

博士論文

大腸がんにおける

新規長鎖非コード RNA の機能解析

松村 厚佑

概要

転移や再発を起こしている大腸がんに対する有効な治療法が少なく、ステージが進行した大腸がんに対する新たな治療法の確立が必要とされている。

現在までのがん研究は専らタンパク質をコードする遺伝子に着目して行われてきた。しかし、近年タンパク質をコードしていないゲノムの大部分から長鎖の非コード RNA (lncRNA) が転写されていることが明らかとなってきた。しかしながら、がんにおける機能解析が試みられた lncRNA は限られており、大腸がんにおける lncRNA の作用メカニズムやその役割の全容は明らかになっていない。

本研究では、大腸がんで発現が亢進している新規がん lncRNA 遺伝子として *GSEC* (G-quadruplex forming sequence containing lncRNA) を同定し、RNAi 実験によって大腸がん細胞の運動能獲得において重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、*GSEC* は核酸の二次構造の一種である G-quadruplex を形成するドメインをもち、G-quadruplex を介して細胞運動能抑制作用を持つ DHX36 と結合してその機能を阻害するという作用メカニズムを解明した。

また、*GSEC* は *TGFB2* の発現を亢進することで腫瘍形成過程でも重要な役割を担っていることが見いだした。さらに、*GSEC* は DHX36 が関わる機構とは別の機能をもっており、hnRNPF と協調的に働くことで *TGFB2* の発現促進していることを示した。

以上の結果より lncRNA である *GSEC* が新規のがん遺伝子であると考えられた。

概要	2
目次	3
序論	4
結果	10
考察	20
材料と方法	24
引用文献	33
図と表	43
謝辞	70

序論

大腸がん

大腸がんは世界で 3 番目に患者数の多い悪性疾患である(1)。毎年 120 万人が新たに大腸がんと診断され、60 万人以上の患者が亡くなっている。American association for cancer research (AACR) によると大腸がん全患者の 5 年生存率は 65.2%である。一方で AACR が定める病状進行ステージ別に 5 年生存率をみると、転移を伴わないステージ I では 93.2%であるのに対して、遠隔転移を認めるステージ 4 では僅か 8.1%である。従って、進行した大腸がんに対する新たな治療法の開発が必要であるといえる。

腫瘍の不均一生

近年、腫瘍を構成する細胞は均一ではなく、一部の細胞のみが強い造腫瘍能を持つことが明らかとなってきた(2)。これらの細胞は自己複製能や多分化能といった正常の成体幹細胞と共通した特徴を持つことから、がん幹細胞と呼ばれる。治療後の残存がん幹細胞の再活性化が再発であり、がん幹細胞の遠隔臓器への生着が転移の本体であると考ええることで再発、転移のメカニズムを説明することが出来る。実際にがん幹細胞が再発や転移の原因であることを示唆する報告も存在する。つまり、がん幹細胞の撲滅というコンセプトは再発やステージが進行した大腸がんに対する有効な治療法となりうる可能性を秘めているといえる。

がん幹細胞の存在は急性骨髄性白血病での発見に始まり、大腸がんを含む固形腫瘍でもその存在が報告されてきた(2, 3)。大腸がんにおけるがん幹細胞の最初の報告の発見は Lucia らによってなされ、幹細胞マーカーである CD133 を用いることにより分離できるというものである(3)。その後、CD133、CD44 両方のマーカーを用いる方(4)、腸管上皮幹細胞マーカーである LGR5 を用いる方法が報告されている(5)。LGR5 に関しては、マウス前がん病変である腸管アデノーマにおいては、腫瘍に 5~10%含まれる LGR5 陽性細胞を頂点とした細胞階層が存在することが実験的に示されている(6)。当

研究室においても CD133、CD44 をマーカーとして用いることにより強い造腫瘍を持つ細胞群を単離することに成功している (Fig.1)。

長鎖非コード RNA (long non-coding RNA;lncRNA)

ゲノム中のタンパク質をコードする領域は約 2%にすぎないが、近年、ゲノムからタンパク質をコードしない膨大な数の RNA が転写されていることが明らかとなってきた (7, 8)。特に、長さが 200bp 以上であり、保存された ORF を持たないものは長鎖非コード RNA (long non-coding RNA ; lncRNA) と呼ばれている (9)。lncRNA はタンパク質と同様に生体内で機能性分子として振る舞い、発生、分化、細胞増殖、細胞周期、炎症、細胞運動、といった細胞プロセスおよび生理現象において重要な役割を果たしていることがハエ、酵母、マウスといったモデル動物やヒトで明らかにされてきた (10, 11, 9)。現在までの遺伝学、逆遺伝学、生化学、分子生物学的研究は専らタンパク質に着目されてきた。しかし、lncRNA に研究の焦点を当てる事で、タンパク質をコードする遺伝子に着目した解析ではメカニズムを明らかにすることが出来なかった生命現象を説明出来るようになってきた。例を挙げると X 染色体の不活化の分子機構はその代表といえる (12)。つまり、今後、タンパク質をコードする遺伝子だけでなく、遺伝子としての lncRNA に着目することで生命現象のより深い理解が可能になると思われる。

