。これまでに大腸癌幹細胞の単離法として、EphB2high (Jung *et al.*,2011) 、EpCAMhigh/CD44+/CD166+ (Dalerba *et al.*,2007) 、ALDH+ (Huang *et al.*,2009) 、LGR5+ (Kemper *et al.*,2012) 、CD44v6+ (Todaro *et al.*,2014) 等が報告されている。DCLK1 が正常組織幹細胞には発現せず、癌幹細胞特異的なマーカーであること (Nakanishi *et al.*,2013) が報告されたが、膜タンパク質ではないため、単離法に応用することは困難である。

当研究室においても実験材料とするための大腸癌幹細胞の分離を試みた。本研究では大腸癌検体由来異種移植片を大腸癌幹細胞の分離の材料として用いた。ヒト大腸癌組織を免疫不全マウスの皮下に移植することで、異種移植片を形成する。異種移植片には検体由来の癌幹細胞が含まれ、形成された異種移植片を摘出し、細胞を新たな免疫不全マウスに移植することで継代することができると考えられている。事実、移植により形成された異種移植片は由来する大腸癌検体と同様に極性を持ち腺管構造を形成した。摘出した異種移植片から細胞を回収し、CD44 抗体及び CD133 抗体を用いて細胞を染色した。CD44/CD133 二重陽性細胞 (CD44+/CD133+細胞) 及び CD44/CD133 二重陰性細胞 (CD44-/CD133-細胞) を FACS ソーターによって精製した (図 21) 。回収した CD44+/CD133+細胞及び CD44-/CD133-細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を検証したところ、CD44+/CD133+細胞は CD44-/CD133-細胞に比べて顕著に強い腫瘍形成能を示した。さらに CD44+/CD133+細胞を移植して形成された異種移植片から細胞を回収し FACS 解析したところ、CD44+/CD133+細胞だけでなく、細胞ソートする前と同様の割合で CD44 陰性細胞や CD133 陰性細胞を含んでいた。このことから、CD44+/CD133+細胞は多分化能を持つと考えられた。CD44+/CD133+細胞及び CD44-/CD133-細胞から RNA を回収し、RT-PCR 解析によって幹細胞マーカー遺伝子の発現量を比較した。その結果、

CD44+/CD133+細胞は CD44-/CD133-細胞と比較して、c-Myc や CyclinD1 等の大腸癌の増殖に重要な働きをする遺伝子の発現量には変化がないが、LGR5 等の幹細胞マーカー遺伝子を高発現していることが明らかとなった。さらに CD44+/CD133+ 細胞及び CD44-/CD1133- 細胞を無血清培養したところ、CD44+/CD133+細胞のみが自己複製能の指標となる細胞塊を形成した。これらの結果から CD44+/CD133+細胞は高い腫瘍形成能、多分化能、自己複製能を持ち、癌幹細胞を多く含む細胞集団であると考えた。

大腸癌幹細胞の腫瘍形成能に関わる lncRNA の探索

CD44+/CD133+細胞及び CD44-/CD133-細胞から RNA を回収し、次世代シーケンサーによる網羅的トランスクリプトーム解析を行った。大腸癌幹細胞で高発現する因子を探索するため、CD44+/CD133+ 細胞において CD44-/CD133-細胞よりも 3 倍以上発現が高い 63 の lncRNA を絞り込んだ。これらの大腸癌幹細胞において高発現する lncRNA の中から大腸癌細胞の造腫瘍性に関わる因子を探索することを目的とした siRNA スクリーニングを行った。CD44+/CD133+細胞において siRNA を用いて候補 lncRNA63 遺伝子をノックダウンした際に細胞の増殖に与える影響、及び幹細胞マーカー LGR5 の発現量を検討した。CD44+/CD133+細胞の長期間培養及びウイルス感染効率が低かったことから、大腸癌細胞株における表現型もスクリーニングの指標として用いた。大腸癌細胞株 (DLD-1 細胞、HT29 細胞、HCT116 細胞) においても siRNA を用いて候補 lncRNA63 遺伝子をノックダウンし、細胞増殖に与える影響を検討した。この siRNA スクリーニングを通して大腸癌幹細胞の幹細胞性に影響を与えると考えられる遺伝子や、大腸癌細胞の増殖に影響を与えると考えられる遺伝子を絞り込んだ。加えて、qRT-PCR 解析において発現が確認できない因子、及び siRNA によるノックダウン効率と得られる表現系の程度が一致しない lncRNA は除外した。絞り込んだ候補 lncRNA に対する shRNA を作成し、恒常

的にノックダウンした HCT116 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍形成能に与える影響を検討した。その結果大腸癌細胞の腫瘍形成能に関わる 4 つの lncRNA を同定することに成功した。さらに LOC100505865 (Colon cancer stem cell associated / CASCA) について着目し機能解析を目指した。

CASCA のノックダウンは大腸癌細胞の造腫瘍能を抑制する

大腸癌幹細胞において高発現する lncRNA の中から絞り込んだ CASCA が大腸癌細胞の造腫瘍能に与える影響について検討した。HCT116 細胞において shRNA を用いて CASCA を恒常的にノックダウンすると、免疫不全マウスの皮下に移植した際の腫瘍形成能が抑制された (図 22)。さらに CASCA が大腸癌細胞の増殖に与える影響を詳細に検討した。HCT116 細胞において siRNA を用いて CASCA をノックダウンすると、平面培養においては増殖に大きく変化が認められなかった (図 23 左)。CASCA は大腸癌幹細胞においてノックダウンすると LGR5 が低下することから、大腸癌の幹細胞性に関わる可能性があると考えた。一般的に無血清培地を用いた三次元培養において、大腸癌細胞の幹細胞が濃縮されることが知られている (Kirkland *et al.*,2008; Wakimoto *et al.*,2009; Zhong *et al.*,2010)。HCT116 細胞においても、無血清培地を用いた三次元培養において幹細胞マーカーの発現や造腫瘍能が高まることが報告されている (Wei *et al.*,2012) そこで、HCT116 細胞において siRNA を用いて CASCA をノックダウンし、マトリゲル中に包埋し無血清培地を用いて三次元培養を行った。その結果 CASCA をノックダウンすると三次元培養下において増殖が強く抑制されることが明らかとなった (図 23 右)。大腸癌検体において CASCA の発現量を qRT-PCR によって解析した。その結果、大腸癌患者由来の検体において正常部分に比べて腫瘍部分で有意に発現が高いことが明らかとなった (図 24)。以上の結果から、CASCA が大腸癌の腫瘍形成能に関わる lncRNA であることが示唆された。

CASCA の結合タンパク質の探索

CASCA はインタージェニックノンコーディング RNA であり、近傍に遺伝子は存在していない。lncRNA の多くはタンパク質と複合体を形成し、その機能を発揮する。そこで CASCA の腫瘍形成能に関わる機能を解析するにあたり、CASCA の結合タンパク質の同定を目指し、ビオチン化 RNA pull-down アッセイを行った。in vitro transcription によってビオチン化した CASCA を合成し、HCT116 細胞の溶解液と混合した後に、ストレプトアビジンビーズを用いて pull-down を行った。pull-down したサンプルを SDS-PAGE によって展開し、銀染色によって確認した (図 25 左)。コントロールには CASCA のアンチセンス鎖を用いた。CASCA のセンス鎖でのみ pull-down されるバンドを切り出したのちに in gel digestion を行い、MS 解析を行った。その結果、結合候補タンパク質として heterogenous nuclear ribboneoprotein L (hnRNPL) を見出した。

CASCA は hnRNPL と結合する

CASCA と hnRNPL の結合の確認を行った。CASCA のビオチン化 RNA を用いて pull-down したサンプルを SDS-PAGE により展開し、hnRNPL 抗体を用いて検出した。その結果、CASCA のセンス鎖を用いて pull-down を行った時にのみ hnRNPL が検出された (図 25 右)。このことから、CASCA が hnRNPL と結合することが示唆された。さらに、hnRNPL の RIP アッセイを行った。HCT116 細胞の抽出液において hnRNPL 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降産物から RNA を回収し、qRT-PCR 解析によって沈降物中に含まれる目的 RNA の量を検出し、input に対する割合で表した。ネガティブコントロールとして用いた GAPDH と比較して、CASCA は沈降物中で濃縮されていた (図 26)。これらの結果から、CASCA は hnRNPL と細胞内においても複合体を形成していると考えた。

hnRNPL のノックダウンは三次元培養下における大腸癌細胞の増殖を抑制する

hnRNPL が細胞の大腸癌細胞の増殖に与える影響を確認するため、HCT116 細胞において siRNA を用いて hnRNPL をノックダウンし、平面培養、三次元培養における増殖に与える影響を検討した。その結果、hnRNPL をノックダウンすると CASCA をノックダウンした時と同様、平面培養においては増殖に大きな変化が見られないのに対し、無血清三次元培養下における増殖が抑制された (図 27)。hnRNPL は RNA 結合モチーフ RRM を 3 つ持つ RNA 結合タンパク質である。hnRNPL は多機能タンパク質であり、転写の調節や mRNA の安定性の制御に関わることが報告されている (Hui *et al.*,2003; Hui *et al.*,2003)。また、CA リピートに結合しオルタナティブスプライシングの制御に関わることが報告されている (Hui *et al.*,2005; Hamilton *et al.*,2008)。hnRNPL のノックダウンによって CASCA の発現量は変動しなかった。このことから、CASCA が hnRNPL と結合し無血清三次元培養下における増殖に関わる遺伝子を制御する機構が考えられた。

マイクロアレイ解析を用いた CASCA の下流探索

CASCA の腫瘍形成能に関わる機能を解析するため、マイクロアレイ解析による下流遺伝子探索を行った。HCT116 細胞において siRNA を用いて CASCA のノックダウンを行い、48 時間後に回収した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。Luciferase に対する siRNA をコントロールとし、CASCA に対する siRNA 2 種類を用いてどちらにおいても発現が 1.5 倍以上、あるいは 3 分の 2 以下に減少する遺伝子を下流因子として絞り込んだ (図 28)。マイクロアレイの結果を確認するため、HCT116 細胞において siRNA を用いて CASCA のノックダウンを行い、マイクロアレイによって絞り込んだ遺伝子の発現量の変動を qRT-PCR によって解析した。さらに、CASCA の結合タンパク質として同定し

た hnRNPL が発現量に与える影響を検討した。hnRNPL をノックダウンした HCT116 細胞において qRT-PCR 解析によって遺伝子の発現量の変動を検討した。その結果 CASCA もしくは hnRNPL のどちらをノックダウンしても発現が抑制される遺伝子として、interleukin 6 signal transducer (IL6ST) /gp130 を含む 3 つの遺伝子を見出した (図 29)。

IL6ST のノックダウンは三次元培養下における大腸癌細胞の増殖を抑制する

CASCA 及び hnRNPL の下流遺伝子として絞り込んだ遺伝子が、大腸癌細胞の増殖に影響を与えるかどうか検討するために、HCT116 細胞において siRNA を用いたノックダウン実験を行った。その結果、ノックダウンした際に HCT116 細胞の三次元培養下における増殖を抑制する遺伝子として IL6ST を絞り込んだ。HCT116 細胞において siRNA を用いて IL6ST をノックダウンすると、平面培養時には増殖に影響を与えないが、三次元培養下においてのみ増殖が抑制されることが明らかとなった (図 30)。

考察

Wnt/ β -catenin シグナル標的 lncRNA の探索

本研究においては次世代シーケンサーを用いた網羅的解析と c-Myc の ChIP 解析により、Wnt/ β -catenin シグナルの標的であり、c-Myc の直接の標的である lncRNA、MYU を同定した。Wnt/ β -catenin シグナルの異常亢進は大腸癌発症の第一歩となる。本研究において Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルの標的として同定した MYU のノックダウンは大腸癌の細胞増殖、及び免疫不全マウスに移植した際の腫瘍形成能を強く抑制することが明らかとなった。MYU は大腸癌検体において発現が上昇していた。これらのことから Wnt/ β -catenin /c-Myc 経路の標的遺伝子 MYU が大腸癌の発症において重要な役割を担う可能性が示された。ノンコーディング RNA MYU を中心とした腫瘍形成能に関わるメカニズムの解明は、大腸癌治療標的を得るための重要な手がかりとなりうると思われる。

Axin2、c-Myc、MYU 及び Vps9d1 の 4 つの遺伝子のクラスタリング解析から、Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子である Axin2 や c-Myc と MYU の発現パターンが近いこと、さらに Axin2、c-Myc 及び MYU と Vps9d1 の発現パターンが異なることも明らかとなった。データベース上の解析によって、c-Myc が発現亢進している乳癌、肺癌、メラノーマにおいても正常組織と比較して腫瘍部分で MYU の発現が高いことが示されている。MYU 及び Vps9d1 が、大腸癌以外の Wnt/ β -catenin シグナルが亢進している癌や疾患や、c-Myc が発現上昇している癌や疾患においても、診断や治療の標的となる可能性が考えられる。本研究において大腸癌細胞を用いて検証した Wnt/ β -catenin/c-Myc/MYU シグナル経路が他の細胞種、組織においても共通する機構であるかどうか確認し、検証しなければならない。

MYU が Vps9d1 発現制御を行う分子機構

MYU は Vps9d1 とセンス-アンチセンスの関係にある。MYU のノックダウンは Vps9d1 の発現上昇を引き起こすことを明らかにした。これまでにアンチセンス RNA がセンス RNA の発現を制御する機構を大別すると 3 種類に分けることができる。すなわち転写の開始の制御 (Tufarelli *et al.*,2003; Pontier *et al.*,2011; Yap *et al.*,2010; Yu *et al.*,2008; Moderresi *et al.*,2012)、転写伸長の制御 (Hongay *et al.*,2006; Gelfand *et al.*,2011; Beltran *et al.*,2008)、転写後調節 (Faghihi *et al.*,2008; Faghihi *et al.*,2010; Su *et al.*,2012) の 3 種類である。本研究においては MYU が Vps9d1 とのオーバーラップ領域を介してその発現制御を行う可能性を示した。さらに HEK293 細胞において MYU 及び PP7 タグを融合させた Vps9d1 を強制発現し、PP7 タグによる pull-down 実験の結果、MYU と Vps9d1 mRNA が結合していることを示唆するデータを得ている。しかしながら、MYU のノックダウンにより Vps9d1 の mRNA の安定性に変化は見られなかった。これまでに、Vps9d1 の発現制御メカニズムを完全に解明するには至っていない。転写開始の調節、転写伸長の調節、翻訳制御も含めて今後さらなる詳細な解析が必要である。

Vps9d1 の機能解析

Vps9d1 は Vps9 ドメインを持ち、新規 Rab5-GEF として機能することを明らかにした。さらに Vps9d1 がアダプタータンパク質 Grb2 と結合し、EGFR の取り込みに関わる可能性を示唆した。EGF シグナリングは大腸癌においても必須の増殖シグナリングであり、EGFR のエンドサイトーシスによる取り込みは EGF シグナリングの調節機構として重要な役割を果たすことが知られている。本研究により Vps9d1 は Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子 MYU によって発現抑制されており、大腸癌検体においても発現が低下していることが明らか

となった。MYU が Vps9d1 の発現抑制を介して大腸癌の腫瘍形成能を高める分子機構が存在する可能性が示唆された (図 31)。これまでに、Vps9d1 をノックダウンすることで細胞膜表面に存在する EGFR の量が増加することを示唆するデータを得ている。Vps9d1 は EGFR のエンドサイトーシスを活性化し、細胞膜上に存在する EGFR の量を減らすことで、EGF リガンドへの応答性を弱めている可能性が考えられる。大腸癌においては、MYU の発現上昇は Vps9d1 の発現を抑制し、その結果として細胞膜上の EGFR 量が増えることで、EGF リガンドへの応答性を高め、EGF シグナルを亢進させている可能性が考えられる。Vps9d1 の EGF シグナリングへの関与と大腸癌の腫瘍形成能に与える影響について、さらなる詳細な解析を行っていく。

Grb2 は EGFR 以外にも多くの受容体チロシンキナーゼと結合することが知られている。また、Vps9d1 の結合因子の探索においては、Grb2 以外にエンドソームの成熟に関わる ESCRT の構成因子、USP9X や IST1 を同定している。Vps9d1 が EGFR 以外の膜タンパク質に関しても、エンドサイトーシスの制御を行う可能性や、早期エンドソームだけでなくエンドソームの成熟過程においても機能する可能性も考えられる。

MYU 及び Vps9d1 の Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルにおける重要性

MYU を shRNA を用いてノックダウンした際の腫瘍形成能の抑制効果は非常に強く、 β -catenin や c-Myc をノックダウンした際と同じ程度の腫瘍形成能の低下が見られている。しかしながら、Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルの標的遺伝子は非常に多く、MYU の機能のみで腫瘍形成能の全てを説明することは難しいと考えられる。MYU の Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルにおける役割を明らかにするために、今後は β -catenin や c-Myc をノックダウンした細胞において MYU を過剰発現するレスキュー実験を行い、MYU の Wnt/ β -catenin/c-Myc シグナルにおける重要度を評価していく必要があると考えられる。

MYU をノックダウンした際の大腸癌細胞株の増殖抑制効果と比較し、Vps9d1 を強制発現した際の大腸癌細胞の増殖抑制効果は小さいことがわかる。Vps9d1 に関しても、 β -catenin や c-Myc、MYU をノックダウンした細胞において同時に Vps9d1 をノックダウンするレスキュー実験によって、Wnt/ β -catenin/c-Myc/MYU シグナル経路における重要度を確認しなければならない。MYU のノックダウンにおける増殖抑制を Vps9d1 のノックダウンにより完全にレスキューできない場合には、Vps9d1 以外の MYU 下流因子の探索や、MYU 結合タンパク質の探索を通してさらなる機能解析を行う必要があると考えられる。

大腸癌幹細胞の腫瘍形成能に関わる lncRNA の探索

大腸癌検体由来異種移植片から単離した大腸癌幹細胞に対する網羅的遺伝子解析と RNAi スクリーニングによって、大腸癌の腫瘍形成能に関わる lncRNA を同定することに成功した。本研究では特に CASCA に着目し、培養大腸癌細胞株を用いた大腸癌の腫瘍形成能に関わる機能について解析を行った。CASCA をノックダウンすると平面培養における増殖は大きく変化しないが、無血清培地を用いた三次元培養下における増殖が抑制された。一般的に無血清培地を用いた三次元培養下における増殖は幹細胞性の指標と考えられている。CASCA が大腸癌の幹細胞性の維持に寄与している可能性が考えられる。今後大腸癌幹細胞を用いた実験を行い、CASCA の大腸癌幹細胞における機能を詳細に解析したい。

大腸癌幹細胞における CASCA の機能

大腸癌検体を用いた qRT-PCR 解析から、CASCA は腫瘍組織部分において発現が高いことを明らかにした。優位に発現が上昇していたが、その差は大きなものではなかった。CASCA は大腸癌幹細胞において発現が高いと考えられる。

大腸癌検体においても、Fluorescence in situ hybridization (FISH)や、FACSソートを用いた実験によって癌幹細胞における発現を確認する必要がある。また、本研究においてはいくつかの報告をもとに大腸癌幹細胞の長期培養を行ったが、2~3週間以上の長期にわたる培養が成功しなかったために、大腸癌幹細胞における CASCA の機能に関して実験を行うことができなかった。腸管上皮幹細胞の培養法の発展とともに、ヒト大腸癌幹細胞の培養法についてもいくつかの報告がなされている (Barker *et al.*,2010; Sato *et al.*,2011)。今後もこれらの論文を参考にして大腸癌幹細胞の培養を行い、実験系を確立することは重要な課題である。

CASCA 及び hnRNPL が IL6ST の発現を制御するメカニズム

HCT116 細胞を Actinomycin D によって処理し、転写を抑制することで IL6ST mRNA の安定性を検討すると、CASCA、または hnRNPL をノックダウンすることにより IL6ST mRNA の安定性が低下するという結果を得ている。しかしながら、CASCA をノックダウンした際と比較し、hnRNPL をノックダウンした際の IL6ST mRNA の安定性の低下は小さいことも明らかとなった。hnRNPL と高い相同性を持つパラログである hnRNPLL が存在することから、これらのタンパク質が IL6ST mRNA の安定性の制御に関して冗長性を持ち、お互いに補完し合っている可能性が考えられる。hnRNPLL のノックダウンや、hnRNPL と hnRNPLL のダブルノックダウンによって IL6ST mRNA の安定性を確認することによって検証する必要がある。

IL6ST mRNA は 6kb に及ぶ長い 3'UTR を持ち、miRNA-142-3p による発現制御を受けていることが報告されている (Sharma *et al.*,2012; Sonda *et al.*,2013)。CASCA は分子内に miRNA-142-3p の認識配列を持つことから、CASCA が miRNA のデコイとして機能する可能性が考えられる。hnRNPL はイントロン内の CA リピートに結合しオルタナティブスプライシングや、3'UTR

内の CA リピートに結合し mRNA の安定性に関わることが報告されている。IL6ST はイントロン内には CA リピートを持たないが、3'UTR 内に CA リピートを 2 つ持っている。また、CASCA も CA リピートを持つ。これらの CA リピートを欠失させたり変異を入れたミュータントを作成し、IL6ST mRNA の安定性に関与するかどうか、また hnRNPL との結合に関わるかどうかを検証する必要がある。また、hnRNPL は 3 つの RNA 認識モチーフを持つため、hnRNPL の各 RNA 認識モチーフを欠失させたデリションミュータントを用いて、RNA 認識モチーフが IL6ST mRNA の安定性や、CASCA 及び IL6ST mRNA との結合に関わるかを検証することも必要である。

