

論文の審査の結果の要旨

氏名 宮本 昌弥

本論文では、大腸癌の発症に関わる non-coding RNA の探索を行い、①c-Myc の直接の標的遺伝子である MYU、②大腸癌幹細胞において高発現する CASCA の二つの新規 non-coding RNA を見出した。MYU の機能解析を行い、③MYU が機能未知タンパク質 Vps9d1 の発現を負に制御すること、④Vps9d1 がエンドサイトーシスを介した EGFR の分解機構に関わることを示し、MYU が EGF シグナリングの調節を担う可能性を示唆した。さらに CASCA の機能解析を行い、⑤CASCA が大腸癌の腫瘍形成能に関わること、⑥CASCA が RNA 結合タンパク質 hnRNPL と結合すること、⑦CASCA が IL6ST の発現を調節することを示した。

大多数の大腸癌において Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の異常亢進が起こっており、中でも癌遺伝子 c-Myc は細胞の癌化に関わるもっとも重要な Wnt/ β -catenin シグナル標的因子の一つであると考えられている。正常細胞においては c-Myc は厳密な発現制御を受けており、細胞の増殖、アポトーシス、分化、運動など様々な生命現象に関わっていることが示されている、しかしながら、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も多く残されている。本研究には次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析により、c-Myc の発現抑制によって発現が変動する因子を探索し、c-Myc の直接の標的遺伝子であり尚且つ大腸癌細胞の増殖に関わる新規 non-coding RNA、MYU を同定することに成功している。MYU はゲノム上において機能未知の遺伝子 Vps9d1 の相補鎖に存在している。MYU の siRNA による発現抑制、及び MYU の過剰発現を用いた実験によって、MYU が Vps9d1 の内在性アンチセンス RNA として機能し、MYU が Vps9d1 の発現を負に制御することを明らかにした。さらに本研究では Vps9d1 が持つ VPS9 ドメインに着目し、in vitro GEF アッセイにより Vps9d1 が G タンパク質 Rab5 の GEF(guanine-nucleotide exchange factor)として機能することを明らかにした。Rab5 は膜タンパク質のエンドサイトーシスによる取り込みにおける分子スイッチとして機能することが知られている。Vps9d1 の結合タンパク質の探索を行い、Vps9d1 がアダプタータンパク質 Grb2 と結合することを明らかにした。Grb2 は sz これらの結果から、MYU が Vps9d1 の発現制御を介して、EGF シグナリングの調節を担う可能性が示唆された。

がん組織は、自己複製能を持ち強い腫瘍形成能を備えるがん幹細胞と、分化や老化を起し増殖能を失うその他の非がん幹細胞から構成され、正常組織と同様に階層性を持つことが明らかになりつつある。さらにがん幹細胞は既存の抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示し、再発や転移の原因となることから、がん根治のためにはがん幹細胞を破壊することが必須である。本論文では大腸癌から大腸癌幹細胞の単離を行い、大腸癌幹細胞が濃縮された細胞群を得ることに成功してい

る。さらに得られた大腸癌幹細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析と RNAi スクリーニングを行い、大腸癌幹細胞において高発現する non-coding RNA として CASCA を同定した。CASCA の発現抑制により、HCT116 細胞を無血清三次元培養した際の増殖が抑制されたこと、及び HCT116 細胞を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ことから、CASCA は大腸癌の腫瘍形成能に強く関わりと考えられる。CASCA の機能解析のために、結合タンパク質の探索を行い、RNA 結合タンパク質 hnRNPL と CASCA が結合することを明らかにした。さらに CASCA を発現抑制した HCT116 細胞のマイクロアレイ解析によって下流遺伝子の探索を行い、66 個の遺伝子を下流候補として同定した。得られた下流候補因子の中から、発現抑制した際に HCT116 細胞の無血清三次元培養下における増殖を抑制する遺伝子として IL6ST を同定した。IL6ST は IL6 を含むサイトカインのコレセプターとして働き、JAK/STAT シグナルを活性化することが知られている。CASCA が IL6ST の発現を調節することで JAK/STAT シグナルを制御するメカニズムの存在が示唆された。

近年 non-coding RNA に関する多くの知見が報告されており、注目度の高い研究分野である。本論文では、大腸癌の腫瘍形成能に深く関与する 2 つの新規 non-coding RNA を同定することに成功している。さらに本研究は医療への応用を目指し、non-coding RNA の機能解析を行っている。c-Myc の直接の標的遺伝子として同定した MYU は、大腸癌においてのみだけでなく Wnt/ β -catenin シグナルや c-Myc の発現が亢進している疾患においても診断や治療の標的となる可能性が高い。また、癌幹細胞を用いたスクリーニングによって同定した CASCA は、大腸癌の腫瘍形成能に関わる機能を持つことが示唆されており、今後の研究の発展が期待できる。なお、本論文は川崎善博、日吉雅也、北山丈二、秋山徹との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。