lncRNA の作用機序

microRNA と呼称される短い非コード RNA の大部分が RISC 複合体に取り込まれて機能を発揮するという画一的な作用メカニズムを持つものに対して、lncRNA は多種多様なタンパク質と複合体群を形成している (9, 13)。すなわち、lncRNA の作用機序は多岐にわたる。lncRNA の多くが核内に存在しており、その局在傾向は mRNA に比べて約 6 倍と考えられている。また、lncRNA の多くが転写因子やクロマチン構造変換因子と複合体を形成している事実から、lncRNA と転写のプロセスには密接な関係があると考えられてきた。実際、現在までに機能解析がなされた lncRNA は転写制御に関わるも

のが大半を占めている。しかしながら、近年、細胞質に局在する lncRNA も報告されており、タンパク質の翻訳後修飾や翻訳の制御に関与していることが報告されている(14–17)。

現在までに機能が明らかにされた lncRNA は依然として少数に限られているが、lncRNA の分子機能を便宜的に大別すると、特定のタンパク質を目的の位置にリクルートするガイド、タンパク質複合体形成のためのスキャフォールド、タタンパク質の翻訳後修飾制御、特定のタンパク質や microRNA に対するデコイ、などの機能に分ける事が出来る。以下にその詳細を記述する。

ガイド RNA

ガイド RNA は転写因子やクロマチン制御因子と結合し、特定の遺伝子座までリクルートしてくる働きを持つ。X 染色体の不活化に関わる lncRNA の Xist は良く研究されたガイド RNA の一つである(12)。通常ヒトにおいて女性は X 染色体を 2 つもっているが、性差における遺伝子発現パターンを調節するために片方が不活化されている。Xist は抑制型のヒストンコードである H3K27 トリメチル化を行うポリコーン抑制複合体 2 (PRC2) を X 染色体にリクルートすることで一方の X 染色体全体に抑制型のヒストン修飾を入れるのを仲介している(18)。他にも DNMT3b のリクルートに働く TTF-1、HoxA クラスターから転写され、その場に WDR5 をリクルートしてくる HOTTIP 等がある(19, 20)。ガイド RNA はいわば、転写因子の届け先を規定するための”アドレス”の様な存在である。ガイドタイプの lncRNA は標的遺伝子座の DNA 配列と DNA:RNA デュープレックスまたは、DNA:DNA:RNA トリプレックス を形成し、特定のクロマチン構造を認識することで標的部位への特異性を規定していると考えられている(21–23)。

スキャフォールド

スキャフォールド RNA はタンパク質複合体形成の足場として働くタイプの lncRNA

である。スキャフォールド RNA は複数のドメインを持っており、それらを介して同時に別々のエフェクタータンパク質と結合することができる。現在までに HOTAIR がスキャフォールド RNA として知られている。HOTAIR は 5'末端の 300 塩基で PRC2 複合体と結合しており、一方 3'末端の 700 塩基で LSD1、CoREST、REST といった抑制的なクロマチン構造変換因子を含む複合体と結合している(24)。その結果、協調的に機能して抑制的なクロマチン構造を形成する巨大な複合体の形成を仲介している。

デコイ RNA

タンパク質や microRNA の標的をミミックして本来の標的競合阻害するものがデコイ RNA である。Gas5 はグルココルチコイドの転写活性を抑制するデコイ lncRNA であるが、その作用機序は核内受容体であるグルココルチコイド受容体をトラップして標的遺伝子座 DNA へ結合を妨げるというものである(25)。Gas5 は RNA でありながら分子内で二本差を形成して、Glucocorticoid receptor (GR) の標的コンセンサス配列をミミックし、そのコンセンサス配列を介して GR をトラップする。また、デコイ RNA の標的はタンパク質に限らず、microRNA の標的 mRNA と競合するものも存在する。PTEN の偽遺伝子である PTENP1 は 3'UTR の一部が PTEN と同じであり、PTEN の 3'UTR に結合している microRNA を奪い取ることによって、PTEN の発現を上昇させている(26)。

タンパク質の翻訳後修飾に関わる lncRNA

結合タンパク質の翻訳後修飾に影響を与える lncRNA も報告されている。lncRNA-LET は NF90 のユビキチン化を抑制している(27)。また lncRNA-DC は樹状細胞において STAT3 のリン酸化を促進することで炎症応答に関与することが知られている(14)。また、lncRNA はタンパク質の安定化にも関与している。FAL1 は BMI1 の安定化を担っている(28)。

がん と lncRNA

いくつかの lncRNA はがんにおいて発現異常が起こっており、がん遺伝子または、がん抑制遺伝子としての機能を持っていることが示されつつある(27, 29–33)。僅かながら大腸がんにおいても造腫瘍性や、転移能、細胞増殖に関わる lncRNA が同定されてきたが、がん細胞における lncRNA が果たす役割については多くの不明な点が残されている(27, 28, 31, 34, 35)。