大腸癌における IL6 シグナル

CASCA の下流遺伝子として特定した IL6ST は複数のサイトカインの受容体複合体を構成し、シグナルの伝達において必須の役割を果たす。(Taga *et al.*,1997) これまでに IL6ST がシグナル伝達に関わるサイトカインとして、IL6、IL11、IL27、LIF、OSM、CNTF、CLC、CT-1 が報告されている。IL6 が IL6R に受容されると、IL6R は 2 つの IL6ST と 3 量体を形成し、IL6ST が細胞内へシグナルを伝達する。その他のサイトカインにおいては受容するレセプターの組み合わせが変化する。リガンドを受容した IL6ST は Janus kinases (JAK) のリン酸化を引き起こす。(Stahl *et al.*,1994;Lutticken *et al.*,1994) リン酸化を受けて活性化した JAK は STAT をリン酸化し STAT シグナリングを活性化する。また、JAK の活性化は PI3K シグナリング、MAP キナーゼカスケードの活性化を行うことも知られている。(Takahashi *et al.*,1998;Li *et al.*,1994) IL6/JAK/STAT シグナリングの異所的な亢進は胃癌の発症を促進することが報告されている。(Howlett *et al.*,2005;Jenkins *et al.*,2005;Ernst *et al.*,2008) また、大腸癌患者において IL6 の血中濃度が上昇していることが知られている (Li *et al.*,2010;Knapfer *et al.*,2010) 乳癌、肺癌、肝細胞癌において STAT3 の活

活性化が起きていることが報告されている。(Isomoto *et al.*,2007;He *et al.*,2003;Niwa *et al.*,2005;Ying *et al.*,2010) 大腸癌幹細胞においても IL6/JAK/STAT シグナリングが重要な役割を果たし、CASCA/IL6ST 経路がその調節を担っている可能性がある。これまでに、平面培養した大腸癌細胞を用いた実験では CASCA のノックダウンによって JAK/STAT シグナルは変化しないという結果を得ている。大腸癌幹細胞を用いた実験や、無血清三次元培養を行った大腸癌細胞を用いた実験により、JAK/STAT シグナル経路の活性化状態を調べる必要がある。また、IL6ST は JAK/STAT シグナルの活性化の他にも、MAP キナーゼカスケードや PI3K シグナルの活性化を通して EGF シグナルとクロストークし、細胞の増殖や運動を活性化させることも報告されていることから、これらのシグナル経路の活性化状態も考える必要がある。

IL6ST をノックダウンした際に無血清三次元培養を行った HCT116 細胞の増殖が変化することから、無血清三次元培養下において HCT116 細胞は自ら IL6ST のシグナル伝達に関わるリガンドを分泌し、受容するオートクライン経路が成り立っている可能性が高いと考えられる。IL6ST が関わるサイトカインやサイトカイン受容体のノックダウンによって、無血清三次元培養下における増殖を制御するシグナル伝達因子を明らかにしていくことができるのではないかと考えられる。

CASCA の機能における IL6ST の重要性

CASCA 及び IL6ST をノックダウンした際の無血清三次元培養下における HCT116 細胞の増殖を比較すると、CASCA のノックダウンによる抑制効果の方が大きいことがわかる。本研究においては CASCA の下流因子として特に IL6ST に着目して研究を進めた。今後 CASCA をノックダウンした細胞において IL6ST を強制発現するレスキュー実験を行い、CASCA が担う機能における IL6ST の重要性を検討していく必要がある。また、CASCA が hnRNPL と複合

体を形成することから hnRNPL のノックダウンにおいても変動する遺伝子を下流因子として絞り込んだが、hnRNPL のノックダウンによる IL6ST の mRNA 量の変化や IL6ST mRNA の安定性の変化は CASCA をノックダウンした際に比べて小さい。hnRNPL が関わらない下流シグナルについても検討していく必要があると考えられる。

結論

タンパク質をコードするヒト遺伝子は2万5000程度存在すると考えられているが、これはゲノム上の1.4%でしかない。ヒトとマウスにおいてもタンパク質をコードする遺伝子の99%が相同であると考えられているが、遺伝子をコードしない領域やノンコーディング RNA の数は生物が複雑になるにつれて増してきている。既存の癌治療はタンパク質を中心としたプロテオーム、メタボロームに焦点が当てられてきた。ノンコーディング RNA は時期、組織特異的な発現パターンを示すことに加え、癌等の病変部位において特異的な発現パターンを示すことが知られている。ノンコーディング RNA は診断や治療の標的となりうると思う。

本研究では、大腸癌の腫瘍形成能に関わるノンコーディング RNA の探索を行い、2つの新規ノンコーディング RNA、MYU 及び CASCA を同定することに成功した。さらに本研究では2つのノンコーディング RNA の機能解析を行い、ノンコーディング RNA が腫瘍形成能を高めるメカニズムの一端を明らかにした。

c-Myc 標的ノンコーディング RNA の探索を行い、MYU を同定した。MYU は Wnt/ β -catenin シグナルの標的であり、さらに c-Myc が直接発現を制御する。MYU のノックダウンにより大腸癌細胞の持つ造腫瘍能が顕著に抑制されたことから、MYU は大腸癌の腫瘍形成能に強く関わることを示された。MYU はゲノム上において Vps9d1 遺伝子の反対鎖に存在している。MYU のノックダウンは Vps9d1 の発現を上昇させること、及び MYU の過剰発現により Vps9d1 の発現が低下することから、MYU は Vps9d1 の発現を負に制御していることが明らかとなった。Vps9d1 が Rab5 選択的な GEF として機能することを明らかにし

た。MS解析による Vps9d1 の結合タンパク質の探索により、Vps9d1 はアダプタータンパク質 Grb2 と結合することも明らかにした。さらに免疫沈降実験及び免疫染色により、Vps9d1 がエンドソームに局在し、取り込まれた EGFR と結合することを示した。これらの結果により Vps9d1 が EGFR のエンドサイトーシスを通して EGF シグナルの調節に関わる分子機構が示唆された。

大腸癌検体由来細胞から単離した細胞の網羅的トランスクリプトーム解析と siRNA を用いたスクリーニングによって、大腸癌幹細胞関連ノンコーディング RNA として CASCA を同定した。CASCA のノックダウンによって大腸癌細胞の三次元無血清培養時の増殖、及び腫瘍形成能が抑制されたことから、CASCA は大腸癌の腫瘍形成能に関わることが示唆された。biotin RNA pull-down アッセイにより、CASCA の結合タンパク質の探索を行い、RNA 結合タンパク質 hnRNPL を同定した。マイクロアレイ解析及び qRT-PCR によって、CASCA をノックダウンした際に発現変動する遺伝子を探索し、14 の下流遺伝子を同定した。さらに CASCA 及び hnRNPL のどちらかをノックダウンしても発現が変動する遺伝子として IL6ST を見出した。IL6ST のノックダウンは大腸癌の三次元無血清培養時の増殖を抑制したことから、CASCA が IL6ST の発現制御を介して大腸癌の幹細胞性に寄与する機構が示唆された。

引用文献

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100 (7) :3983-8.

Balaji K, Mooser C, Janson CM, Bliss JM, Hojjat H, Colicelli J. *Curr Opin Cell Biol*. RIN1 orchestrates the activation of RAB5 GTPases and ABL tyrosine kinases to determine the fate of EGFR. *J Cell Sci*. 2012 Dec 1;125(Pt 23):5887-96.

Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*. 2010 Jan 8;6(1):25-36.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec 7;444 (7120) :756-60.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3 (7) :730-7.

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996 Aug 15;382 (6592) :638-42.

Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that

forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991 Mar 8;251 (4998) :1211-7.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000 Oct 13;103 (2) :311-20.

Brooks TA, Hurley LH. Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer*. 2010 Jun;1 (6) :641-649.

Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K. pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature*. 1997 Feb 27;385 (6619) :829-33.

Burd CG, Mustol PA, Schu PV, Emr SD. A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins. *Mol Cell Biol*. 1996 May;16 (5) :2369-77.

Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11 (24) :3286-305.

Coppola JA, Cole MD. Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment. *Nature*. 1986 Apr 24-30;320 (6064) :760-3.

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*. 2009 Mar 27;33 (6) :717-26.

Chen LL1, Carmichael GG. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol Cell*. 2009 Aug 28;35 (4) :467-78.

Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3;127 (3) :469-80.

Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012 Jun 8;149 (6) :1192-205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012 Mar 30;149 (1) :22-35.

Delprato A, Merithew E, Lambright DG. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell*. 2004 Sep 3;118 (5) :607-17.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104 (24) :10158-63.

Dinneen JL, Ceresa BP. Continual expression of Rab5(Q79L) causes a ligand-independent EGFR internalization and diminishes EGFR activity. *Traffic*. 2004 Aug;5(8):606-15.

ENCODE Project Consortium, Birney E. et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007 Jun 14;447 (7146) :799-816.

An,S&Song,J.J *Mol cell* 2011

Ernst M, Najdovska M, Grail D, Lundgren-May T, Buchert M, Tye H, Matthews VB, Armes J, Bhathal PS, Hughes NR, Marcusson EG, Karras JG, Na S, Sedgwick JD, Hertzog PJ, Jenkins BJ. STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. *J Clin Invest*. 2008 May;118 (5) :1727-38.

Fladvad 2005, Liu 2003, McEwan 1996, McMahon 2000, Nikiforov 2002
Fukuda M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci Rep.* 2011 Jun;31 (3) :159-68.

Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001 Apr;3 (4) :433-8.

Feuring-Buske M, Hogge DE. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34 (+) CD38 (-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001 Jun 15;97 (12) :3882-9.

Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer.* 2011 Apr 13;10:38.

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 1991 Mar 8;64(5):915-25.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004 Aug 6;118 (3) :285-96.

Hadano S, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Kunita R, Yanagisawa Y, Showguchi-Miyata J, Mizumura H, Ikeda JE. ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett.* 2004 Sep 24;575 (1-3) :64-70.

Hama H, Tall GG, Horazdovsky BF. Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *J Biol Chem.*

1999 May 21;274 (21) :15284-91.

Hamilton BJ, Wang XW, Collins J, Bloch D, Bergeron A, Henry B, Terry BM, Zan M, Mouland AJ, Rigby WF. Separate cis-trans pathways post-transcriptionally regulate murine CD154 (CD40 ligand) expression: a novel function for CA repeats in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*. 2008 Sep 12;283(37):25606-16.

He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, Costello JF, McCormick F, Jablons DM. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100 (24) :14133-8.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998 Sep 4;281 (5382) :1509-12.

Horiuchi H, Lippé R, McBride HM, Rubino M, Woodman P, Stenmark H, Rybin V, Wilm M, Ashman K, Mann M, Zerial M. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*. 1997 Sep 19;90 (6) :1149-59.

Hurley LH, Von Hoff DD, Siddiqui-Jain A, Yang D. Drug targeting of the c-MYC promoter to repress gene expression via a G-quadruplex silencer element. *Semin Oncol*. 2006 Aug;33 (4) :498-512.

Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Nov;1793 (11) :1623-33.

Huarte M, Rinn JL. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 15;19 (R2) :R152-61.

Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3382-9.

Hui J, Hung LH, Heiner M, Schreiner S, Neumüller N, Reither G, Haas SA, Bindereif A. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J.* 2005 Jun 1;24(11):1988-98. Epub 2005 May 12.

Hui J, Reither G, Bindereif A. Novel functional role of CA repeats and hnRNP L in RNA stability. *RNA.* 2003 Aug;9(8):931-6.

Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat Struct Biol.* 2003 Jan;10(1):33-7.

Ignatenko NA, Holubec H, Besselsen DG, Blohm-Mangone KA, Padilla-Torres JL, Nagle RB, de Alboránç IM, Guillen-R JM, Gerner EW. Role of c-Myc in intestinal tumorigenesis of the ApcMin/+ mouse. *Cancer Biol Ther.* 2006 Dec;5(12):1658-64.

Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, Gores GJ. Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology.* 2007 Jan;132(1):384-96.

Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M, Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity.* 2004 Dec;21(6):843-51.

Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22 (4) :1172-83.

Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, Najdovska M, Wang B, Waring P, Inglese M, McLoughlin RM, Jones SA, Topley N, Baumann H, Judd LM, Giraud AS, Boussioutas A, Zhu HJ, Ernst M. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med.* 2005 Aug;11 (8) :845-52.

Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, Batlle E. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med.* 2011 Sep 4;17 (10) :1225-7.

J. Gruenberg, H. Stenmark The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004 Apr (5) :317–323
Pfeffer SR. Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J Biol Chem.* 2005 Apr 22;280 (16) :15485-8.

Ji H, Wu G, Zhan X, Nolan A, Koh C, De Marzo A, Doan HM, Fan J, Cheadle C, Fallahi M, Cleveland JL, Dang CV, Zeller KI. Cell-type independent MYC target genes reveal a primordial signature involved in biomass accumulation. *PLoS One.* 2011;6 (10) :e26057.

Kajiho H, Fukushima S, Kontani K, Katada T. RINL, guanine nucleotide exchange factor Rab5-subfamily, is involved in the EphA8-degradation pathway with odin. *PLoS One.* 2012;7 (1) :e30575.

Kajiho H, Sakurai K, Minoda T, Yoshikawa M, Nakagawa S, Fukushima S, Kontani K, Katada T. Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31. *J Biol Chem.* 2011

Jul 8;286 (27) :24364-73.

Kajiho H, Saito K, Tsujita K, Kontani K, Araki Y, Kurosu H, Katada T. RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116 (Pt 20) :4159-68.

Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, Rodermond H, Clevers H, Medema JP. Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. *Stem Cells.* 2012 Nov;30 (11) :2378-86.

Knüpfer H, Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *Int J Colorectal Dis.* 2010 Feb;25 (2) :135-40.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87 (2) :159-70.

Kirkland SC, Ying H. Alpha2beta1 integrin regulates lineage commitment in multipotent human colorectal cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 Oct 10;283 (41) :27612-9.

Kleine-Kohlbrecher D, Adhikary S, Eilers M. Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;302:51-62.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science.* 1997 Mar 21;275 (5307) :1784-7.

Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet.* 2004 May;74 (5) :1043-50.

Langdon WY, Harris AW, Cory S, Adams JM. The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell*. 1986 Oct 10;47 (1) :11-8

Levens D. You Don't Muck with MYC. *Genes Cancer*. 2010 Jun 1;1 (6) :547-554.

Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003 May 15;423 (6937) :255-60.

Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet*. 2000 Oct;26 (2) :146-7.

Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*. 1994 Jan 7;263 (5143) :89-92.

Li W, Nishimura R, Kashishian A, Batzer AG, Kim WJ, Cooper JA, Schlessinger J. A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1994 Jan;14 (1) :509-17.

Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, Xia B, Kuipers EJ, van der Woude CJ. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut*. 2010 Feb;59 (2) :227-35.

Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1996 Aug 9;86 (3) :391-9.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009 Mar;10 (3) :155-9.

Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, van der Brug MP, Wahlestedt C. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol*. 2012 Mar 25;30(5):453-9.

Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat Genet*. 2013 Jan;45 (1) :98-103.

Niwa Y1, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2005 Sep 22;24 (42) :6406-17.

Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, Fraser P. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science*. 2008 Dec 12;322 (5908) :1717-20.

Nottingham RM, Pfeffer SR. Defining the boundaries: Rab GEFs and GAPs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 25;106 (34) :14185-6.

Barr F, Lambright DG. Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol*. 2010

Aug;22 (4) :461-70.

Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res.* 2002;84:81-154.

Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene.* 1999 May 13;18 (19) :2934-41.

Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S, Ikeda JE. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet.* 2003 Jul 15;12 (14) :1671-87.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007 Jan 4;445 (7123) :106-10.

Parton RG, Schrotz P, Bucci C, Gruenberg J. Plasticity of early endosomes. *J Cell Sci.* 1992 Oct;103 (Pt 2):335-48.

Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D, Kanduri C. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell.* 2008 Oct 24;32 (2) :232-46.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Dec;3 (12) :895-902.

Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell.* 2009 Feb 20;136 (4) :629-41.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000 Aug 1;14 (15):1837-51.

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature.* 2010 Jun 24;465 (7301):1033-8.

Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol.* 2001 Nov 2;313 (4):889-901.

Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2 (2):107-17.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005 Apr 14;434 (7035):843-50.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414 (6859):105-11.

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Dec;3 (12):895-902.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414 (6859):105-11.

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29;129 (7):1311-23.

Riese J, Yu X, Munnerlyn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell.* 1997 Mar 21;88 (6):777-87.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445 (7123) :111-5.

Saito K, Murai J, Kajiho H, Kontani K, Kurosu H, Katada T. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277 (5) :3412-8.

Sato M, Sato K, Fonarev P, Huang CJ, Liou W, Grant BD. *Caenorhabditis elegans* RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nat Cell Biol*. 2005 Jun;7 (6) :559-69.

Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1762-72.

Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106 (8) :2525-30.

Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL. MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res*. 2009 Mar;19 (3) :347-59.

Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci*. 2000 Jan;113 Pt 2:183-92.

Sharma S, Liu J, Wei J, Yuan H, Zhang T, Bishopric NH. Repression of miR-142 by p300 and MAPK is required for survival signalling via gp130 during adaptive hypertrophy. *EMBO Mol Med.* 2012 Jul;4(7):617-32.

Sonda N, Simonato F, Peranzoni E, Calì B, Bortoluzzi S, Bisognin A, Wang E, Marincola FM, Naldini L, Gentner B, Trautwein C, Sackett SD, Zanovello P, Molon B, Bronte V. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity.* 2013 Jun 27;38(6):1236-49.

Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, Calin GA. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene.* 2012 Oct 25;31(43) :4577-87.

Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science.* 1994 Jan 7;263 (5143) :92-5.

Tall GG, Barbieri MA, Stahl PD, Horazdovsky BF. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell.* 2001 Jul;1 (1) :73-82.

Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1998 Jul;18 (7) :4109-17.

Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797-819.

Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, Apuzzo T, Sperduti I, Volpe S, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, De Maria R,

Stassi G. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6;14 (3) :342-56.

Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1839 (11) :1097-109.

Ying M, Li D, Yang L, Wang M, Wang N, Chen Y, He M, Wang Y. Loss of SOCS3 expression is associated with an increased risk of recurrent disease in breast carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Oct;136 (10) :1617-26.

Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*. 1997 Mar 21;88 (6) :789-99.

van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997 Mar 21;275 (5307) :1787-90.

Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol*. 1982 Jun;42 (3) :773-9.

Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, Curry WT Jr, Zaupa C, Aghi M, Kuroda T, Stemmer-Rachamimov A, Shah K, Liu TC, Jeyaretna DS, Debasitis J, Pruszk J, Martuza RL, Rabkin SD. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res*. 2009 Apr 15;69 (8) :3472-81.

Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate

gene expression. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Jun;12(6):433-46.

Wei B, Han XY, Qi CL, Zhang S, Zheng ZH, Huang Y, Chen TF, Wei HB. Coaction of spheroid-derived stem-like cells and endothelial progenitor cells promotes development of colon cancer. *PLoS One.* 2012;7 (6) :e39069.

Woodman PG, Futter CE. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *2008 Aug;20(4):408-14.*

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature.* 2005 Mar 17;434 (7031) :338-45.

Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 2008 Oct 31;322 (5902) :750-6.

Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, Zhang Y, Li C, Zhang S. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett.* 2010 Dec 28;299 (2) :150-60.

