

論文の内容の要旨

論文題目

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)

氏名 宮本昌弥

大腸癌は欧米諸国で多く見られる癌であるが、近年は日本においても罹患率、死亡率が上昇してきている。大腸癌の発症に関わる遺伝子変異や、多段階発癌モデルの研究が進められ、大腸癌治療法も着実に進歩を続けている。しかしながら、転移や再発をとめない悪性化した大腸癌を根治する治療法はなく、大腸癌の腫瘍形成能を抑制する薬剤の開発は重要な課題である。近年、次世代シーケンズ技術の発展とともに大規模なトランスクリプトーム解析がすすめられた結果、タンパク質をコードしていない遺伝子領域においても 8 割以上が転写されていることが明らかになった。中でも長鎖ノンコーディング RNA(long non-codingRNA / lncRNA)はこれまでに数千種類が発見されているが、そのほ

とんどにおいて機能が明らかにされていない。ゲノム DNA において大きな割合を占めている lncRNA の解析によって、これまで明らかにされなかった未知の生命現象を解き明かすができる可能性があると考えられる。本研究では大腸癌の腫瘍形成能に関わる新たな lncRNA の探索と機能解析を行った。

c-Myc 標的 lncRNA の探索と機能解析

Wnt/ β -catenin シグナルの異常な亢進は大腸癌の発症を引き起こす。中でも c-Myc は細胞の癌化に関わる最も重要な Wnt 標的遺伝子の一つである。しかしながら c-Myc の過剰発現が大腸癌の腫瘍形成能を高める分子機構については未だ不明な点が多い。本研究では Wnt/ β -catenin シグナルの下流因子であり、尚且つ c-Myc が直接制御する lncRNA の探索を行い、Myc-upregulated lncRNA/Myu を同定した。Myu の発現抑制は大腸癌の腫瘍形成能を顕著に低下させた。このことから、Myu が c-Myc の大腸癌発症機構の一端を担い、大腸癌の腫瘍形成能をに重要であること示唆された。Myu 遺伝子はゲノム DNA 上で Vps9d1 遺伝子の相補鎖に位置するアンチセンス RNA であった。アンチセンス RNA はその相補する遺伝子の制御に関わることが多く報告されている。Myu が Vps9d1 の発現に与える影響を検討した結果、Myu は Vps9d1 の内在性アンチセンス RNA として機能し、その発現を負に制御していることを明らかにした。Vps9d1 は機能未知の新規タンパク質であったため、さらなる解析を行った。ドメイン構造解析により、Vps9d1 が GTP 結合タンパク質 Rab5 ファミリーの GDP/GTP 交換因子(GEF)として機能する可能性が考えられた。in vitro GEF アッセイを行った結果、Vps9d1 が Rab5 選択的な GEF として機能することを明らかにした。さらに Vps9d1 の結合タンパク質の探索を行い、Vps9d1 結合タンパク質として、増殖因子受容体に結合するアダプタータンパク質 Grb2 を同定した。本研究により、c-Myc 標的 lncRNA Myu が Vps9d1 の発現制御すること、及び大腸癌の腫瘍形成能に関わっていることが示唆された。

癌幹細胞関連 lncRNA の探索

近年、癌は均一な細胞によって構成されるのではなく、正常組織のように幹細胞を頂点とする階層性が存在していることが明らかにされてきた。癌組織において一部の「癌幹細胞」のみが強い腫瘍形成能を持ち、再発や転移の原因となることが示唆されている。このことから、癌幹細胞こそが癌の根治につながる標的であると考えられている。そこで大腸癌幹細胞において発現が高い lncRNA の探索を行い得られた、lncRNA を手掛かりとして大腸癌の腫瘍形成機構を解明することを目的とした。大腸癌検体由来細胞から CD44+/CD133+細胞と CD44-/CD133-細胞を分離した。既存の報告にあるように、CD44+/CD133+細胞は癌幹細胞様の性質を示した。次世代シーケンサーを用いて CD44+/CD133+細胞と CD44-/CD133-細胞のトランスクリプトームを網羅的に解析し、CD44+/CD133+細胞において発現が高い遺伝子を絞り込んだ。さらに CD44+/CD133+細胞で高発現する lncRNA を対象に RNAi スクリーニングを行い、大腸癌の腫瘍形成能に関わる新規 lncRNA、Colon cancer stem cell associated / CASCA を見出した。大腸癌細胞株において CASCA をノックダウンすると、三次元培養した際の増殖と、免疫不全マウスに移植した際の腫瘍形成能が抑制された。ノンコーディング RNA が単体で機能する報告例は少なく、ほとんどはタンパク質と複合体を形成することで機能を発揮する。そこで CASCA に結合するタンパク質を探索するために、ビオチン化 RNA pull-down アッセイを行った。in vitro translation によってビオチン化した CASCA を合成し、細胞抽出液と混ぜ合わせ、ストレプトアビジンビーズを用いて pull-down した。得られた pull-down 産物を MS によって解析したところ、結合タンパク質として RNA 結合モチーフ RRM を 3 つ持つ RNA 結合タンパク質 heterogenous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNPL) を同定することに成功した。hnRNPL は多機能タンパク質であり、遺伝子の転写調節や RNA の安定

性制御に関わることが報告されている。hnRNPL をノックダウンすると、大腸癌細胞株を三次元培養した際の増殖が抑制された。また、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。これらのことから、CASCA と hnRNPL の複合体が三次元培養下における増殖に関わっていることが示唆された。さらに CASCA/hnRNPL 複合体に関わる増殖制御機構の全体像を明らかにするため、CASCA をノックダウンすることで変動する遺伝子をマイクロアレイによって解析した。得られた候補因子の中で hnRNPL のノックダウンによっても同時に発現が変動する遺伝子を絞り込み、CASCA/hnRNPL 複合体の下流因子として interleukin 6 signal transducer(IL6ST)を絞り込んだ。CASCA 及び hnRNPL をノックダウンすることにより IL6STmRNA の安定性が低下することを見出した。また、IL6ST のノックダウンによって、大腸癌細胞を三次元培養した際の増殖が抑えられた。これらの結果から、CASCA/hnRNPL 複合体が IL6STmRNA を安定化することにより大腸癌の腫瘍形成能を高めるメカニズムが示唆された。

本研究では 2 通りのアプローチにより、大腸癌の腫瘍形成能に関わる 2 つの lncRNA を同定することに成功した。すなわち Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子であり c-Myc が直接制御する Myu と、大腸癌幹細胞において高発現する CASCA である。Myu は Vps9d1 の内在性アンチセンス RNA として機能し、Vps9d1 の発現制御を通して大腸癌の増殖に寄与する可能性が示唆された。CASCA は hnRNPL と結合し、IL6ST の mRNA の安定性を制御することを示した。これらの新規 lncRNA の同定と、大腸癌の腫瘍形成能に関わる機能の解析は今後の大腸癌治療法のさらなる発展に貢献することができると考えられる。