G-quadruplex

DNA や RNA 中のグアニン (G) に富む領域は G-quadruplex と呼ばれる特殊な二次構造を形成する。G-quadruplex は G の四量体により形成される面である G カルテットにから成り立っており、フーグスティーン結合により G カルテットが複数連なることで G-quadruplex となる(36)。G-quadruplex はフーグスティーン水素結合により維持されているため熱力学的に非常に安定している。

DNA、RNA 中の G-quadruplex は転写や転写後調節の場面で働き、遺伝子の発現調節に関わることが報告されている。核酸中に存在する G-quadruplex は単純に安定的な構造としての役割または、特定のタンパク質が結合するための目印として働く。DNA 中に存在する G-quadruplex は RNA polymerase が通過する際の立体障害となり転写に抑制的に働く(37)。さらに、特定の転写因子結合配列に被る様に G-quadruplex が存在する場合、転写因子がコンセンサス配列を認識出来ない様な立体構造へと変化させるのに一役買っている。一方で、XBP/XPD 等の G-quadruplex を認識して DNA に結合する転写因子も存在しており、転写因子のリクルートに働くこともある(37)。

RNA 中に存在する様な G-quadruplex も多様な機能を持っている。5'UTR に存在する G-quadruplex は Ribosomal footprinting による結果から、eIF4A の標的であることが示唆されている(38)。eIF4A は G-quadruplex を解きほぐすヘリカーゼ活性をもっており、5'UTR の G-quadruplex が解かれるとリボソームの結合が可能となり、結果として翻訳が促進される。3'UTR に存在する G-quadruplex の機能としてはポリアデニル化

やスプライシングおよび mRNA の安定性に関わることが知られている(39)。

以上を踏まえ、本研究では専らタンパク質をコードする遺伝子のみに着目されてきたがん研究領域に、新規がん遺伝子としての lncRNA という新たな切り口を与えることで、新しい発がん機構の発見を目指した。具体的には大腸がんにおいてがん遺伝子として働く新規 lncRNA の同定と、その機能解析を行い新規発がん経路の解明を試みた。

結果

新規発がん lncRNA の探索

新規 lncRNA : *GSEC* は大腸がんで発現が亢進している

まず、大腸がん幹細胞において発現の亢進している lncRNA を同定するために、CD133/CD44 陽性細胞と陰性細胞から mRNA を抽出し、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。解析によって得られたデータを使って、既到大腸がん幹細胞のマーカーであることが報告されている遺伝子群の発現を陽性細胞と陰性細胞で比較したところ、いずれの幹細胞マーカーも陽性細胞で高い発現量を示した (Fig.2)。従って、これらのデータセットを使って大腸がん幹細胞で高発現している因子の探索が可能であると考えた。次に、CD133/CD44 陰性細胞に比べ、CD133/CD44 陽性細胞において 3 倍以上発現の高い 29 個の lncRNA を絞り込んだ。

治療の標的を考える際、正常細胞でも発現している遺伝子やパスウェイを標的として薬剤で阻害すると、正常細胞の機能も障害してしまい副作用を引き起こす可能性がある。そのため、治療の観点から標的パスウェイを考えた場合、正常細胞とがん細胞の発現量の差が重要となってくる。そこで、29 個の lncRNA を正常腸管組織に比べ、大腸がん組織で発現亢進しているというクライテリアで更なる絞り込みを行った。正常組織と大腸がん組織の遺伝子発現データセットには TCGA および、GSE20916 を用いた。その結果、LOC100506054、FLJ39051 の 2 遺伝子を同定することに成功した (Fig.3)。2 つの内、*FLJ39051* について機能解析を行った。*FLJ39051* の細胞内局在を調べたところ、細胞質局在コントロールとして用いた *HPRT1* と同程度細胞質へ局在している傾向を示した (Fig. 4)。さらに、*FLJ39051* はアクセションナンバーのみの遺伝子であったため、後の機能解析から明らかとなった特徴に基づいて、*GSEC* (G-quadruplex forming sequence containing lncRNA) と命名した。最後に、マイクロアレイおよび RNA-seq のデータをバリデーションする目的で *GSEC* の発現量を大腸がん検体と近接