謝辞

本研究にあたり、終始ご指導・ご鞭撻を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、日々実験についてお世話になりました秋山研の皆様がこの場を借りてお礼を申し上げます。特に、川崎先生には毎日の実験に対する助言から結果についての議論に至るまで丁寧にご指導を賜り厚くお礼申し上げます。

また本研究を行うにあたりご協力いただいた方々に謝意を表します。

大腸癌検体の提供をしていただいた東京大学腫瘍外科北山丈二准教授、斉藤晋祐助教ならびにスタッフの皆様。

次世代シーケンサーによる解析にご協力いただいた理化学研究所林崎グループ、東京大学白髭研究室のスタッフの皆様。

研究において多くのアドバイスをいただくと共に様々な面で支えてくださった分子情報研究分野の皆様。常に隣の席でディスカッションに付き合ってくれた杉政宏信君、松村厚佑君。大腸癌グループとしてミーティングにて助言を頂いたり実験を手伝ってくれた奥野ます美さん、小宮美文さん、須田咲希子さん。支えてくださった家族の皆様、古川史織様、深く御礼申し上げます。

2015年1月

宮本昌弥

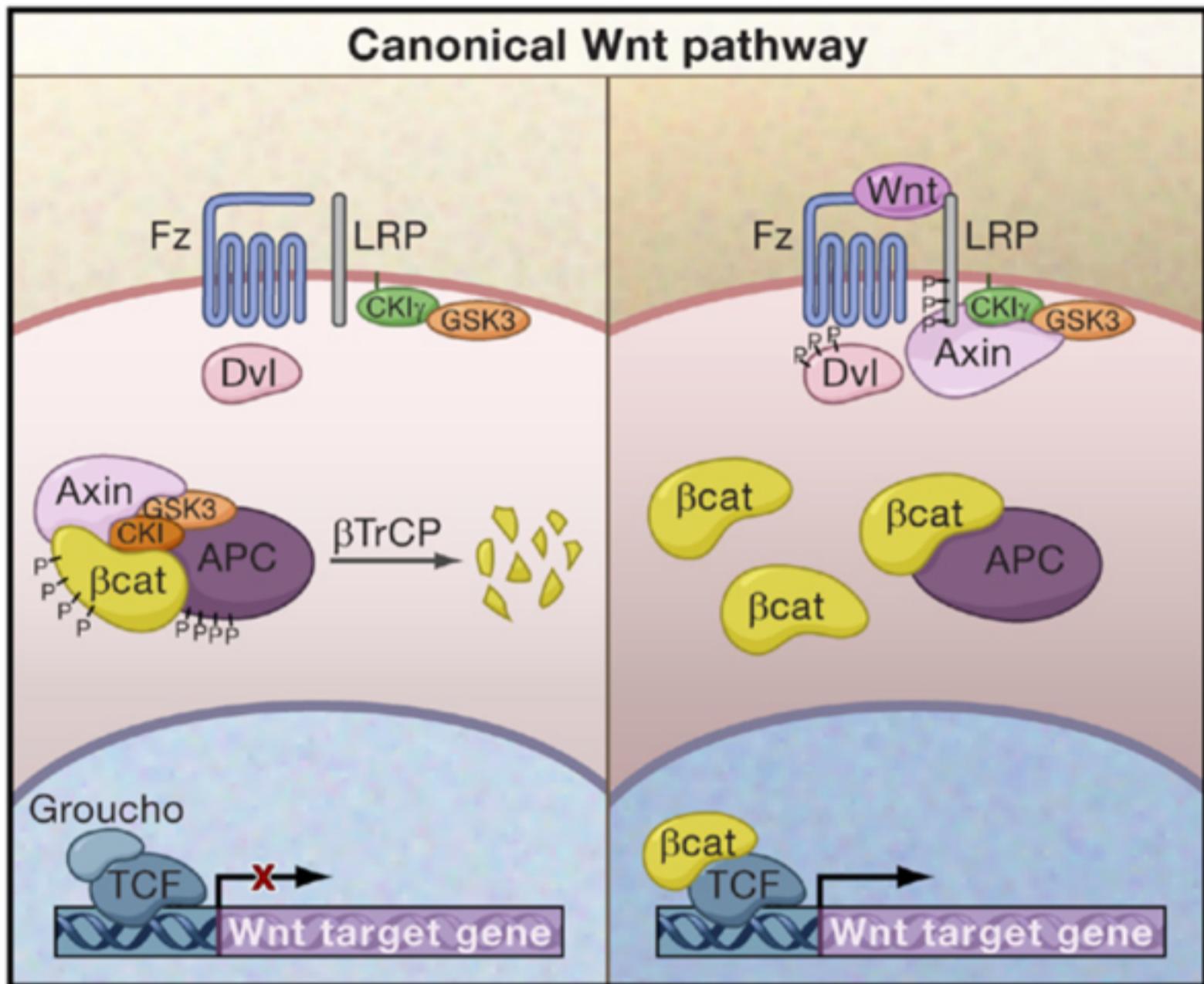


図1 Wnt/ β -cateninシグナル

(左)Wntリガンド非存在下においては、 β -cateninはAPC、GSK3 β 、Axinからなる分解複合体によりリン酸化を受け、分解される。

(右)WntリガンドがFrizzled受容体に結合すると、分解複合体の機能が抑制され β -cateninが安定化する。安定化した β -cateninは核内に移行し、TCFと結合しWnt標的遺伝子の転写を活性化する。

H Clevers. 2006 Cellより抜粋

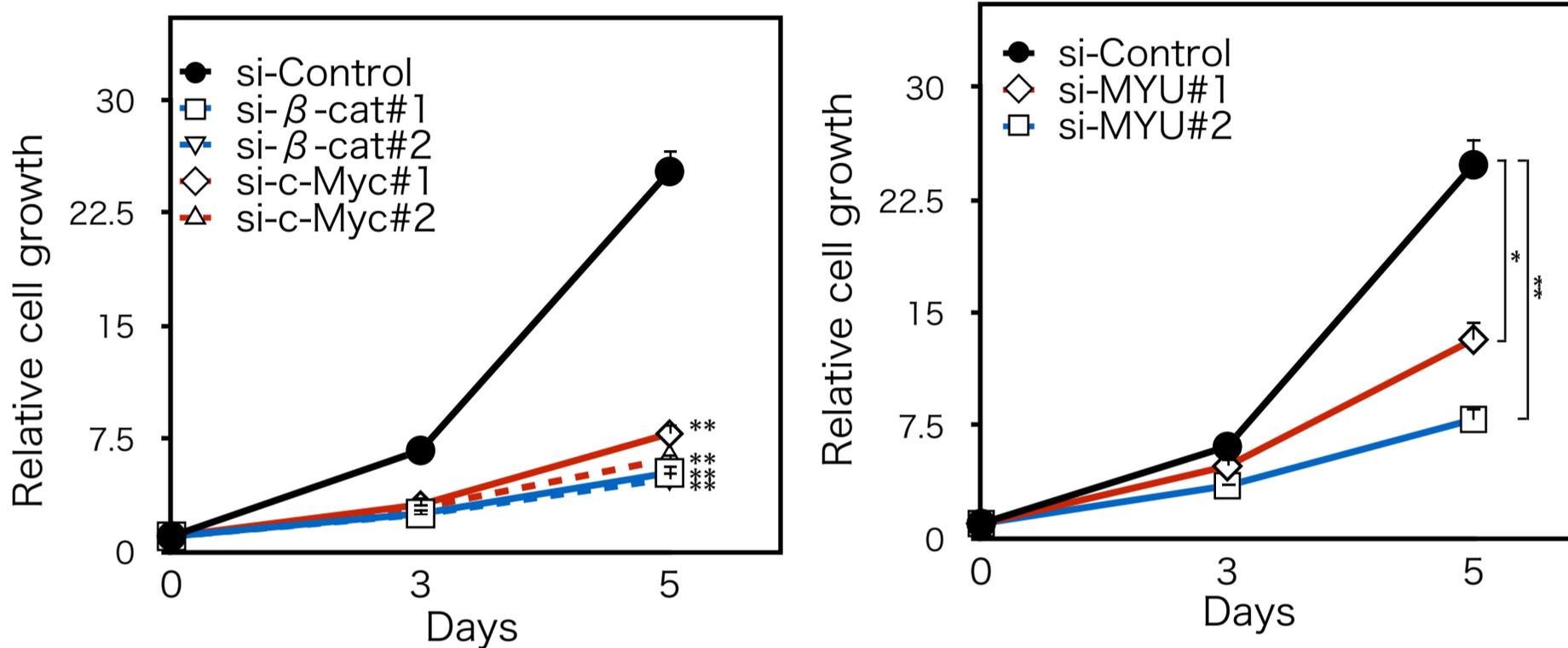


図2 MYUの発現抑制は大腸癌細胞の増殖を抑制する

(左)LS180細胞においてsiRNAを用いてc-Myc及び β -cateninをノックダウンし、細胞の増殖を測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用いた。(n=3) **P<0.001

(下)LS180細胞においてsiRNAを用いてMYUをノックダウンし、細胞の増殖を測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用いた。(n=3) **P<0.001

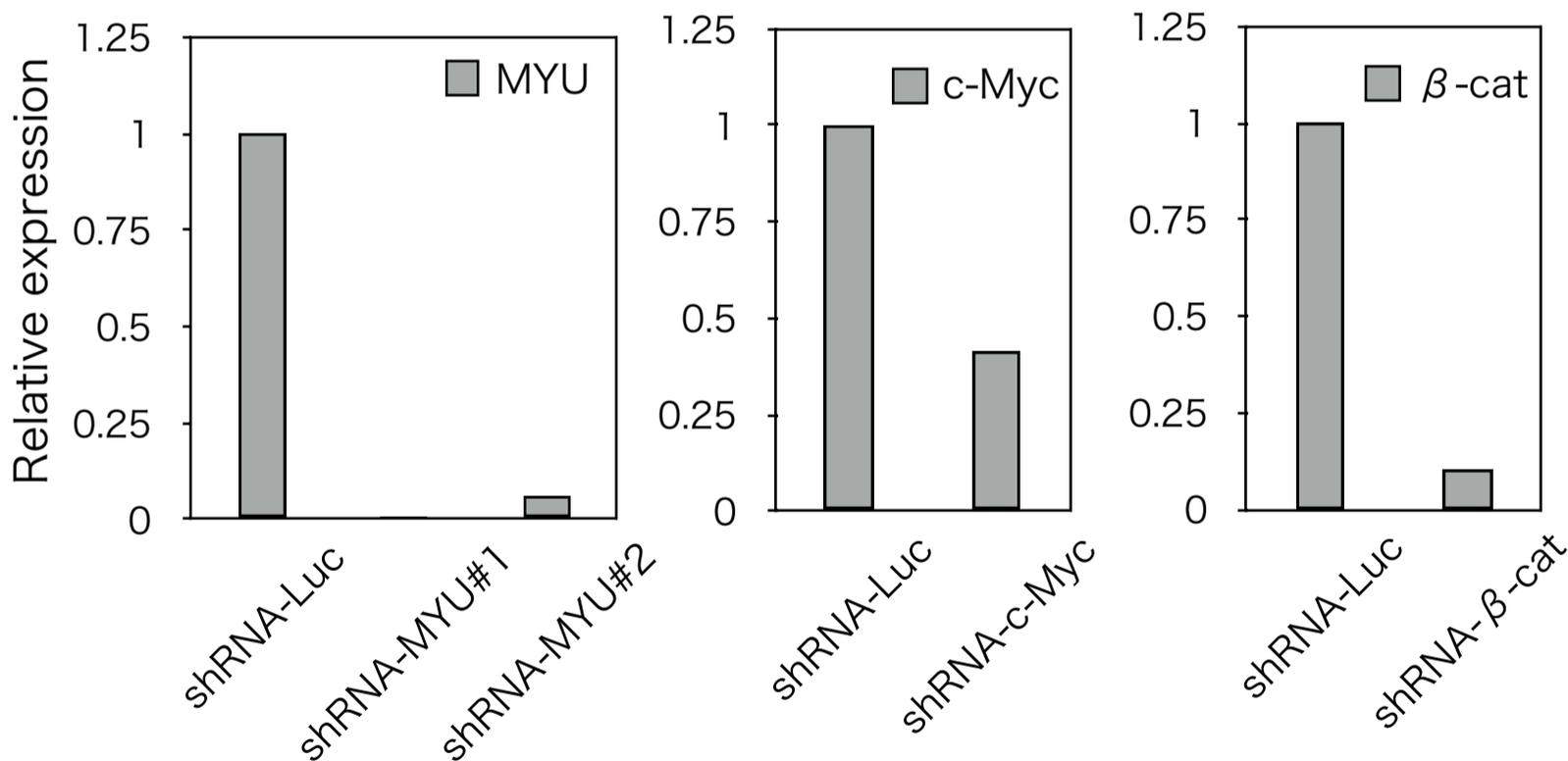
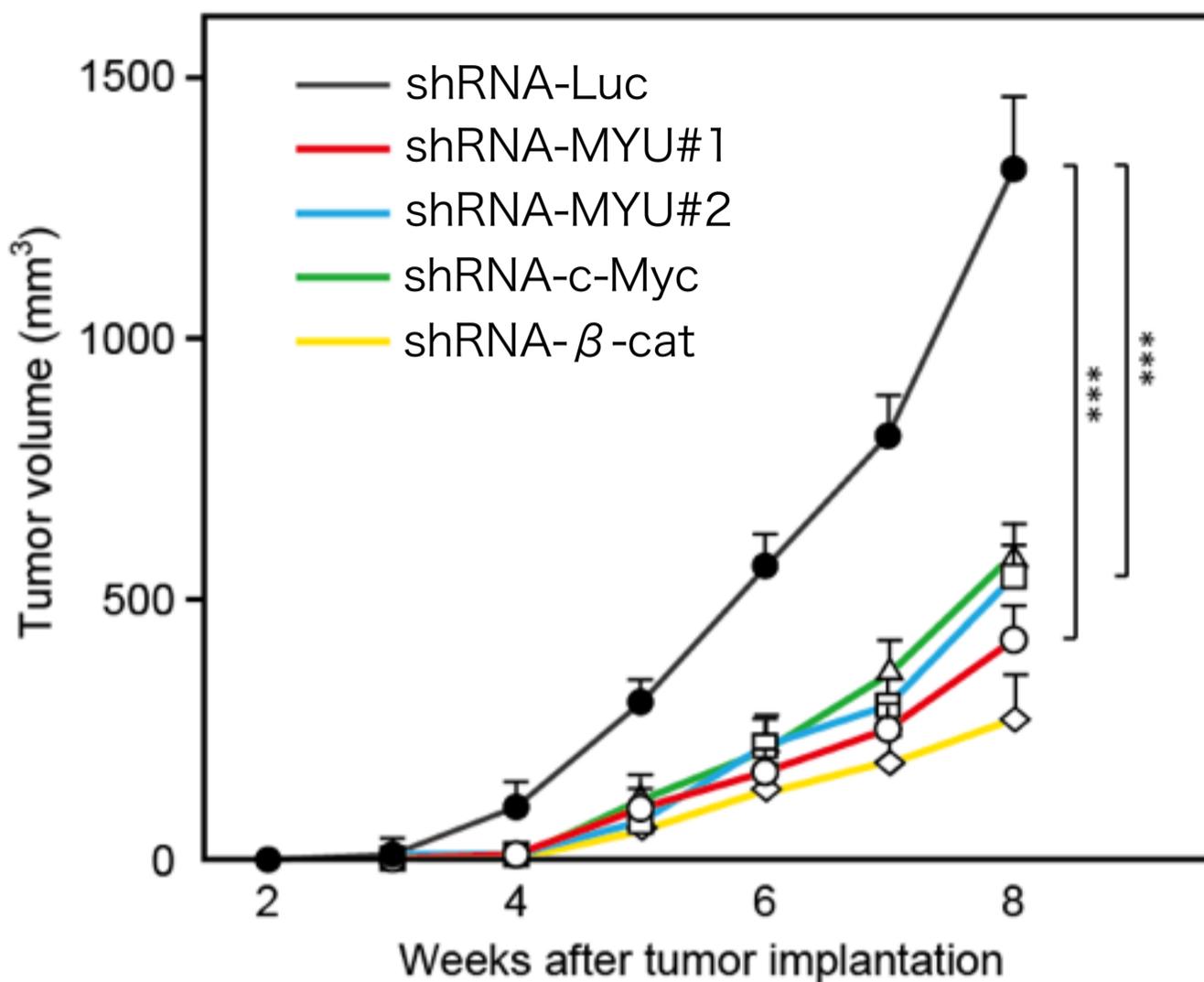


図3 MYUのノックダウンは大腸癌の腫瘍形成能を抑制する
 (上)Luciferase、MYU、c-Myc、 β -cateninに対するshRNAを用いて発現を抑制したHT29細胞を免疫不全マウスの皮下に移植した。マウス1匹当たり1000細胞を移植し、3週目から腫瘍サイズを計測した。Luciferaseに対するshRNA(shRNA-Luc)はコントロールとして用いた。(n=8/各遺伝子) ***P<0.001
 (下)各shRNAを用いて発現を抑制したHT29細胞におけるKD効率を示した。shRNAを感染後5日後の遺伝子の発現をqRT-PCRを用いて解析した。GAPDHをインターナルコントロールとして用いた。

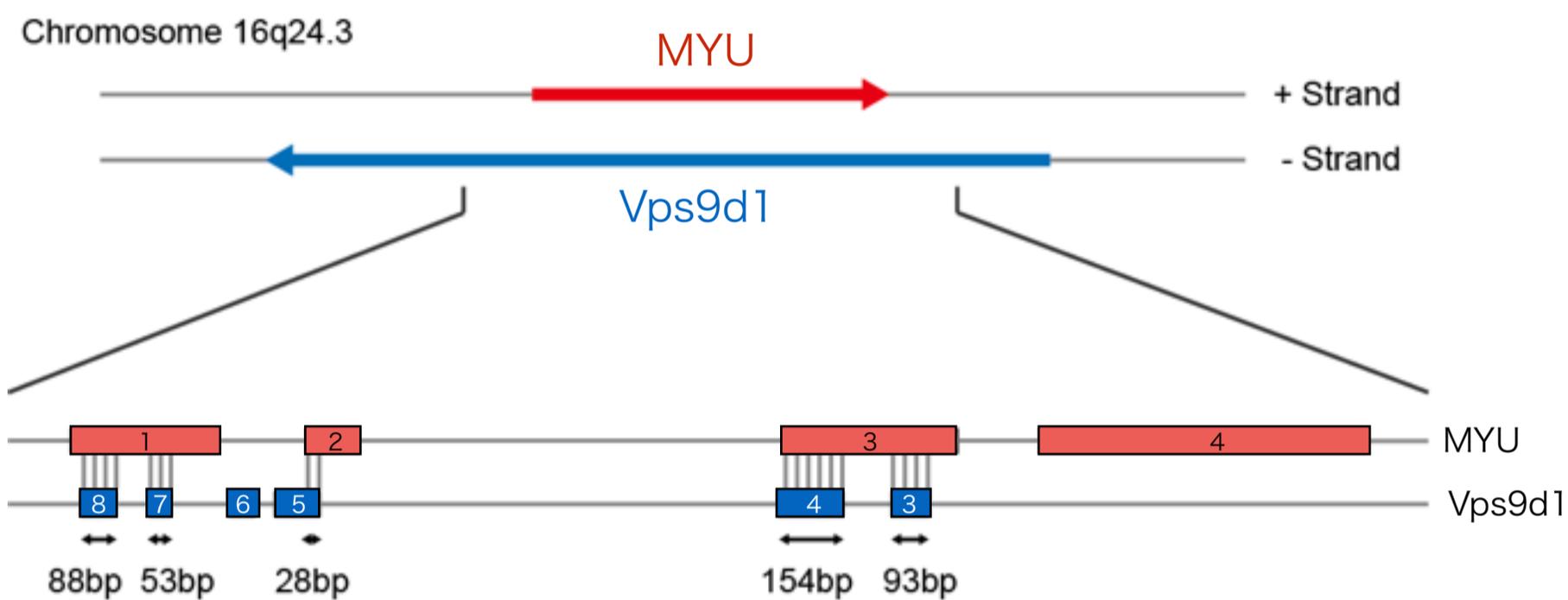


図4 16番染色体q24上におけるMYUとVps9d1の配置モデル図

(上)矢印は転写の方向を表す。

(下)オーバーラップ領域の拡大図。箱内の数字はエクソンの番号を表す。オーバーラップしているエクソンの長さを下に示した。

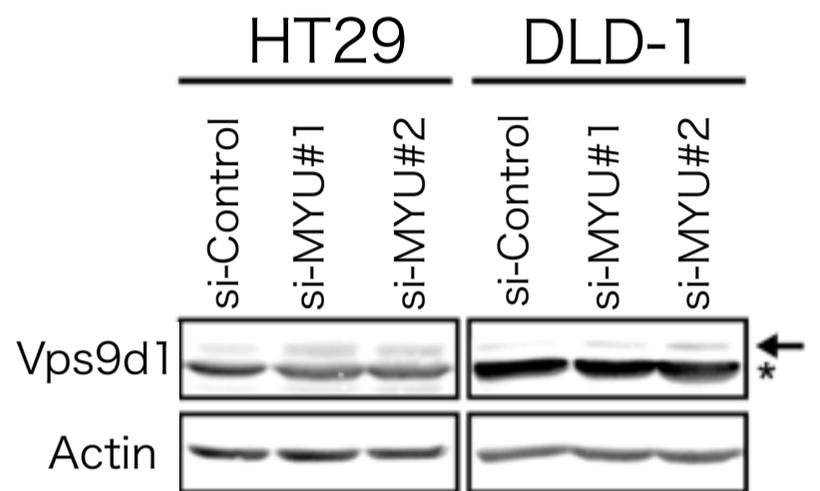
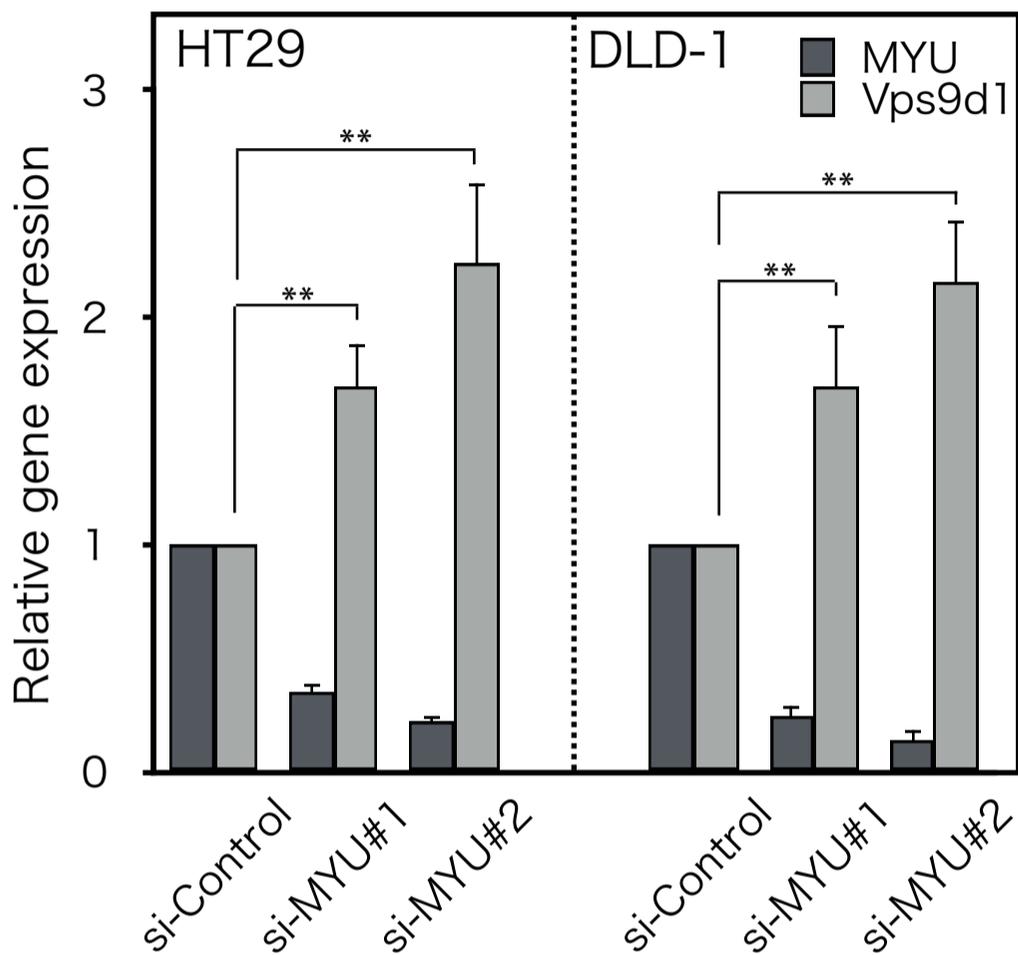


図5 MYUのノックダウンはVps9d1の発現上昇を引き起こす

(左)HT29細胞及びDLD-1細胞においてsiRNAを用いてc-Myc、 β -cateninをノックダウンし、72時間後のMYU及びVps9d1の発現量を定量的RT-PCR(qRT-PCR)によって解析した。GAPDHをインターナルコントロールとして用いた。

(n=3)**P<0.01

(右)HT29細胞及びDLD-1細胞においてsiRNAを用いてMyuをノックダウンした際のVps9d1の発現量をウェスタンブロットによって解析した。矢印でVps9d1のバンド、*は非特異的なバンドを示した。Actinはローディングコントロールとして用いた。

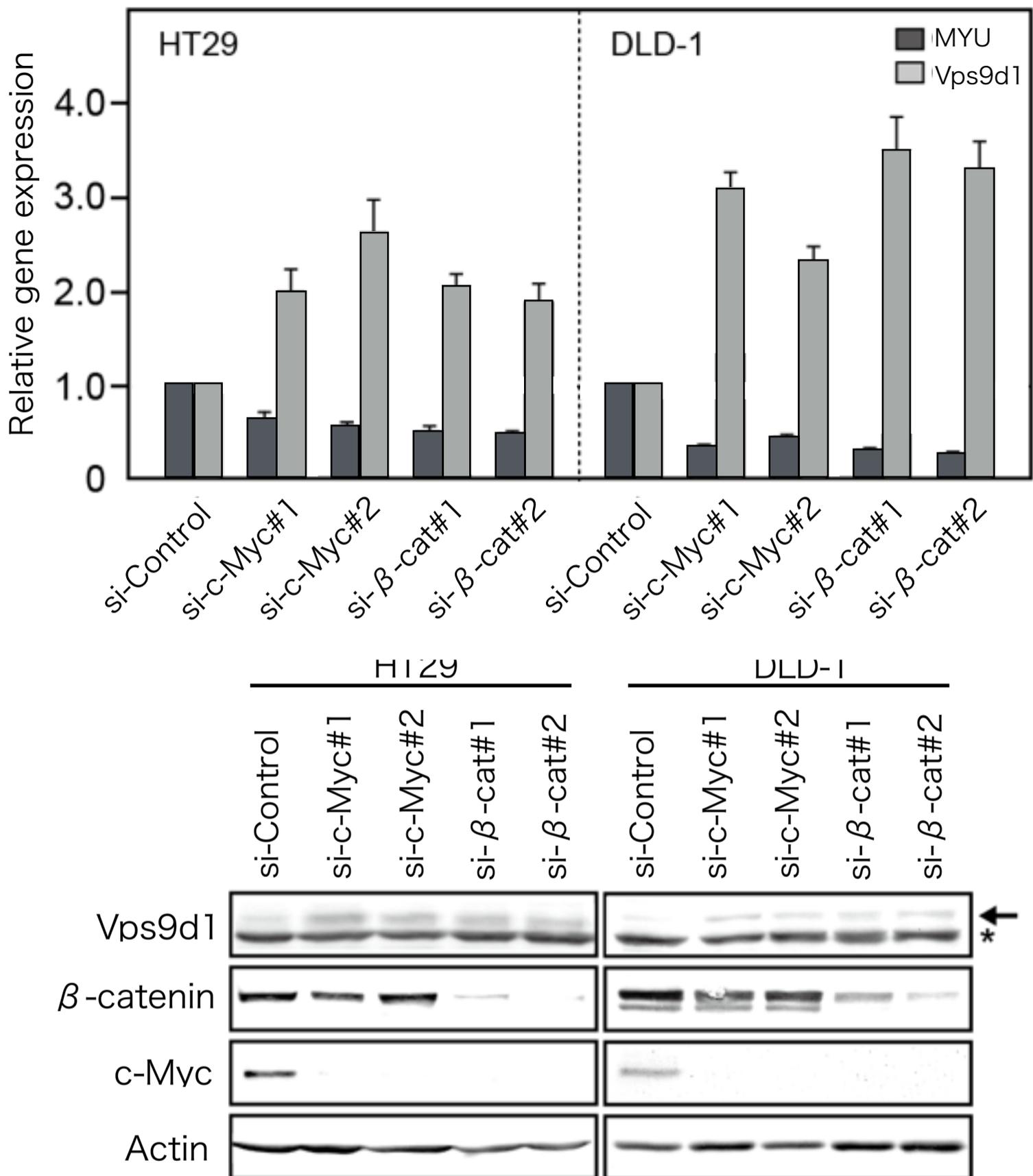


図6 β -catenin及びc-Mycの発現抑制は
Vps9d1の発現上昇を引き起こす

(上)HT29細胞及びDLD-1細胞においてsiRNAを用いてc-Myc、 β -cateninをノックダウンし、72時間後のMYU及びVps9d1の発現量を定量的RT-PCR(qRT-PCR)によって解析した。GAPDHをインターナルコントロールとして用いた。

(下)HT29細胞及びDLD-1細胞においてsiRNAを用いてc-Myc、 β -cateninをノックダウンし、72時間後のMyu及びVps9d1の発現量をウェスタンブロットによって解析した。矢印でVps9d1のバンド、*は非特異的なバンドを示した。Actinはローディングコントロールとして用いた。

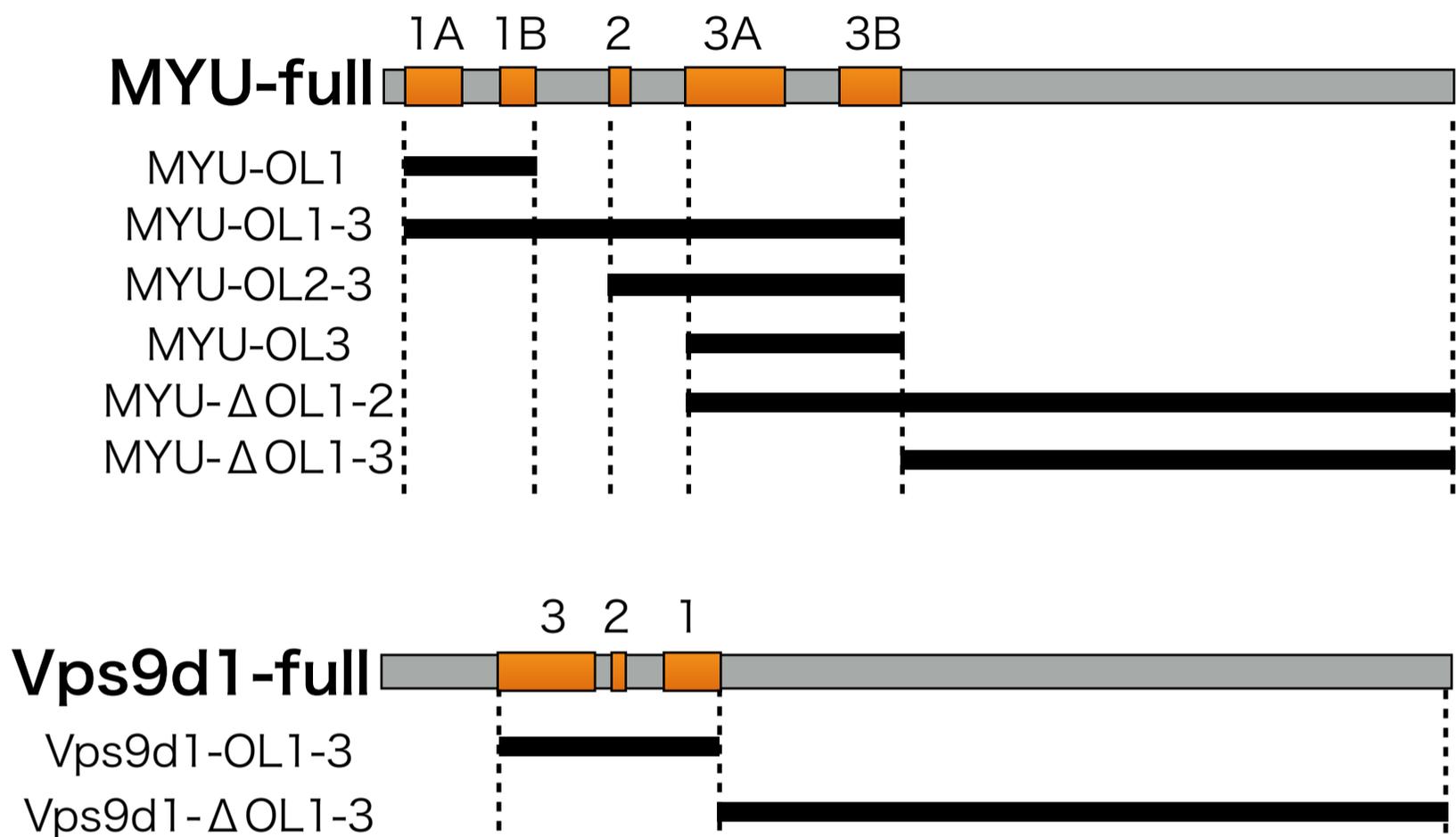


図7 MYU及びVps9d1の野生型及び欠失型変異体の構造モデル図

(上) MYUの変異体の構造モデル図。MYUはVps9d1に対して5つのオーバーラップ領域(OL1A、OL1B、OL2、OL3A、OL3B)を持つ。

(下) Vps9d1の変異体の構造モデル図。Vps9d1はMYUに対して3つのオーバーラップ領域(OL1-3)を持つ。

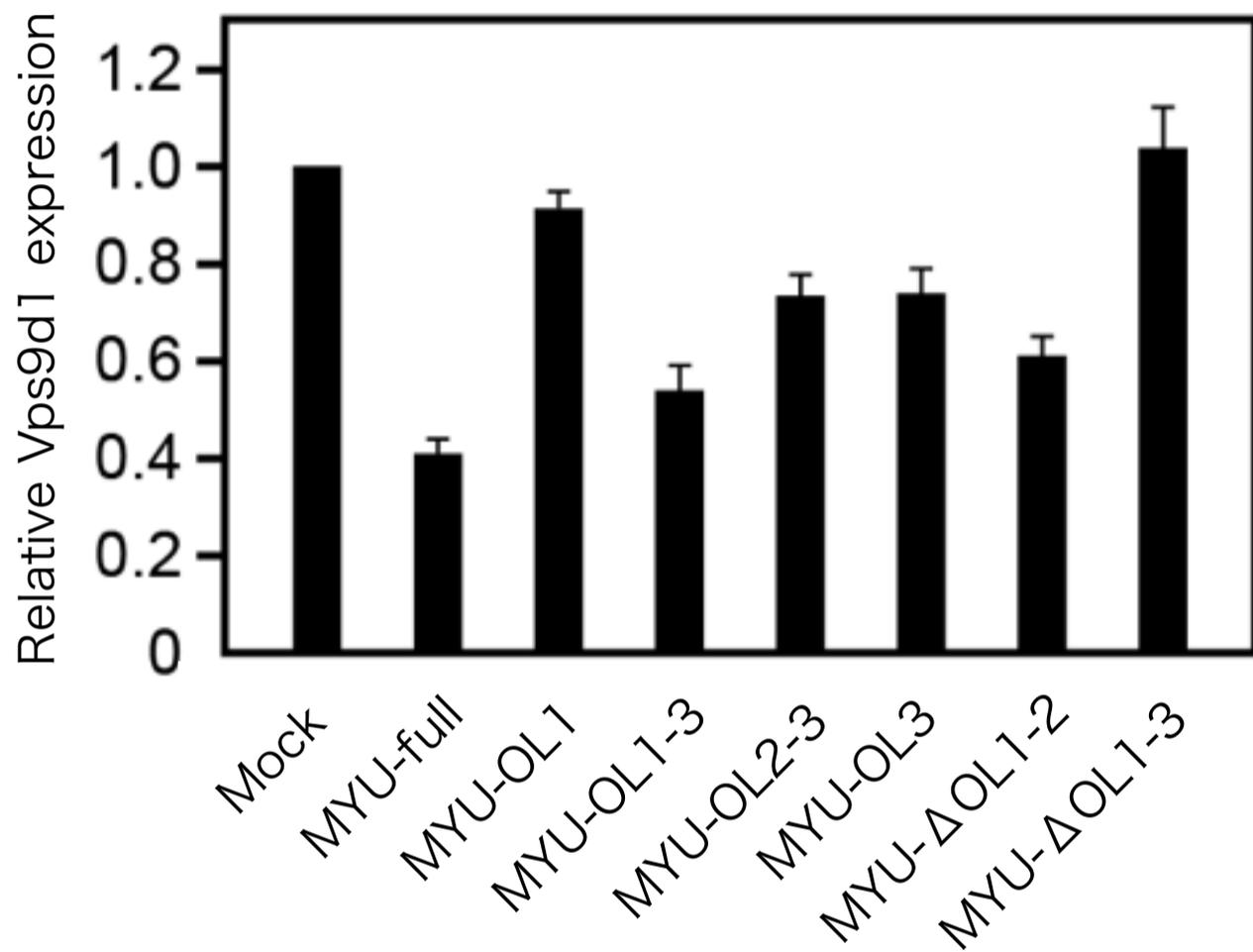


図8 MYUの強制発現はVps9d1 mRNA量を低下させる

HEK293細胞において、MYUの全長及び各欠失型変異体を強制発現した際のVps9d1の発現量をqRT-PCRによって解析した。GAPDHをインターナルコントロールとして用いた。(n=3)

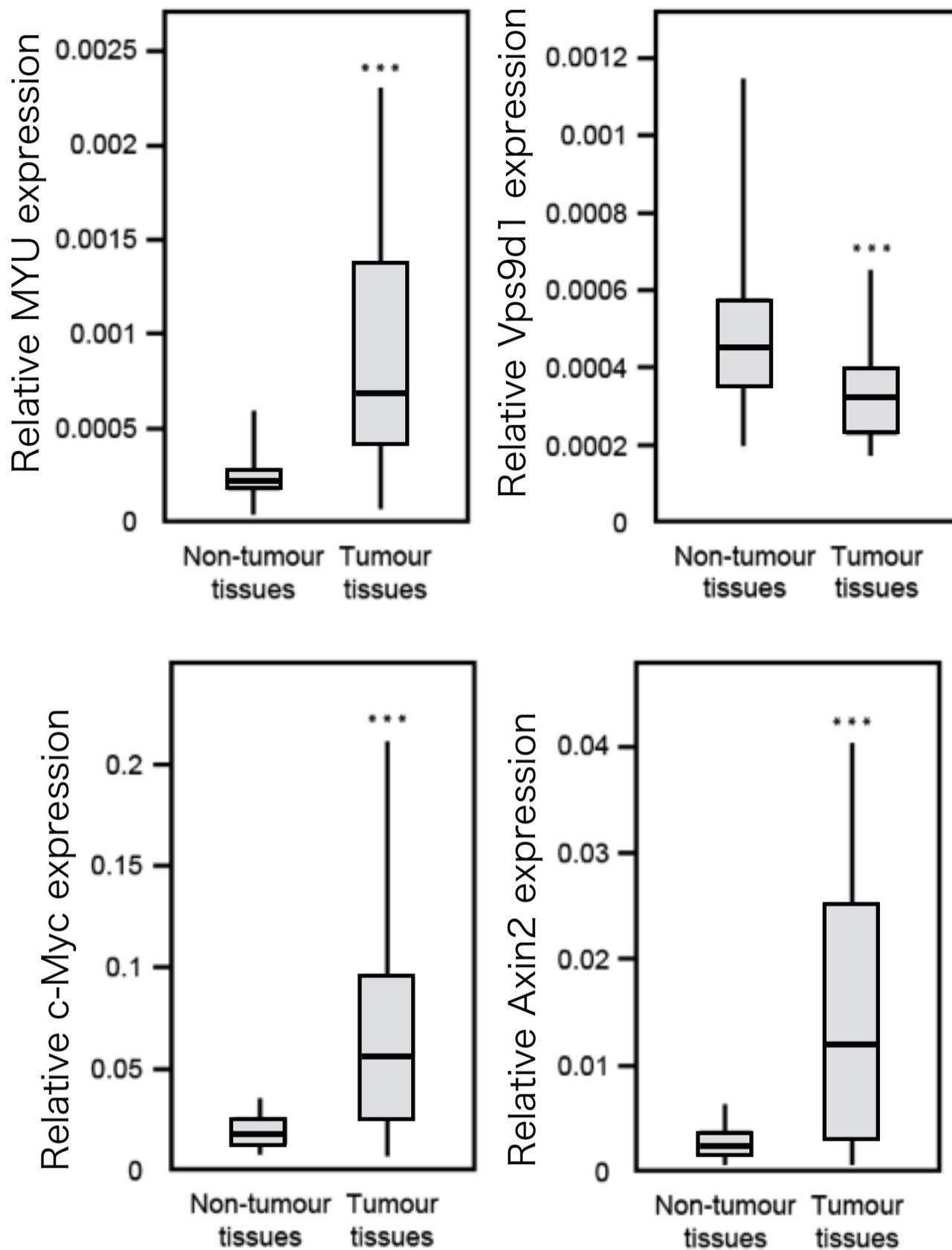


図9 MYUは大腸癌細胞において高発現している

大腸癌検体の正常組織部分と癌病変部位における各遺伝子の発現量をqRT-PCRによって解析し、Actinに対する発現量の割合を表した。c-Myc及びAxin2はWnt/ β -cateninシグナルの活性化の指標として用いた。(n=28)

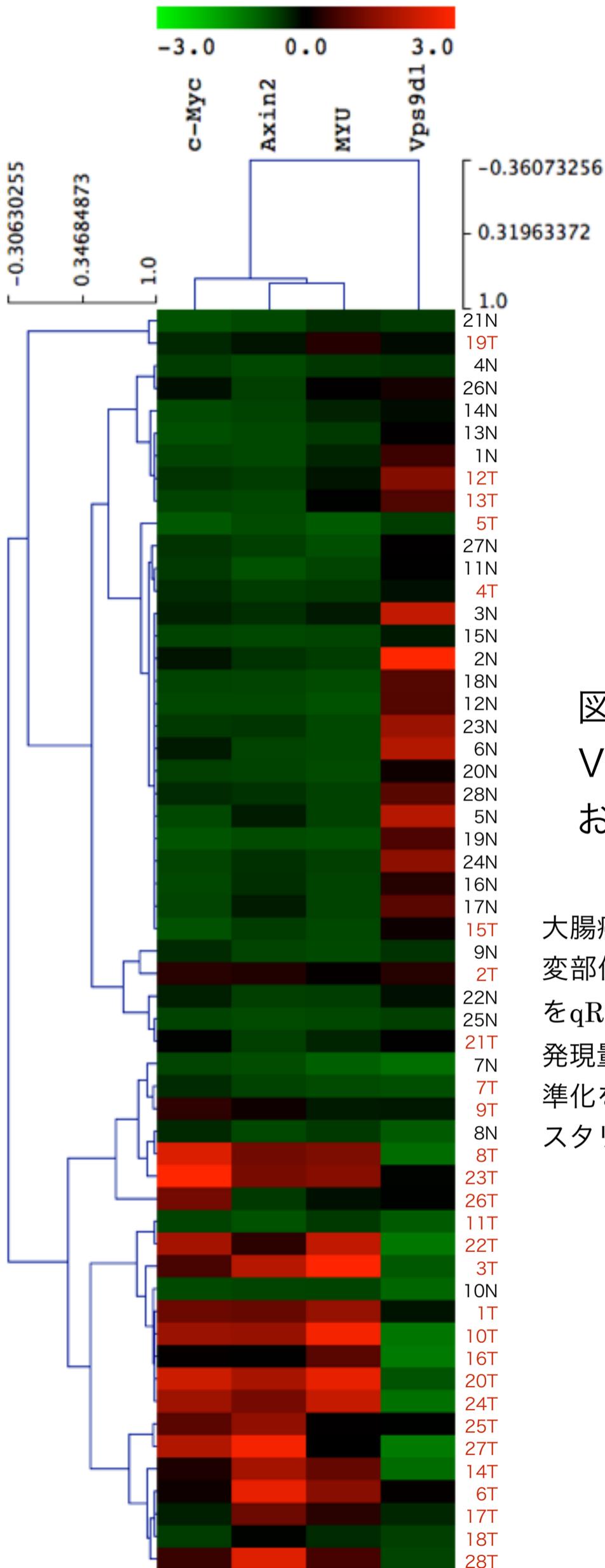


図10 c-Myc、Axin2、MYU、Vps9d1遺伝子の大腸癌検体における発現量のクラスタリング

大腸癌検体の正常組織部分(1N-28N)と癌病変部位(1T-28T)における各遺伝子の発現量をqRT-PCRによって解析し、Actinに対する発現量の割合を計算した。各遺伝子ごとに標準化を行った後に、UPGMA法によってクラスタリングを行った。