正常組織間で qRT-PCR を用いて比較したところ、大腸がんで発現が亢進していた (Fig.5)。

***GSEC*による大腸がん細胞の運動能亢進機構の解明**

*GSEC*の発現抑制によって大腸がん細胞の運動能が低下する

*GSEC*はがん検体で発現が亢進していることから、がん細胞において何らかの機能を担っている可能性が考えられた。*GSEC*の大腸がんにおける機能解析の足がかりを得る為に、TCGA データベースに登録されている大腸がん検体の遺伝子発現プロファイルを用いて、大腸がん 192 検体において *GSEC* の発現と正の相関を示す遺伝子群の GO 解析を行った。その結果、cell motion といった細胞運動に関する GO term が有為に出現した (Fig. 6)。この結果は *GSEC* の発現が高いがん検体では細胞運動のパスウェイが亢進していることを示唆していると考えられた。がんのホールマークの一つとして浸潤や転移といった性質が知られているが、これらのプロセスにはがん細胞の運動能が大きく関わっている。そこで、*GSEC*の発現抑制が、がん細胞の運動能へ与える影響を検討した。まず、DLD-1 大腸がん細胞株に *GSEC* に対する siRNA をトランスフェクションし、q-RT-PCR によって *GSEC* の発現量が低下していることを確認した。*GSEC* を発現抑制した細胞の運動能をトランスウェルアッセイによって評価したところ、コントロールの siRNA を導入した DLD-1 細胞に比べ、*GSEC* に対する siRNA をトランスフェクションした DLD-1 細胞は運動能が低下していた (Fig.7)。同様に大腸がん細胞株の SW480 を用いて実験を行っても、これらと似た結果が得られた (Fig.8)。さらに、wound healing assay でも *GSEC* の発現抑制が細胞運動能に与える影響を検証し、*GSEC* の発現抑制は運動能の低下を引き起こすという結果が得られた (Fig.8)。一方で、*GSEC* を発現抑制しても顕著な細胞増殖への影響はみられなかった。これらの結果から *GSEC* は大腸がん細胞の運動能に関与している可能性が示唆された。

GSEC 結合タンパク質の探索

lncRNA の多くはタンパク質との相互作用を介してその機能を発揮することが知られている(9, 13)。そこで、*GSEC*が大腸がん細胞の運動能を調節しているメカニズムを

明らかにする目的で、*GSEC* 結合タンパク質の探索を行った (Fig.9)。ビオチンラベルした全長の *GSEC* および、断片化した *GSEC* と細胞抽出液を混和し、ストレプトアビジンビーズを用いた pull-down 法によって *GSEC* を含む複合体を精製した。*GSEC* の細胞内局在を確認したところ *GSEC* は細胞質に局在するため、pull-down には分画した細胞質画分をもちいた (Fig.4)。また、コントロールとしてアンチセンス鎖の *GSEC* を用いた。pull-down 産物は SDS-PAGE で展開後、銀染色によって視覚化した。アンチセンスの *GSEC* に比べて全長のセンス鎖 *GSEC* 特異的にみられたタンパク質バンドを切り出し LC-MS/MS 解析に供した (Fig.9)。その結果センス鎖の *GSEC* を用いたサンプルで検出される *GSEC* 結合タンパク質として、DHX36 を見いだすことに成功した。

GSEC は DHX36 と結合する

MS 解析によって示唆された *GSEC* と DHX36 の結合を確認するために、ビオチンラベルした *GSEC* を用いてプルダウンしたサンプルのウェスタンブロッティングを行った。その結果、*GSEC* のセンス鎖を用いた pull-down 産物特異的にバンドが検出された (Fig.10)。さらに、DHX36 の結合部位を明らかにする目的で断片化した *GSEC* を用いてプルダウン実験を行ったところ、DHX36 は *GSEC* の 1-375 bp 領域に結合することが明らかとなった (Fig.10)。

次に、細胞内で内在性の *GSEC* と DHX36 が結合しているか、RIP assay によって解析を行った。Anti-DHX36 抗体を用いて細胞内における DHX36 と RNA の複合体を免疫沈降により精製し、沈降産物に *GSEC* が含まれるかどうかを q-PCR によって確かめた。その結果、DHX36 細胞内においても *GSEC* は DHX36 と結合していることが確認できた (Fig.11)。ビオチンプルダウン結果と考え合わせると、*GSEC* は DHX36 と直接相互作用していることが示唆された。

DHX36

DHX36 は DEAH-box RNA ヘリカーゼファミリーに属する。別名 RHAU とも呼ば

れ、PLAU mRNA の 3'UTR に結合し、PLAU の mRNA を不安定化する因子として同定されてきた(40)。後に、DHX36 は N 末にある RHAU-specific motif (RSM) を介して DNA、RNA 中に存在する G-quadruplex に高い特異性をもって結合し、helicase ドメインを介して G-quadruplex を解きほぐす活性を発揮することが明らかにされた(41-43)。DHX36 はこの活性を介して細胞内で転写、mRNA の安定性制御といった機能を発揮している(44)(45)(46)。例として、YY1 や TNAP 遺伝子の 5'UTR には G-quadruplex が存在しており、DHX36 はこれらの DNA G-quadruplex を解くことで転写の活性化に寄与している(45, 46)。加えて、細胞質では *PITX1* mRNA の 3'UTR 中の G-quadruplex を解く事で *PITX1*mRNA を micro RNA 依存的な経路で分解に導いている(44)。

GSEC は G-quadruplex を介して DHX36 と結合する

DHX36 は G-quadruplex 結合能という特徴的な機能を持つことから、*GSEC* に G-quadruplex が存在するかを確認した。*GSEC* の塩基配列を G-quadruplex を予測するプログラムである QGRA Mapper により解析した。その結果、*GSEC* の 11-26 の配列が高いスコアを示し、高い確率で G-quadruplex を形成することが示唆された (Fig.12)。興味深いことにこの領域はビオチンプルダウンにより同定された、DHX36 への結合領域であった。さらに、この G-quadruplex が DHX36 との結合に必要であるかどうかをビオチンプルダウンにより確かめた。*GSEC* 中の G-quadruplex 形成配列に変異を導入すると (G4 Mut) ほぼ完全に DHX36 との結合能が消失した (Fig.13)。これらの結果から *GSEC* は G-quadruplex を介して DHX36 と結合していることが示唆された。

GSEC は DHX36 の helicase 活性を阻害する

タンパク質と結合する lncRNA の役割の一つは結合タンパク質の機能調節である。そこで、*GSEC* が DHX36 と直接結合することに着目し、*GSEC* が DHX36 の機能に与

える影響を検討した。DHX36 が G-quadruplex 活性を発揮して細胞運動能を抑制していることから、*GSEC* が DHX36 の酵素活性に与える影響を評価した。

まず、DHX36 の G-quadruplex を解く活性をモニター出来る G4 レポーターアッセイ系を構築した。DHX36 は生体内で *PITX1* mRNA の 3'-UTR に存在する G-quadruplex を標的としており、この G-quadruplex が解かれると mRNA の不安定化が引き起こされることが知られている(44)。そこで、*PITX1* mRNA 中の G-quadruplex による mRNA の安定化をモニターすることで、DHX36 の活性を間接的に測定出来ると考え、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に *PITX1* の 3'-UTR を連結したコンストラクトを作成した (Luc-G4) (Fig.14)。DLD-1 細胞に Luc-G4 と空のベクターまたは、DHX36 を強制発現させて、Luc-G4 レポーター活性を計ったところ、DHX36 の強制発現によってルシフェラーゼ活性の低下を引き起こした (Fig.14)。従って、このレポーターを用いる事で細胞内での DHX36 活性をモニターできると考えられた。

次に、このコンストラクトを用いて *GSEC* が DHX36 の活性に影響を与えるか評価した。DHX36 を強制発現させるとレポーター活性が低下するが、*GSEC* を共発現しておくくと DHX36 によるレポーター活性の低下が軽減された (Fig.14)。一方で、DHX36 と結合しない *GSEC*-G4 Mut を共発現しても DHX36 単独発現にくらべ、レポーター活性は変化しなかった。以上の結果から、*GSEC* は直接の結合を介して DHX36 の活性を抑えている可能性が示唆された。

さらに、*in vitro* で *GSEC* が DHX36 の活性に影響を与えるかどうかをリコンビナントの DHX36 を用いた G-quadruplex resolving assay によって解析した (Fig.15)。その結果、*GSEC* 中の G-quadruplex 形成配列を反応系に加えると DHX36 の活性が阻害されることを見いだした (Fig.15)。一方で、コントロールとして用いた相補鎖は DHX36 の活性は阻害しなかった。

DHX36 は大腸がん細胞の運動能を抑制する

DHX36 と細胞運動の関係を示唆する様な報告が無かったことから DHX36 が大腸が

ん細胞の運動能に与える影響を調べた。DLD-1 細胞に DHX36 を強制発現させ、トランスウェルアッセイによって細胞運動能を評価した。その結果、DHX36 を発現させると DLD-1 細胞の運動能が低下した。一方で、G-quadruplex を解く活性を消失するような、DHX36 の helicase mutant (D335A)を発現させても細胞運動能の低下は僅かであった (Fig.16)。以上の結果から、DHX36 は G-quadruplex を解く活性依存的に細胞運動を抑制する働きを持つと考えられた。

DHX36 の発現抑制によって、GSEC ノックダウンに伴う細胞運動能の低下がレスキューされる

最後に、GSEC は DHX36 依存的なメカニズムで細胞運動を亢進しているのかをダブルノックダウン実験により検討した。GSEC と DHX36 を同時に発現抑制した際の細胞運動能をトランスウェルアッセイにより評価した。その結果、GSEC を発現抑制しておくと細胞の運動能が低下するが、DHX36 を同時にノックダウンしておくと、低下した運動能が殆ど完全にレスキューされた (Fig.17)。従って、GSEC は DHX36 依存的なメカニズムを介して大腸がん細胞の運動能を亢進していると考えられた (Fig. 19)。

大腸がん細胞の造腫瘍過程における *GSEC* の機能解析

GSEC の発現抑制によって大腸がん細胞の腫瘍生着が抑制される

がん幹細胞の特徴の一つとして強い造腫瘍能が挙げられる(2, 3)。そこで、*GSEC* が大腸がん細胞の造腫瘍性に与える影響を検討した。HCT116 細胞株において、shRNA を用いて *GSEC* を恒常的に発現抑制し、免疫不全マウスの皮下に移植した。その結果、*GSEC* のノックダウンによって腫瘍の生着が抑制されることが明らかになった (Fig.19)。一方で、in vitro で平面培養においては、*GSEC* の発現抑制によって有意な細胞増殖の差は見られなかった。