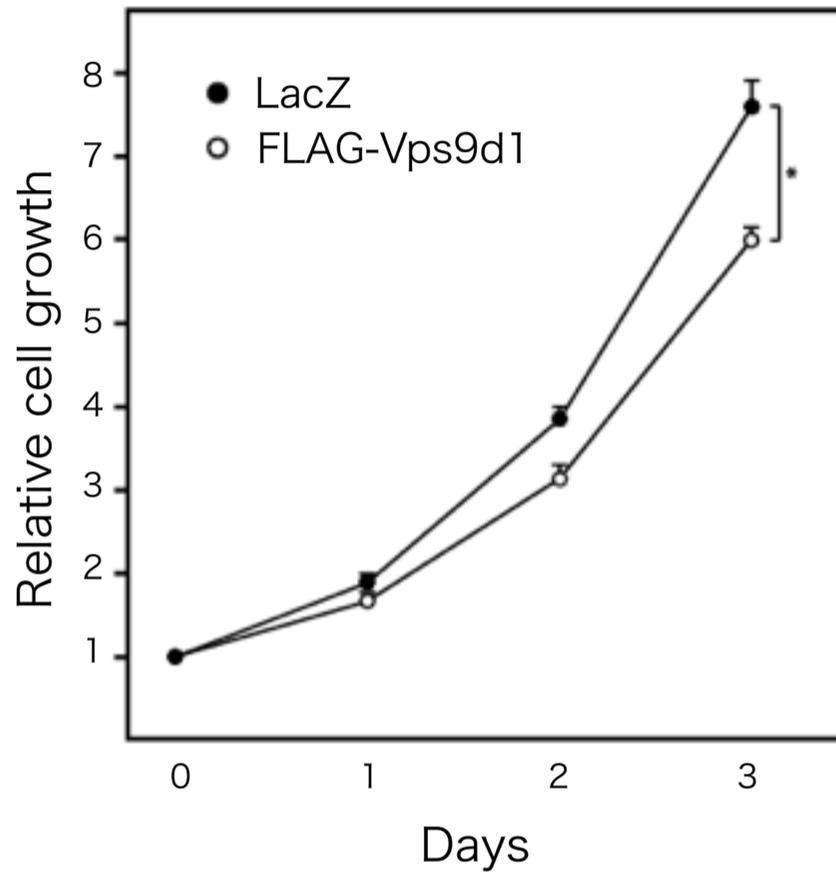


図11 Vps9d1の強制発現は大腸癌細胞の増殖を抑制する

HT29細胞においてレンチウイルスを用いてFLAGタグ付きVps9d1を強制発現し、増殖を測定した。LacZを強制発現した細胞をコントロールとして用いた。(n=3) *P<0.05

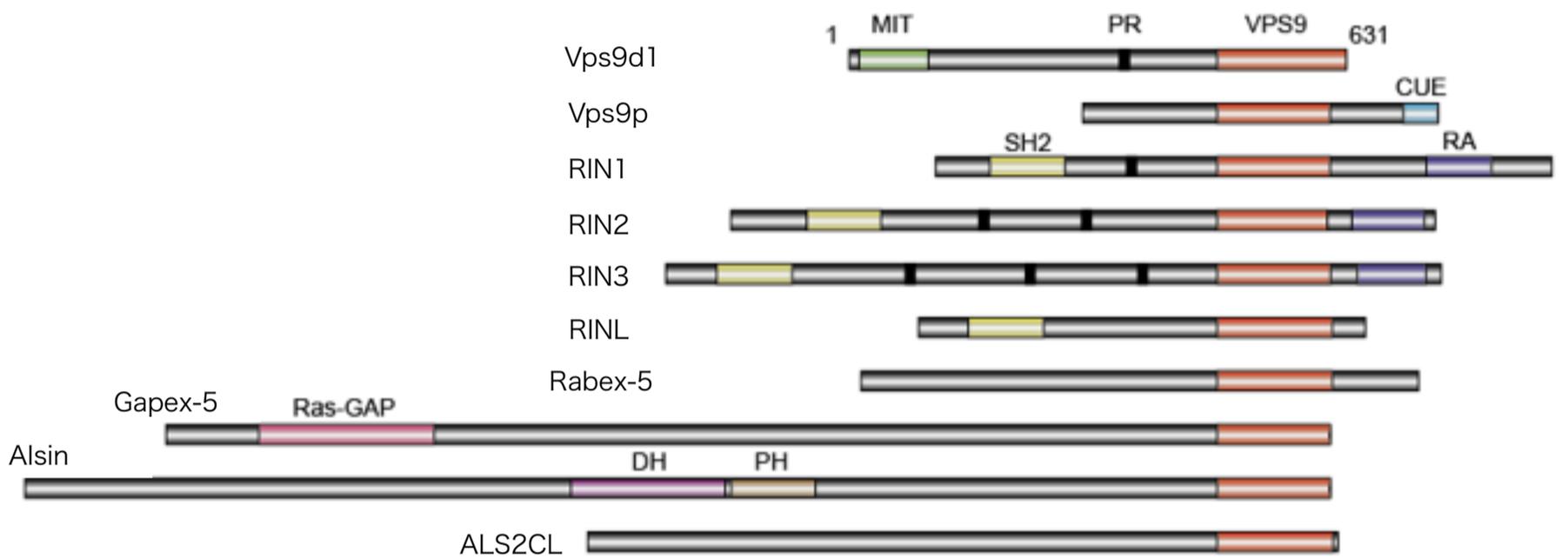


図12 Vps9ドメインを持つタンパク質のドメイン構造図

Vps9ドメインを持つタンパク質の構造図を表した。

MIT : microtubule interacting and trafficking, PR: proline-rich region, CUE Coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation, SH2 : Src homology domain 2, RA : Ras association, DH : Dbl homology domain, PH : Pleckstrin homology domain

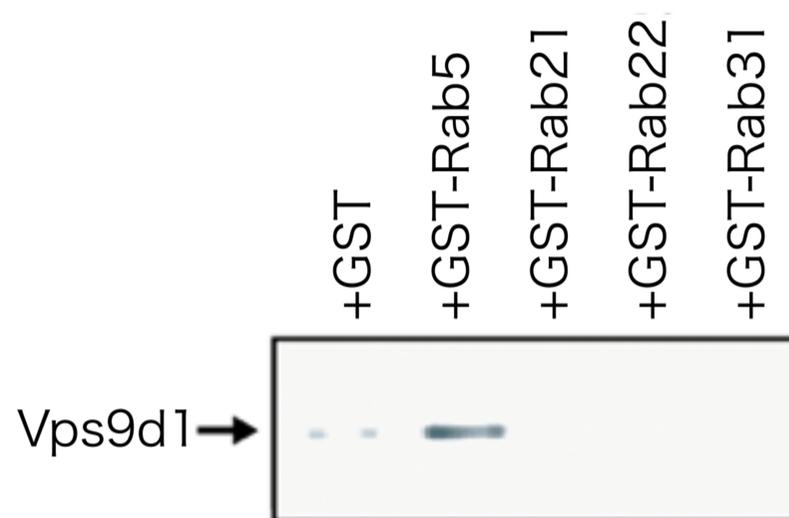


図13 Vps9d1はRab5と結合する

Vps9d1とRab5、Rab21、Rab22、Rab31との結合をGST pull-downアッセイによって検討した。大腸菌で作成したGSTタンパク質とin vitro translation(IVT)により合成したVps9d1を混ぜ合わせ、pull-downを行った。pull-down産物をSDS-PAGEによって展開し、ウェスタンブロット解析によって検出した。

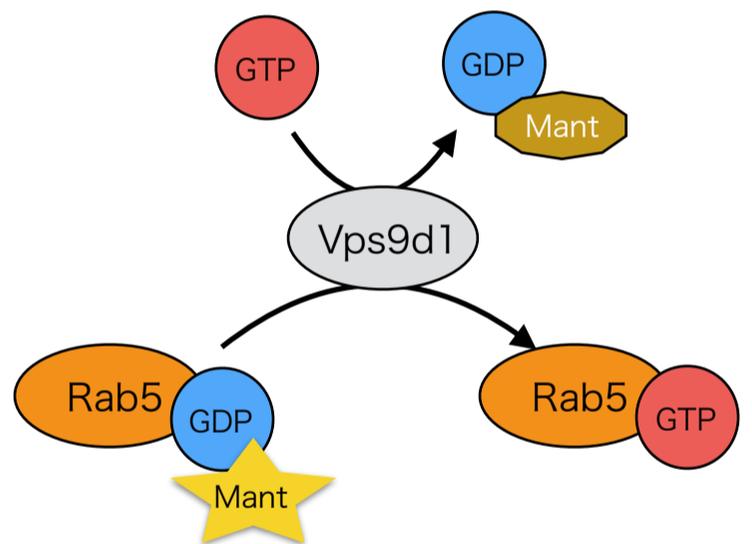
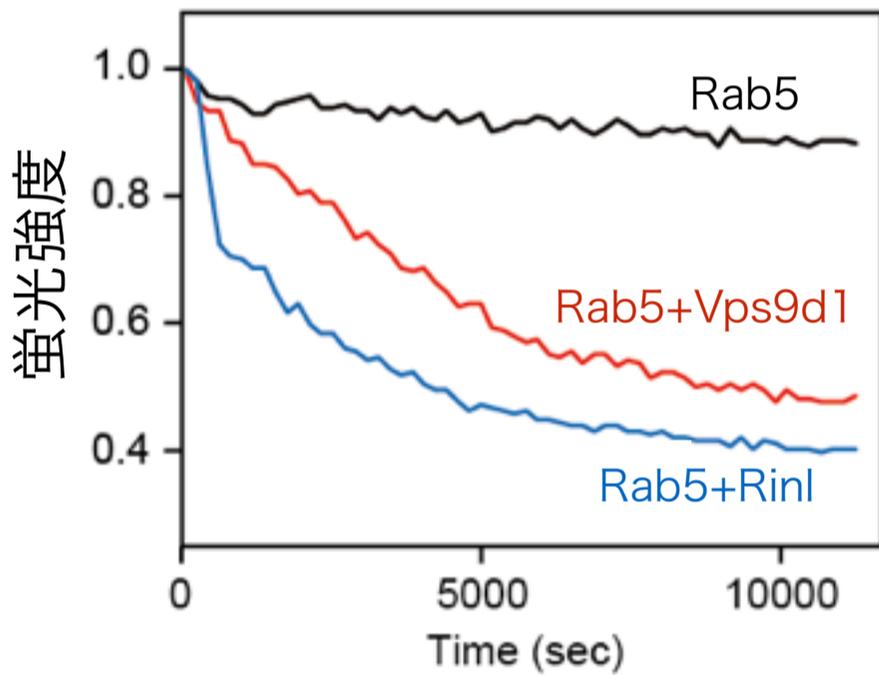
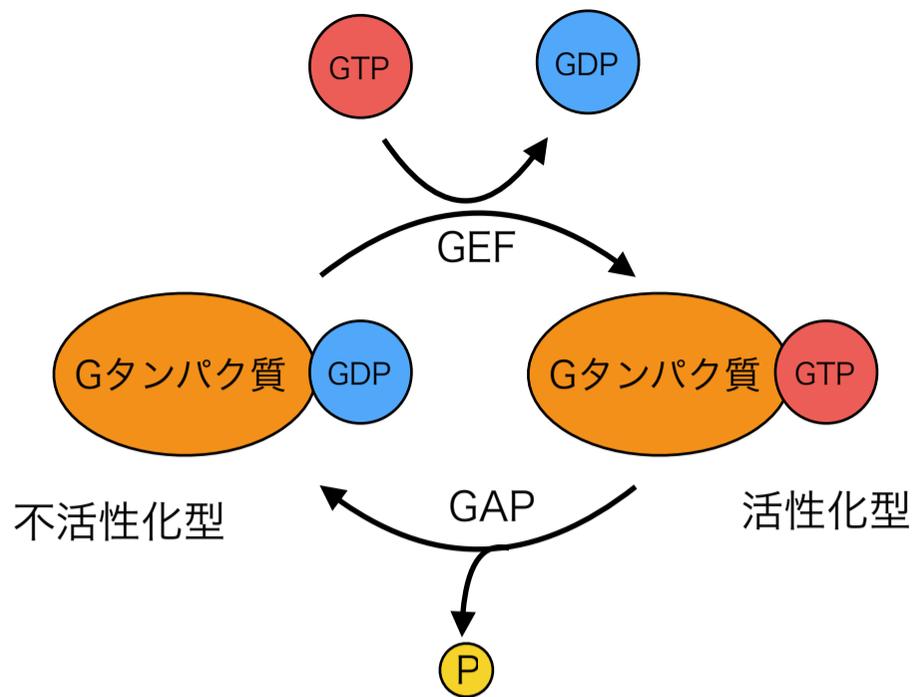


図14 Vps9d1はRab5-GEFとして機能する

(上)低分子量Gタンパク質の活性化/不活性化のモデル

(下)Vps9d1がRab5-GEFとして機能するかどうかをin vitro GEFアッセイにより確認した。蛍光物質Mantが付加されたMant-GDPはGタンパク質と複合体を形成すると構造変化により蛍光強度が増大する。Mant-GDPをロードしたRab5とVps9d1をインキュベーションし、GTPとの交換を蛍光の減少によって測定した。Rin1はポジティブコントロールとして用いた。

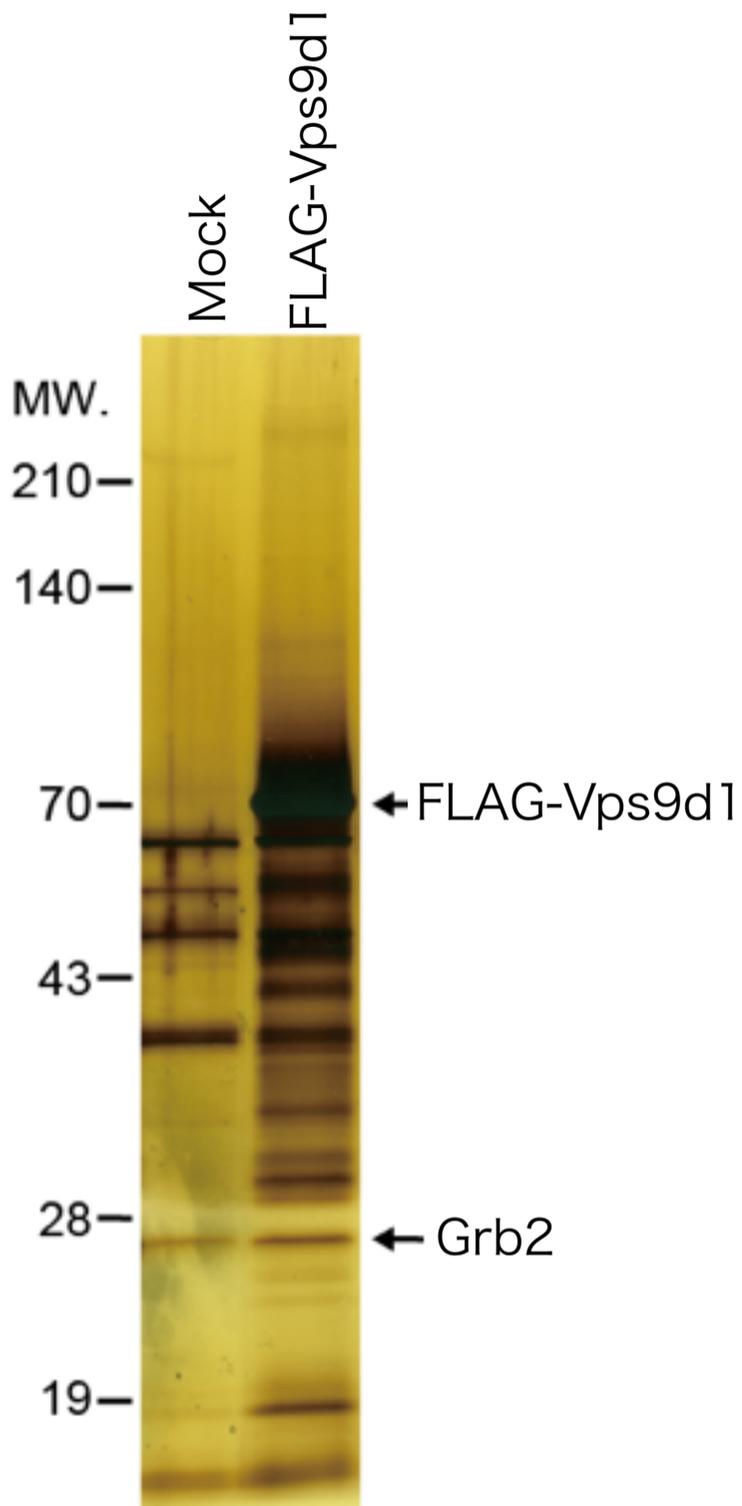


図15 MSによるVps9d1結合タンパク質の探索

(左)HEK293細胞にFLAG-Vps9d1を強制発現し、FLAG抗体によって免疫沈降した。沈降物をSDS-PAGEによって展開し、銀染色を行った。Mockを強制発現したHEK293の沈降物と比較し、FLAG-Vps9d1を発現した時にのみ見られるバンドを切り出し、MS解析によって同定した。

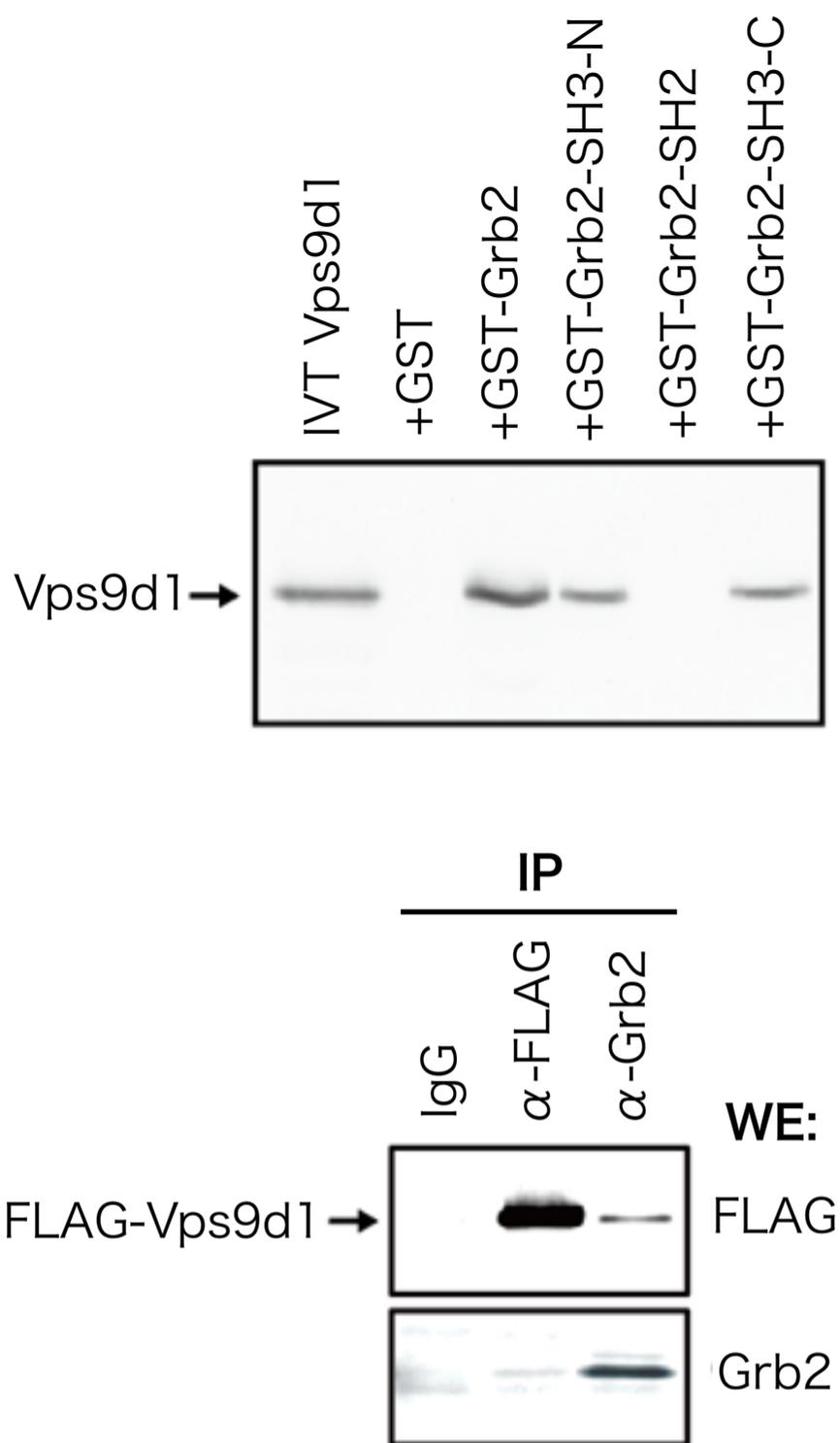


図16 Vps9d1はGrb2と結合する

(上)Vps9d1とGrb2との結合をGST pull-downアッセイによって検討した。大腸菌で作成したGSTタンパク質とin vitro translation(IVT)により合成したVps9d1を混ぜ合わせ、pull-downを行った。pull-down産物をSDS-PAGEによって展開し、ウェスタンブロット解析によって検出した。Grb2全長及びN末SH3ドメイン、C末DH3ドメインを用いてpull-downした時のみVps9d1が検出された。