GSEC の発現抑制によって *TGFB2* の発現が抑制される

GSEC の発現抑制により腫瘍の成長そのものには影響を与えないが、腫瘍細胞の生着に影響を与えるというユニークな表現型を呈した。このユニークな表現型は TGF- β シグナルを抑制した際の Xenograft モデルの結果と非常に似通っている(47)。TGF- β はマウス皮下移植モデルにおいて、腫瘍の成長には影響を与えないが、腫瘍細胞の生着を促進していることが示されている。すなわち、大腸がんにおける TGF- β ファミリーの機能解析が報告された。大腸がん細胞自身の TGF- β シグナルは不活化されているが、TGF- β ファミリー分子は間質細胞に作用することによって、大腸がん細胞の生存に有利な微小環境を形成し、転移、浸潤、再発を促進していると考えられている。さらに、大腸がん幹細胞において TGF- β ファミリー分子の発現量が高いことも示されている。そこで、*GSEC* が TGF- β の発現に与える影響を検討したところ、HCT116 細胞において *GSEC* を発現抑制すると、*TGFB2* の mRNA 量が低下することを見いだした (Fig.20)。一方、*GSEC* の発現抑制は *TGFB1* の発現量には影響を与えず、*TGFB3* は HCT116 細胞では発現していなかった。これらの結果から *TGFB2* は *GSEC* の下流因子として働いている可能性が示唆された。

TGFB2の発現抑制によって腫瘍の生着が抑制される

*GSEC*の下流因子としてTGFB2が腫瘍形成のプロセスで働いている可能性が考えられた。そこで、腫瘍形成におけるTGFB2機能を明らかにするために、shRNAを用いてTGFB2を発現抑制したHCT116細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して造腫瘍能を評価した。その結果、TGFB2の発現抑制によって大腸がん細胞の生着が抑制された(Fig.21)。

DHX36はTGFB2の発現に影響を与えない

続いて、*GSEC*によるTGFB2の発現制御機構がDHX36に関わるものかを検討した。TGFB2の発現制御機構がDHX36依存的なものであるとすると、細胞運動能と同様にDHX36の発現抑制によってTGFB2の発現がレスキューされると考え、ダブルノックダウン実験を行った。しかし、*GSEC*を発現抑制により低下してTGFB2の発現は、DHX36をノックダウンしてもレスキューされなかった(Fig.22)。従って、*GSEC*がTGFB2の発現を制御している機構はDHX36に関わる機構とは別のものであると考えられた。

新規GSEC結合タンパク質の探索

*GSEC*によるTGFB2発現制御機構はDHX36とは別のものであると考えられたため、新たに*GSEC*結合タンパク質の探索を行った。前回の精製条件のスケールアップを行い、精製に用いる細胞抽出液量を増やしたところ、新たなセンス鎖特異的なバンドを得た(Fig.23)。これを切り出し、MS解析に供したところhnRNPF、EIF4A3が同定された。

hnRNPFの発現抑制によってTGFB2の発現量が低下する

続いて、同定された2つのタンパク質がTGFB2の発現に影響をあたえるかどうか検討した。siRNAを用いてhnRNPFおよび、EIF4A3を発現抑制し、TGFB2の発現量

を定量したところ、hnRNPF の発現抑制によって、*TGFB2* の発現が低下することを見いだした (Fig.24)。一方で、EIF4A3 を発現抑制しても顕著発現変動を示さなかった。これらの結果から、*GSEC* は hnRNPF と協調して *TGFB2* の発現を制御している可能性が考えられた。

hnRNPF

hnRNPF は mRNA の G が連続した領域に結合して G-quadruplex の形成を妨げる機能を持っている(48)。報告されている機能の殆どが G-quadruplex の形成を妨げて RNA の二次構造を変化させることによりポリアデニレーションやスプライシングを制御する等、核内イベントに関わるものである(49–52)。しかしながら、近年 hnRNPF が TTP、BRF1、BRF 2 といった mRNA の安定化に関わる因子と相互作用しており、AU rich element (ARE) をもつ mRNA の分解を促進しているという機能が報告された(53)。分子構造的な特徴としては N 末側に quasi-RNA-recognition motif を 3 つ持っており (qRRM1~3)、それぞれが G-rich 配列への結合能を持っている。加えて qRRM1 と qRRM3 に関しては単独で G-quadruplex の形成阻害作用がある(48)。

hnRNPF は *GSEC* の G-quadruplex 形成領域に結合する

hnRNPF と *GSEC* の複合体形成を調べるために、ビオチン化 *GSEC* によるプルダウン産物を抗 hnRNPF 抗体によるウエスタンブロッティングで検証した。その結果、*GSEC* のセンス鎖沈降産物特異的にバンドが確認された (Fig.25)。さらに、hnRNPF の結合部位を明らかにする目的で断片化した *GSEC* を用いてプルダウン実験を行ったところ、hnRNPF は *GSEC* の 1-375 bp 領域に結合することが明らかとなった。加えて、*GSEC* 中の G-quadruplex 形成配列に変異を導入すると (G4 Mut) ほぼ完全に hnRNPF との結合能が消失した (Fig.25)。これらの結果から *GSEC* は G-quadruplex 形成配列を介して hnRNPF と結合していることが示唆された。