(下) in vivoにおけるVps9d1とGrb2との結合を免疫沈降によって検討した。HEK293細胞にFLAGタグを融合したVps9d1を強制発現した。ライセートをFLAG抗体、Grb2抗体を用いて免疫沈降し、沈降物をSDS-PAGEで展開後ウェスタンブロットによって検出した。

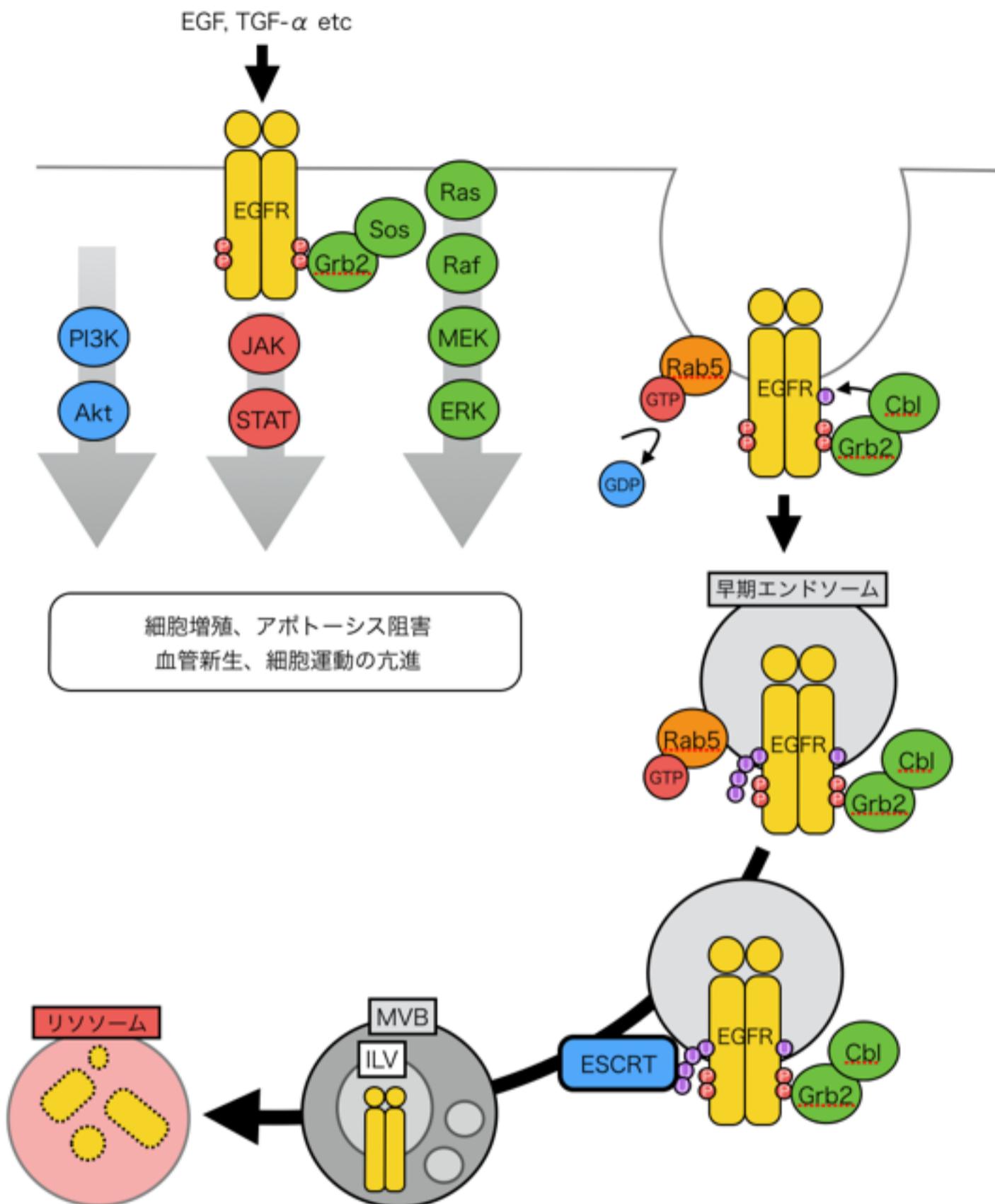


図17 EGFシグナルの活性化とEGFRの分解の機構

リガンド刺激を受けたEGFRは2量体化し、自己リン酸化により活性化される。活性化したEGFRは細胞内にMAPキナーゼカスケード、JAK/STATシグナル、PI3Kシグナルを伝える。リガンドによりEGFRが活性化されるとRab5は分子スイッチとして働き、EGFRが早期エンドソームへと取り込まれる。Grb2はSH2ドメインを介してリン酸化されたEGFRに結合する。さらにSH3ドメインを介してCblと結合する。CblはEGFRをユビキチン化する。EGFRはさらにポリユビキチン化を受け、endosomal sorting complex required for transport(ESCRT)に認識される。ESCRTの会合にともないエンドソームは多胞体(MVB)へと成熟し、EGFRは小胞内小胞(ILV)に取り込まれ、EGFシグナルがオフになる。MVBはリソソームと融合し、EGFRが分解される

FLAG-Vps9d1

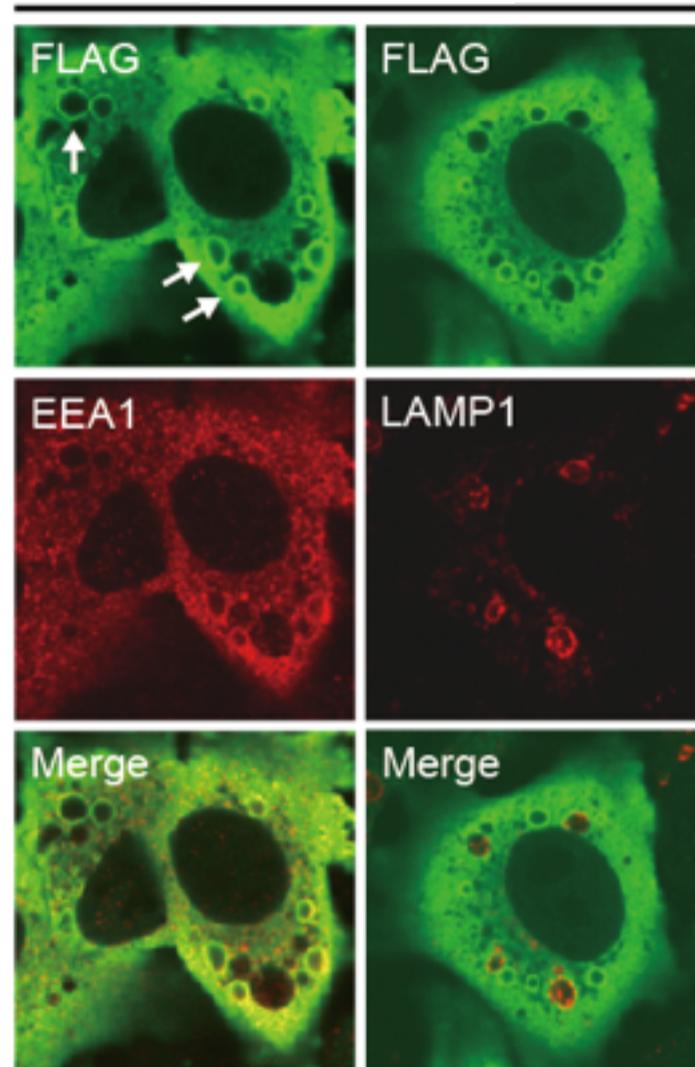


図18 Vps9d1は早期エンドソームに局在する

HEK293細胞にFLAGタグを融合したVps9d1を強制発現した。細胞を固定後FLAG抗体、EEA1抗体、LAMP1抗体を用いて免疫染色し、蛍光により局在を検出した。EEA1は早期エンドソーム、LAMP1は後期エンドソーム及びリソソームのマーカータンパク質として用いた。

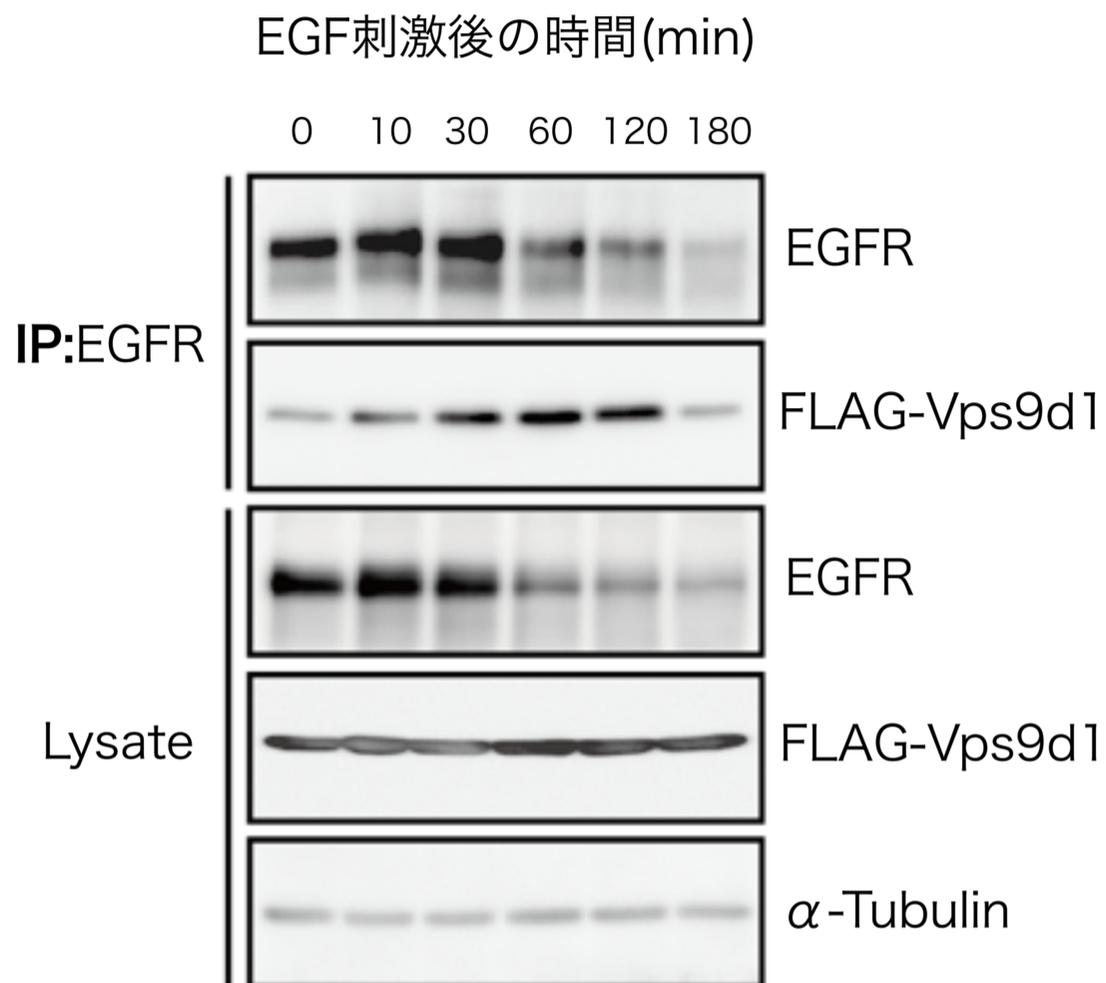


図19 EGF刺激によりVps9d1とEGFRとの結合が増加する

HEK293細胞にFLAGタグを融合したVps9d1を強制発現した。EGF(100ng/ml)で刺激した後に細胞を回収し、ライセートをEGFR抗体を用いて免疫沈降し、沈降物をSDS-PAGEで展開後ウェスタンブロットによって検出した。

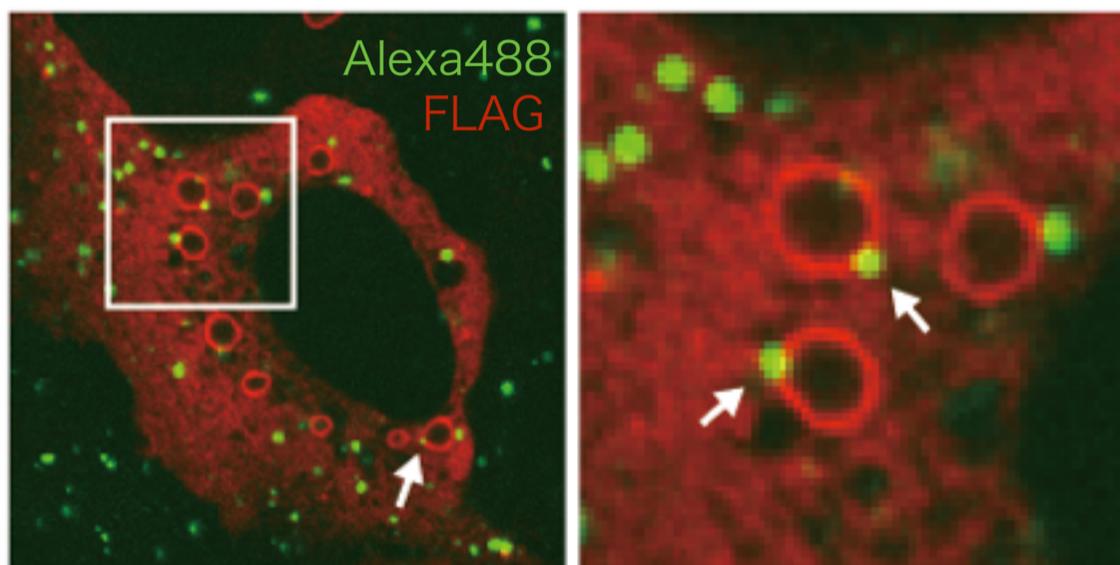
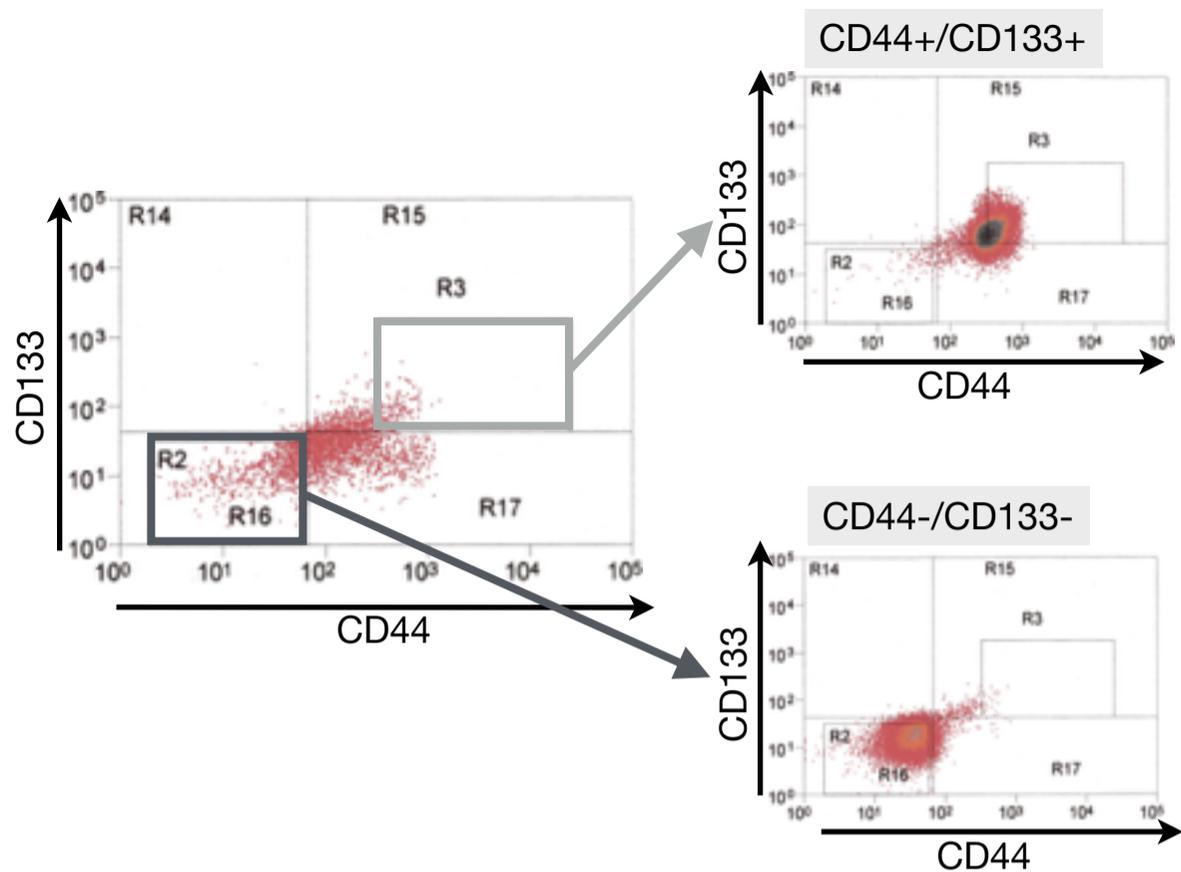


図20 Vps9d1はエンドサイトーシスにより取り込まれた
EGFと共局在する

HEK293細胞にFLAGタグを融合したVps9d1を強制発現した。Alexa488-EGFで刺激した30分後に細胞を固定し、FLAG抗体を用いて免疫染色した。
赤:FLAG(Vps9d1)、緑:Alexa488(EGF)



	CD44-/CD133-	CD44+/CD133+
30cells	0/3	0/3
100cells	1/6	2/6
300cells	1/6	5/5
1000cells	1/3	3/3

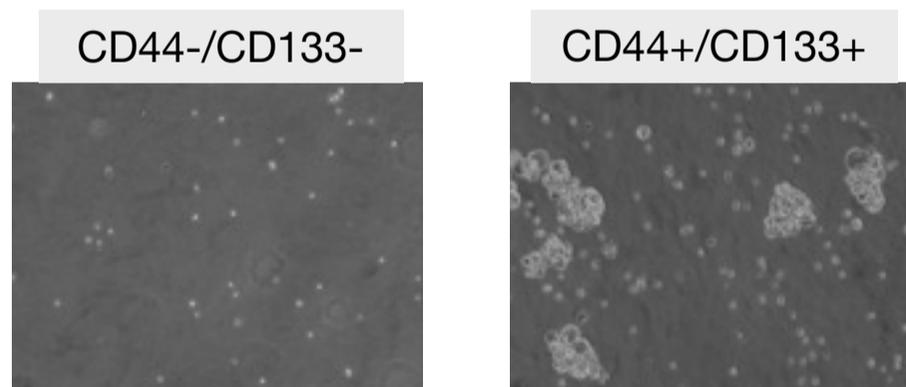


図21 CD44+/CD133+細胞は癌幹細胞用の性質を示す

(上)大腸癌検体由来細胞からのFACSソート

(中)CD44-/CD133-細胞とCD44+/CD133+細胞の造腫瘍性の確認を行った。免疫不全マウスの皮下に表に示した数の細胞を移植し、1ヶ月後に腫瘍が形成されたマウスの数を示した。