考察

大腸がんにおける *GSEC* の役割

数々の研究によって、幾つかの lncRNA は様々ながん種においてその発現が亢進しており、重要な役割を担うことが明らかとなってきた。本研究では新規 lncRNA である *GSEC* が大腸がんにおいて発現亢進しており、その発現抑制によって細胞運動能の低下が引き起こされることを見いだした。さらに、*GSEC* の発現抑制によって腫瘍細胞の組織への生着が抑制された。腫瘍細胞の運動能は、浸潤、転移の過程において重要であることがされている(54)。また、腫瘍細胞の組織への生着も転移のプロセスの素過程であり、実際に生着能が低下している細胞の転移能は低い(47)。*GSEC* を発現抑制することによって引き起こされるこれら 2 つの表現型は、どちらも転移、浸潤のプロセスに深く関わるものである。すなわち、*GSEC* は腫瘍細胞の生着と、運動能の亢進という 2 つの働きを持ってしてがん細胞の転移、浸潤を促進していると予想される。また、*GSEC* が、がん幹細胞で発現が高いことは、がん幹細胞が高い転移能をもつ一要因である可能性も考えられる。加えて、*GSEC* は正常組織に比べてがん細胞で発現が亢進しており、*GSEC*-DHX36 経路、および、*GSEC*-TGFB2 経路はがんの転移、浸潤抑制を目的とした薬剤の標的となりうる可能性を持っているといえる。

DHX36 のがんにおける機能

GSEC が細胞運動を調節しているメカニズムを明らかにするために、*GSEC* 結合タンパク質を探索し、DHX36 を同定した。DHX36 は G-quadruplex へ結合して解く活性をもっており、この活性依存的、または非依存的に転写、翻訳、mRNA の分解を制御している(44–46)。本研究では、DHX36 の過剰発現によって細胞運動が抑制されることから、DHX36 はがん抑制遺伝子である可能性を見いだした。しかしながら、本研究の実験結果とは対照的に DHX36 が、がん遺伝子として働いている可能性を示唆している報告も存在する。この報告によると DHX36 はがん遺伝子、YY1 遺伝子の 5'UTR コ

ード領域に存在する DNA の G-quadruplex を解きほぐし、YY1 の転写を活性化させる働きをもっている。さらに、YY1 の発現量と DHX36 の発現量は乳がん細胞株と乳がん検体において生の相関を示している(45)。このような DHX36 の機能の違いは、DHX36 が細胞種依存的な機能を持っていることが原因であると思われる。

DHX36 が細胞運動を抑制するメカニズム

DHX36 の強制発現により細胞運動が抑制される一方で、DHX36 の ATPase 変異体が細胞運動抑制能を持たないことから、DHX36 は G-quadruplex を解く活性依存的なメカニズムを介して運動能を抑制していると考えられる。

DHX36 の標的遺伝子は YY1 の他にもいくつか同定されているが、DHX36 はそれらの DNA 中または、RNA 中に存在する G-quadruplex を解くことによって発現調節を行っている。加えて、DHX36 が microRNA による遺伝子発現に関わるという報告もある(55)。さらに、既に GEO にデポジットされている Hela 細胞において DHX36 を発現抑制したマイクロアレイの発現データを使って、DHX36 の発現抑制に伴い発現が上昇遺伝子群の GO 解析を行うと cell migration と言った GO term が有意に出現する。これらの知見に基づくと DHX36 は細胞運動関連遺伝子群の発現を抑制することによって、細胞運動を抑制していると推察される。

GSEC と DHX36

我々の実験では DHX36 の発現抑制によって、GSEC のノックダウンに伴う細胞運動能の低下が完全にレスキューされた。また、GSEC が細胞運動を亢進しているのに対して DHX36 は細胞運動を抑制している。さらに、GSEC は DHX36 の酵素活性を阻害する働きを持っていた。これらの結果から、GSEC は細胞内において DHX36 の機能を阻害することで細胞運動を亢進していると考えられる。現在の実験結果から、GSEC が自身の G-quadruplex を介して、DHX36 のデコイ RNA として働いているという作用メカニズムが仮説の一つとして考えられる。デコイ RNA の特徴としては、標的タンパク

質の核酸結合コンセンサス配列をミミックした配列を持っているという点である(9)。*GSEC*は DHX36 の結合配列である G-quadruplex を介して DHX36 と結合しており、この特徴と合致する。*GSEC*がデコイとして働く場合、*GSEC*は G-quadruplex を介して DHX36 の活性部位にはまり込むことで、DHX36 を本来の標的と競合していると予想出来る。現在までに G-quadruplex を機能ドメインとして持つ lncRNA の機能解析はされておらず、G-quadruplex のデコイという報告も無いため、*GSEC*の機能解析を深めることで、lncRNA の新しい作用機序を提唱出来るかもしれない。しかしながら、*GSEC*が DHX36 の機能を阻害しているメカニズムの全容解明には DHX36 の標的遺伝子の同定が必要となってくる。