(下)CD44-/CD133-細胞とCD44+/CD133+細胞を無血清培地を用いて浮遊培養し、1週間後に観察した。

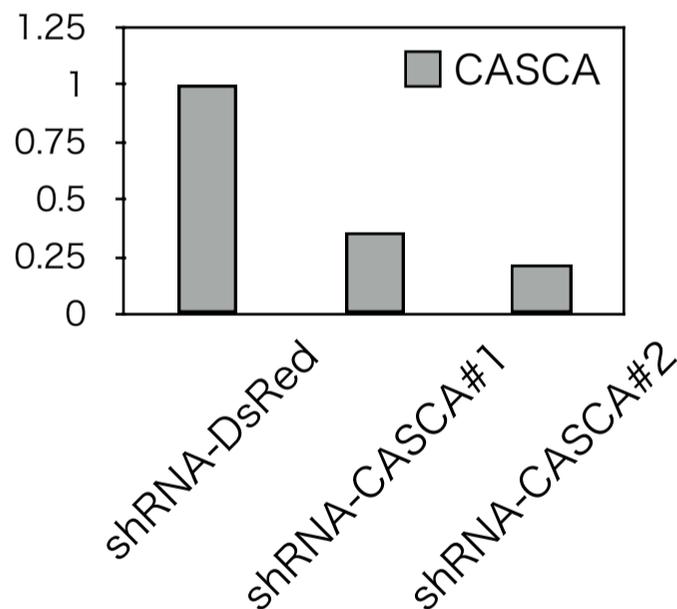
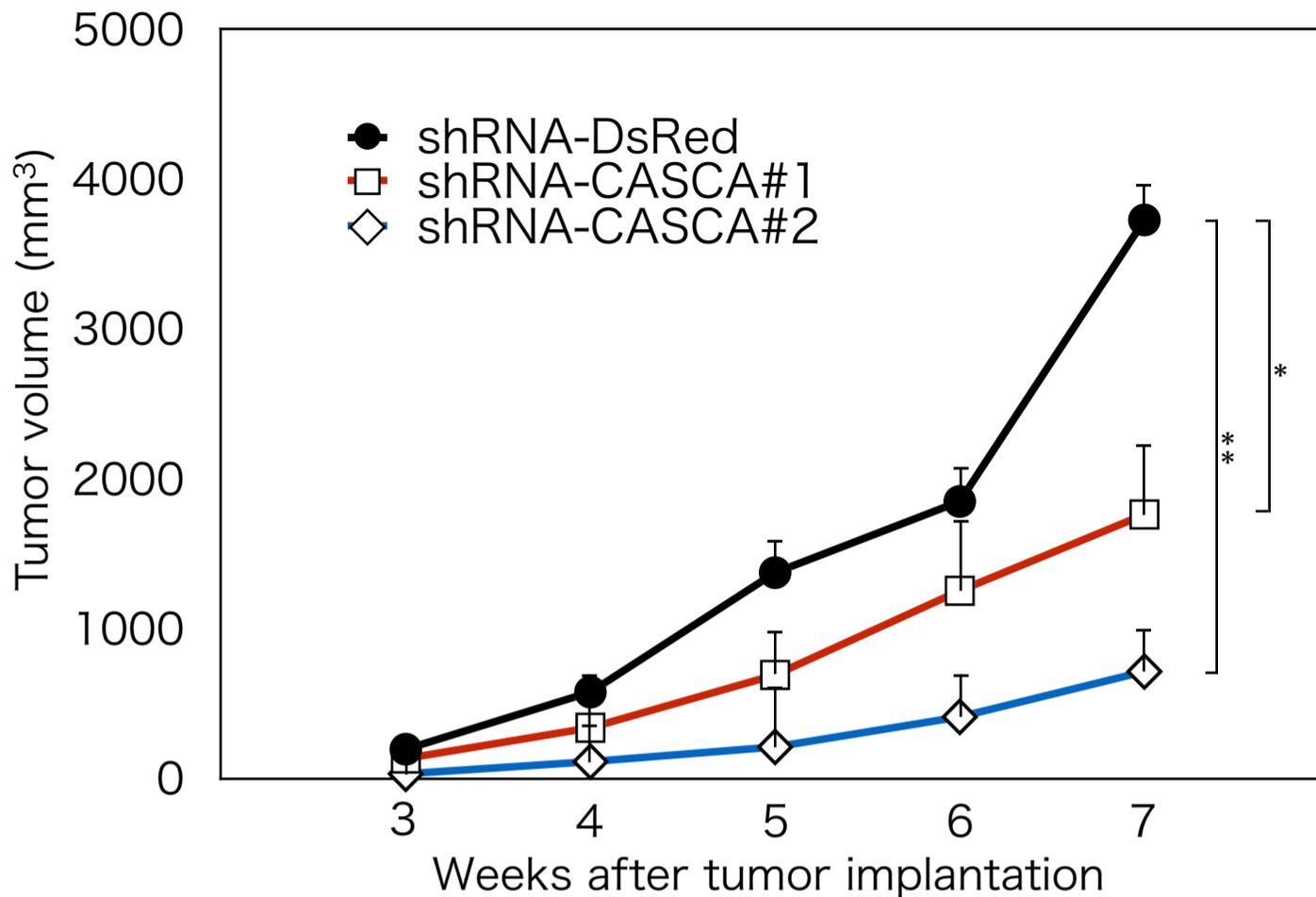


図22 CASCAのノックダウンは大腸癌の腫瘍形成能を抑制する

(上)DsRed、CASCAに対するshRNAを用いて発現を抑制したHCT116細胞を免疫不全マウスの皮下に移植した。マウス1匹当たり1000細胞を移植し、3週目から腫瘍サイズを計測した。DsRedに対するshRNA(shRNA-DsRed)はコントロールとして用いた。(n=6/各遺伝子) *P<0.05,**P<0.01

(下)各shRNAを用いて発現を抑制したHT29細胞におけるKD効率を示した。shRNAを感染後5日後の遺伝子の発現をqRT-PCRを用いて解析した。GAPDHをインターナルコントロールとして用いた。

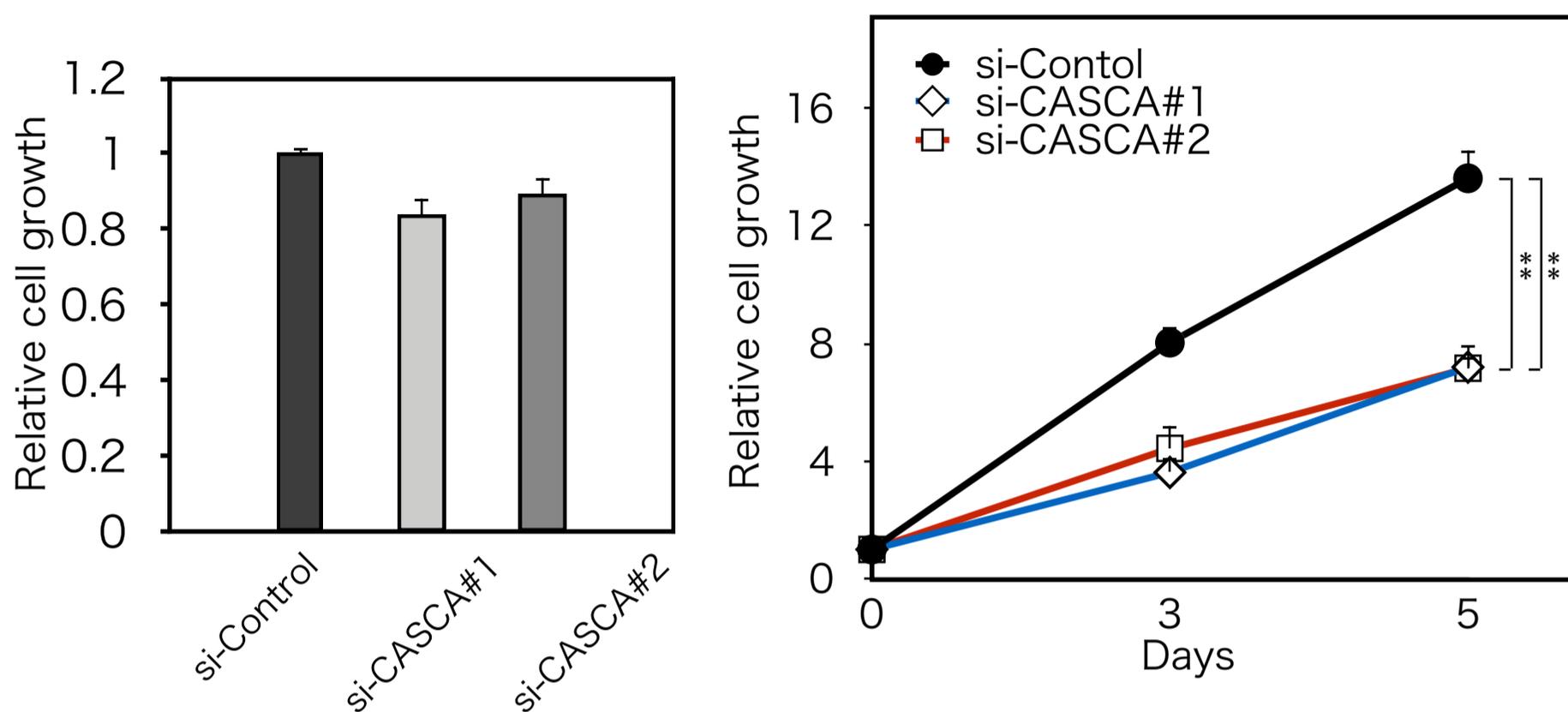


図23 CASCAのノックダウンはHCT116細胞の無血清三次元培養下における増殖を抑制する

(左)HCT116細胞においてCASCAに対するsiRNAを用いて発現を抑制し平面培養した。72時間後の細胞の増殖を細胞増殖測定試薬Cell Tite-Gloを用いて測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用い、コントロールに対する割合で示した。(n=4)

(右)CASCAに対するsiRNAを用いて発現を抑制したHCT116細胞をマトリゲルに包埋し無血清三次元培養を行い、Cell Titer-Gloを用いて増殖を測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用いた。(n=3)

**P<0.01

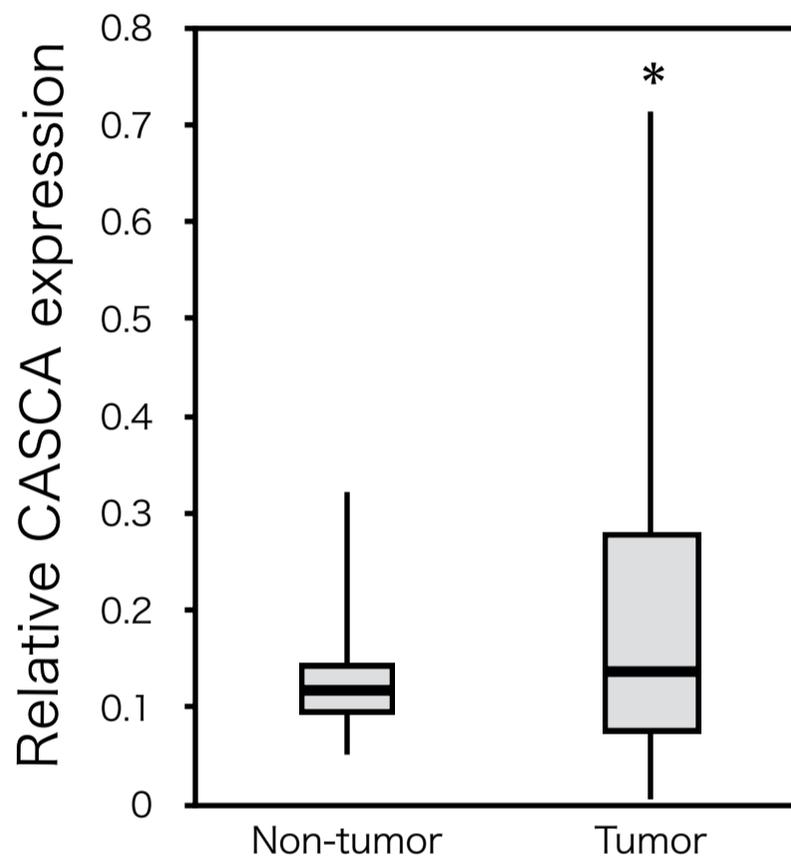


図24 CASCAは大腸癌細胞において発現が高い

大腸癌検体の正常組織部分と癌病変部位における各遺伝子の発現量をqRT-PCRによって解析し、Actinに対する発現量の割合を表した。(n=28) *P<0.05

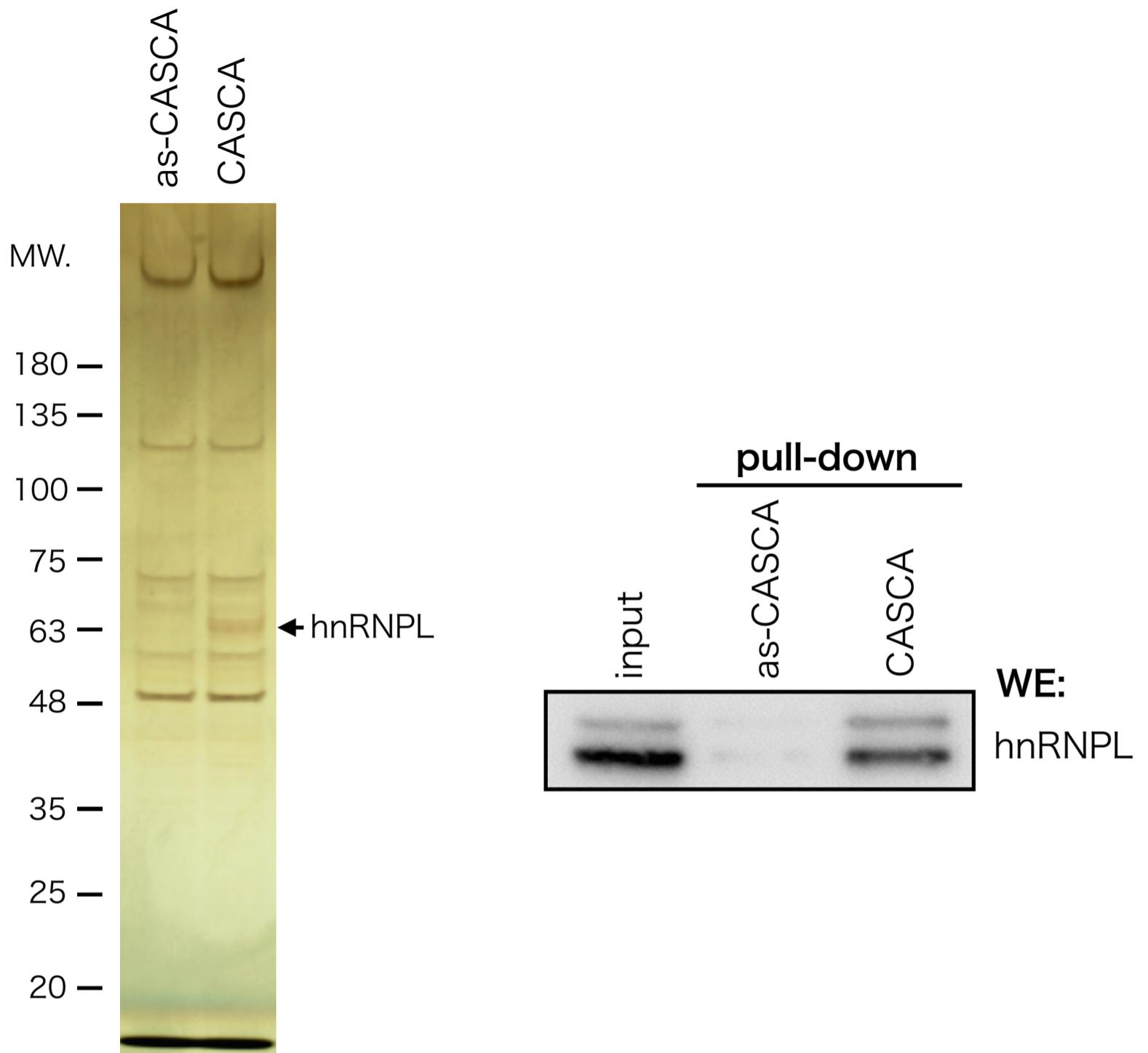


図25 MS解析によるCASCA結合タンパク質の探索

(左)in vitro transcriptionによって合成したCASCAセンス鎖及びアンチセンス鎖(as-CASCA)を用い、DLD-1細胞抽出液と混合しpull-downを行った。pull-down産物をSDS-PAGEによって展開し、銀染色を行った。as-CASCAによるpull-down産物と比較し、CASCAセンス鎖によってpull-down産物においてのみ見られるバンドを切り出し、MS解析によって同定した。

(右)in vitro translationにより合成したas-CASCA及びCASCAを用いてDLD-1細胞抽出液からpull-downを行った。pull-down産物をSDS-PAGEにより展開し、ウェスタンブロットによりhnRNPLのタンパク量を測定した。

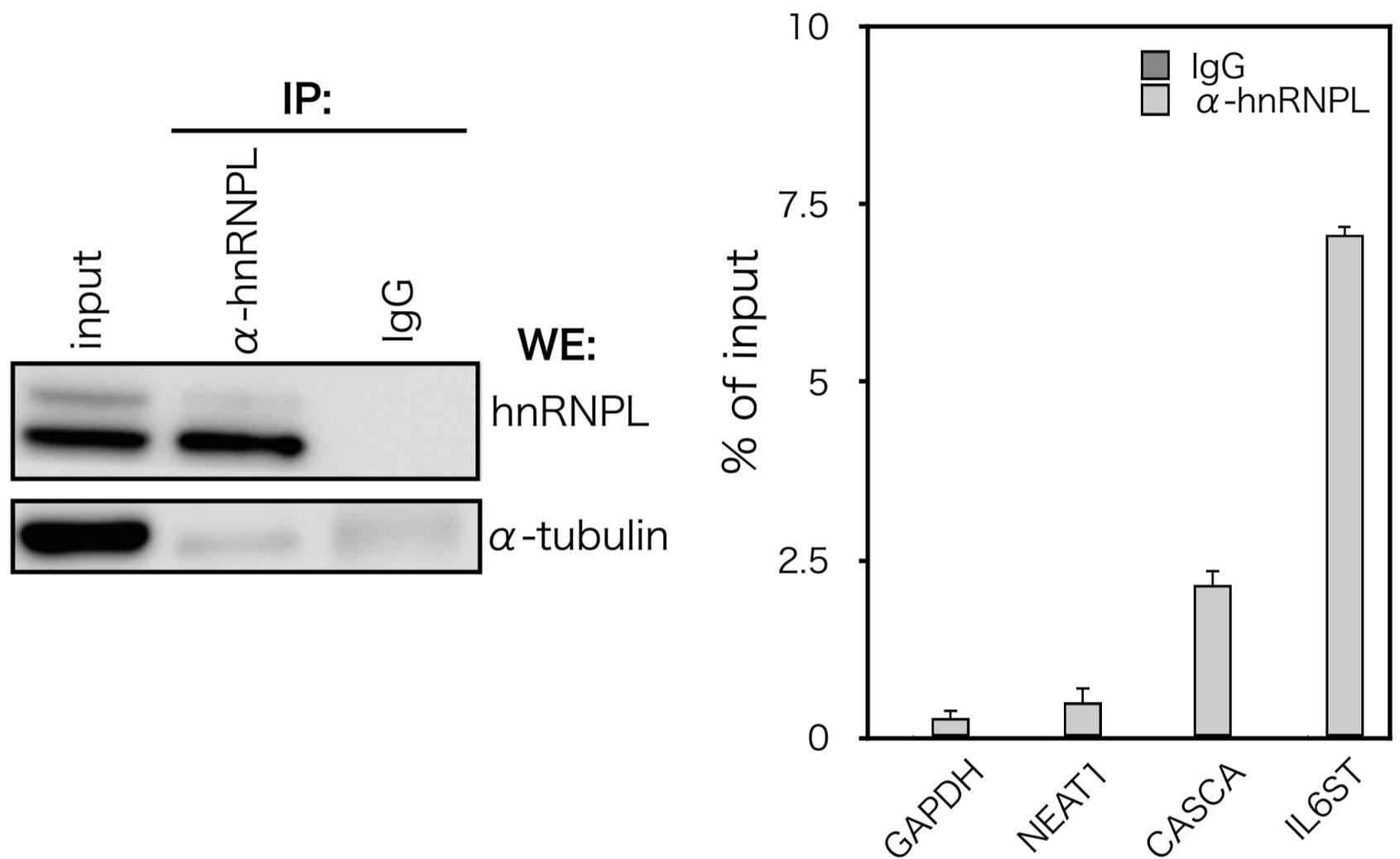


図26 CASCA及びIL6ST mRNAは細胞内において
hnRNPLに結合する

HCT116細胞抽出液からIgGまたはhnRNPL抗体によって免疫沈降を行った。沈降物からRNAを回収し、hnRNPLと結合するRNAをqRT-PCRにより測定した。GAPDH及びNEAT1はネガティブコントロールとして用いた。(n=3)

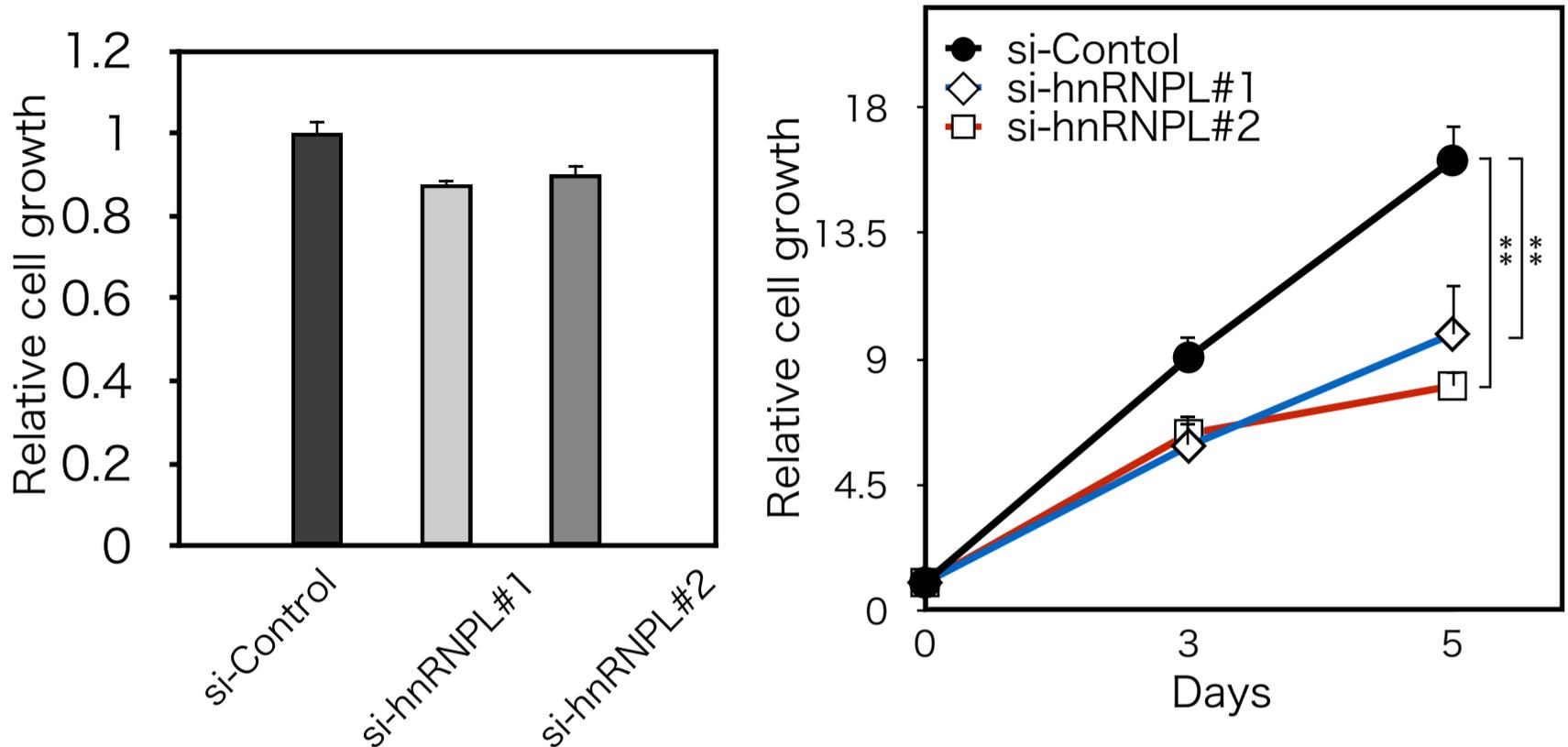


図27 hnRNPLのノックダウンはHCT116細胞の無血清三次元培養下における増殖を抑制する

(左)HCT116細胞においてhnRNPLに対するsiRNAを用いて発現を抑制し平面培養した。72時間後の細胞の増殖を細胞増殖測定試薬Cell Tite-Gloを用いて測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用い、コントロールに対する割合で示した。(n=3)

(右)hnRNPLに対するsiRNAを用いて発現を抑制したHCT116細胞をマトリゲルに包埋し無血清三次元培養を行い、Cell Titer-Gloを用いて増殖を測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用いた。(n=3)

**P<0.01

FC ([si-CASCA#1] vs [si-Control])	FC ([si-CASCA#2] vs [si-Control])	gene_assignment
-3.333	-2.454	IGLJ5 // immunoglobulin lambda joining 5 (non-functional)
-3.154	-2.116	IL6ST // interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
-2.881	-1.743	B4GALT6 // UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6
-2.713	-2.165	ENST00000516793
-2.518	-1.518	LOC100288637 // OTU domain containing 7A pseudogene
-2.504	-2.335	MIR54802 // microRNA 548o-2
-2.486	-1.787	STARD4 // StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
-2.211	-2.027	RN5S405 // RNA, 5S ribosomal 405
-2.125	-1.585	ENST00000458882
-2.125	-1.829	TCONS_00025860-XLOC_012138
-2.110	-1.558	LOC100652779 // uncharacterized LOC100652779
-2.101	-2.000	ENST00000516973
-2.023	-1.763	CASC5 // cancer susceptibility candidate 5
-2.011	-1.887	ZNF714 // zinc finger protein 714
-1.898	-2.597	ENST00000408589
-1.895	-1.741	IGHV1OR15-9 // immunoglobulin heavy variable 1
-1.827	-1.900	RBMS1 // RNA binding motif, single stranded interacting protein 1
-1.785	-2.113	PHTF1 // putative homeodomain transcription factor 1
-1.779	-1.825	PRR11 // proline rich 11
-1.751	-2.342	SNORA80B // small nucleolar RNA, H/ACA box 80B
-1.728	-1.655	TMEM41B // transmembrane protein 41B
-1.683	-1.785	NBR2 // neighbor of BRCA1 gene 2 (non-protein coding)
-1.682	-1.885	TCONS_00001387-XLOC_000701
-1.671	-1.748	COMMD2 // COMM domain containing 2
-1.654	-1.614	POLQ // polymerase (DNA directed), theta
-1.646	-1.737	RACGAP1P // Rac GTPase activating protein 1 pseudogene
-1.644	-1.623	DIAPH3 // diaphanous homolog 3 (Drosophila)
-1.630	-1.536	TCONS_00006853-XLOC_002654
-1.629	-1.811	GALNT3 // UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)
-1.628	-1.517	LOC100505865 // uncharacterized LOC100505865 CASCA
-1.536	-1.729	ENST00000410344
-1.535	-1.664	AXL // AXL receptor tyrosine kinase
-1.531	-1.594	MIR3916 // microRNA 3916
-1.506	-1.560	TCONS_00019368-XLOC_009191

図28 Microarray解析を用いたCASCA下流遺伝子の探索

HCT116細胞においてsi-CASCA#1、si-CASCA#2を用いてCASCAをノックダウンし、48時間後にRNAを回収しマイクロアレイ解析を行った。si-Controlと比較し、2配列でFoldChangeが-1.5以下の遺伝子を表に示した。

FC ([si-CASCA#1] vs [si-Control])	FC ([si-CASCA#2] vs [si-Control])	gene_assignment
4.349	2.051	ENST00000408207
4.055	1.564	ENST00000390822
3.625	3.074	ENST00000410413
3.214	1.567	HLA-DRA // major histocompatibility complex, class II, DR alpha
2.474	2.522	TCONS_I2_00011108-XLOC_I2_005997
2.468	2.768	MIR3189 // microRNA 3189
2.345	1.514	BTG2 // BTG family, member 2
2.315	1.698	HLA-DRA // major histocompatibility complex, class II, DR alpha
2.277	2.504	ENST00000385573
2.275	1.717	HLA-DRA // major histocompatibility complex, class II, DR alpha
2.192	2.330	RN5S46 // RNA, 5S ribosomal 46
2.156	2.064	RNU6ATAC5P // RNA, U6atac small nuclear 5, pseudogene
2.119	2.303	GDF15 // growth differentiation factor 15
2.101	1.988	ABCA12 // ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12
2.083	1.702	RN5S90 // RNA, 5S ribosomal 90
2.068	1.852	ENST00000516217
1.965	2.113	---
1.954	1.620	ZNF474 // zinc finger protein 474
1.861	1.647	PAM // peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
1.855	1.615	TCONS_00022238-XLOC_010542
1.831	1.525	TCONS_I2_00022830-XLOC_I2_011987
1.799	1.907	ENST00000459056
1.797	2.153	ENST00000364172
1.751	1.833	CAPN3 // calpain 3, (p94)
1.703	1.765	LOC401127 // WD repeat domain 5 pseudogene
1.658	1.542	LRR37A3 // leucine rich repeat containing 37, member A3
1.642	1.733	RPIA // ribose 5-phosphate isomerase A
1.575	1.732	ULBP1 // UL16 binding protein 1
1.551	1.964	SNORD37 // small nucleolar RNA, C/D box 37
1.548	1.656	AK097184
1.547	1.548	TM7SF2 // transmembrane 7 superfamily member 2
1.509	2.144	DMGDH // dimethylglycine dehydrogenase

図28 Microarray解析を用いたCASCA下流遺伝子の探索

HCT116細胞においてsi-CASCA#1、si-CASCA#2を用いてCASCAをノックダウンし、48時間後にRNAを回収しマイクロアレイ解析を行った。si-Controlと比較し、2配列でFoldChangeが1.5以上の遺伝子を表に示した。

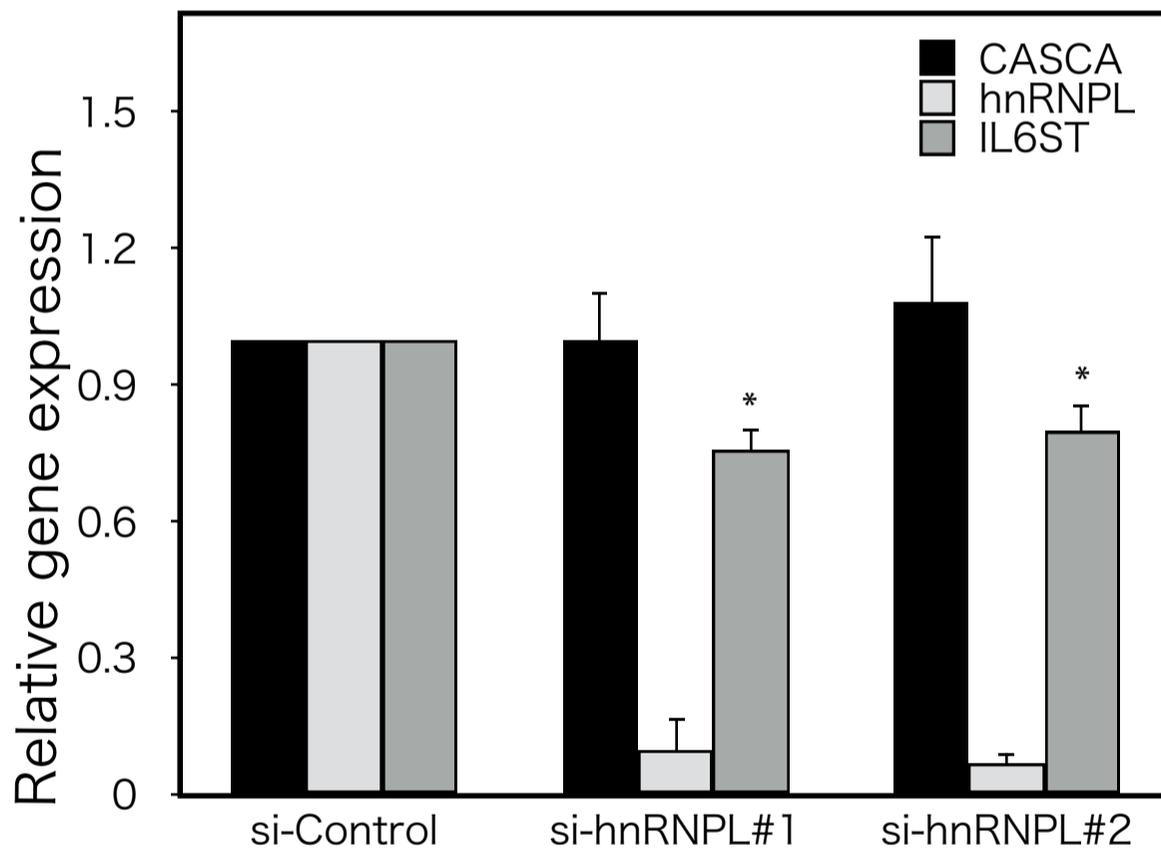
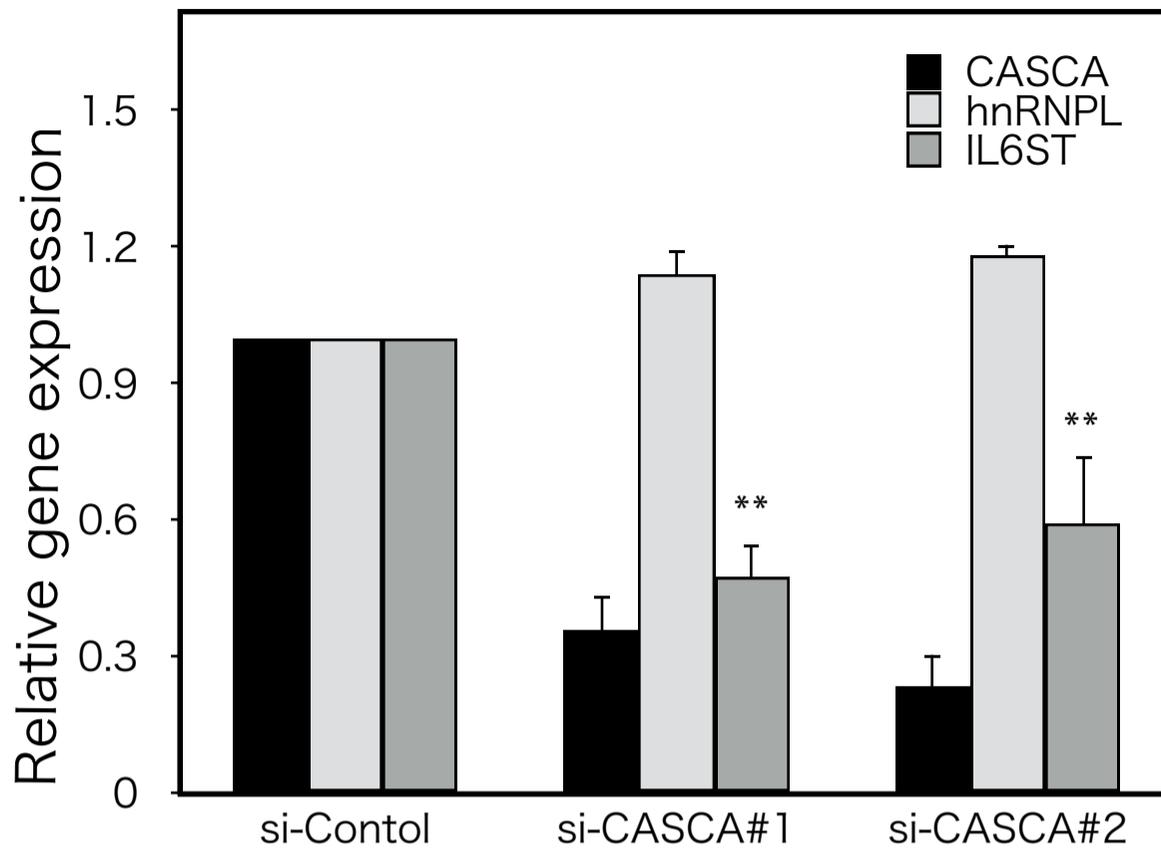


図29 CASCA及びhnRNPLの発現抑制はIL6STの発現低下を引き起こす

HCT116細胞においてsiRNAを用いてCASCAまたはhnRNPLのノックダウンを行い、72時間後のIL6STの発現量をqRT-PCRによって解析した。GAPDHをインターナルコントロールとして用いた。(n=3)*P<0.05,**P<0.01

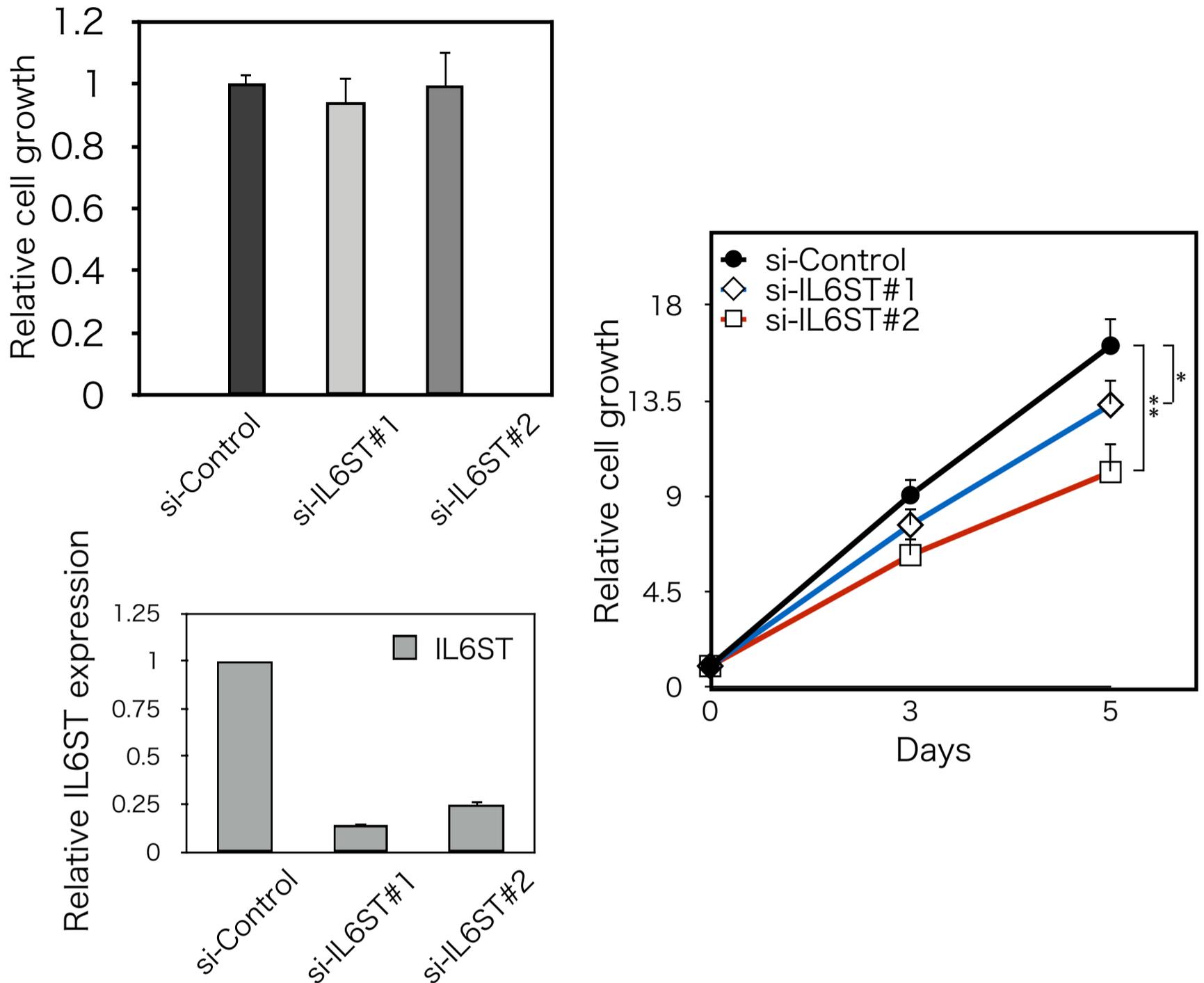


図30 IL6STのノックダウンはHCT116細胞の無血清三次元培養下における増殖を抑制する

(左上)HCT116細胞においてIL6STに対するsiRNAを用いて発現を抑制し平面培養した。72時間後の細胞の増殖を細胞増殖測定試薬Cell Tite-Gloを用いて測定した。Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用い、コントロールに対する割合で示した。(n=3)

(左下)HCT116細胞におけるIL6STに対するsiRNAのKD効率を表した。(n=3)

(右)IL6STに対するsiRNAを用いて発現を抑制したHCT116細胞をマトリゲルに包埋し無血清三次元培養を行い、Cell Titer-Gloを用いて増殖を測定した。

Negative control配列のsiRNA(si-Control)をコントロールとして用いた。

(n=3) *P<0.05**P<0.01

Wnt/ β -cateninシグナル

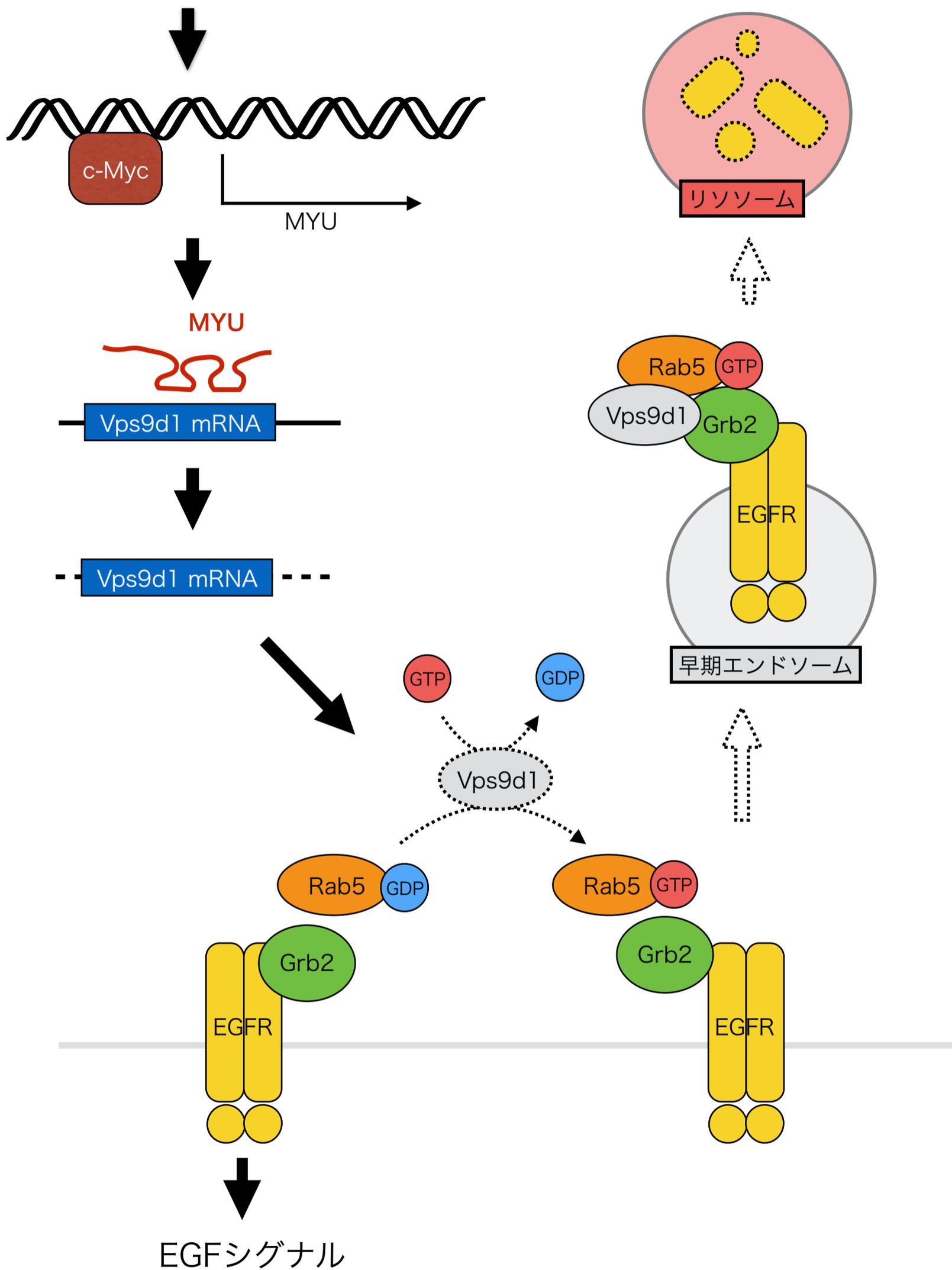


図31 Wnt/ β -cateninシグナルがMYUの発現調節を介してEGFシグナルを制御するモデル図