GSEC-TGFB2 経路

*GSEC*の発現抑制により腫瘍の成長に影響はなかったが、腫瘍細胞の生着が抑制された。この表現型は TGF- β シグナルを遮断した際の表現型と似通っていたことから、*GSEC*の下流因子として TGFB2 を見いだした。TGFB2 を発現抑制した細胞を免疫不全マウスの皮下へ移植しても、腫瘍の生着が抑制されるという既報と同様の結果をしめた。今後 *GSEC* の下流として TGFB2 の重要性を明らかにしていくために、*GSEC* を発現抑制した細胞に TGFB2 を強制発現させて機能的レスキュー実験を行っていく必要がある。

腫瘍の生着は転移の過程の一つであるため、*GSEC*はがん細胞の転移過程で働いている可能性が考えられる。そこで、マウス肝臓転移モデルを用いた実験によって *GSEC* および、TGFB2 が、がん細胞の転移に関わるか検証していくことも必要である。

GSECによる TGFB2 の発現制御機構

DHX36 によって TGFB2 の発現制御機構を説明することが出来ないことから、*GSEC* の新規結合タンパク質の探索を行い、hnRNPF を同定した。hnRNPF の発現抑制によっても TGFB2 の発現が低下することから *GSEC*は hnRNPF と協調的に働いている可

能性が考えられる。hnRNPF に関する報告の大半がスプライシング、ポリアデニレーション等の核内のイベントにおける機能についてであるが、今回実験用いた HCT116 細胞では hnRNPF は核に存在していなかった。現在までに報告されている細胞質における hnRNPF 機能は mRNA の不安定化のみである(53)。多くの RNA 結合タンパク質が多機能であることを考慮すると、hnRNPF の細胞質における機能が mRNA 不安定化だけであるとは考えにくい、核酸結合能を持つため少なくとも遺伝子発現に関わるものであると予想される。従って、hnRNPF は *TGFB2* 直接的な *TGFB2* の安定性制御または *TGFB2* の上流因子の発現に関わっている可能性が考えられる。hnRNPF に加え、*GSEC* 双も細胞質に局在しているおり、現在までに知られている細胞質 lncRNA の作用機序としてはデコイ、ガイド、タンパク質の翻訳後修飾および、細胞内局在の制御が知られている(14, 15, 17, 32, 56)。少なくとも、*GSEC* を発現抑制しても hnRNPF の細胞内局在には影響を与えなかった。また、hnRNPF と *GSEC* が協調的に働いていると考えると、この場合 *GSEC* が hnRNPF のデコイとして振る舞っている可能性も考えられない。すなわち、他の 2 つのメカニズム、もしくは全く新規のメカニズムで *GSEC* は働いていると推察される。

GSEC は大腸がん幹細胞で発現が高い lncRNA として同定してきており、がん幹細胞の腫瘍形成能維持機構において重要な働きを担っている可能性が考えられる。一方、TGF- β ファミリー分子もがん幹細胞で発現が高いという報告もあり、*GSEC*-*TGFB2* 経路が、がん幹細胞でも働いていると予想できる(47)。今後、検体由来のがん幹細胞を用いて実験を行う必要がある。

材料と方法

細胞培養

DLD-1 細胞は 10%FBS を添加した RPMI1640 培地を用いて培養した。HCT116 は 10%FBS を添加したマッコイ 5A 培地を用いた。HEK293FT 細胞は 10%FBS を添加した DMEM を用いた。HT1080 細胞は 10%FBS を添加した MEM を用いた。全ての細胞は、37℃、5% CO₂ 存在下において培養した。

ヒト大腸がん検体

ヒト大腸がん検体および周辺組織はインフォームドコンセント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。

Xenograft からのがん幹細胞の単離

マウスからXenograftを取り出し、HBSSで洗浄後、はさみで細かく刻んだ。次に、細かくなったXenograftを40 ml のHBSSで懸濁し、氷上に5分間放置する。こうすることで生きている細胞で構成された組織が沈み、一方で死細胞の塊が上清に残る。沈殿した組織片を吸い込まないように気をつけながら、上清のみをアスピレーターで吸引した。この操作を3回繰り返すことで劇的に死細胞を取り除くことが出来、その後のFACS解析で良好な結果が得られる。残った組織にAccutase (Life technologies) を加え37℃で1時間インキュベートした。Accutaseはコラゲナーゼ、プロテアーゼを含みながら、細胞へのダメージが最小減になるように調整された酵素のカクテルである。15分毎にp200チップでピペッティングを行いほぼ全部の細胞が細胞を単一細胞になるまで酵素処理を続けた。単一細胞まで細胞をはがすことが出来た後、HBSSで2回洗浄し、Accutaseを完全に取り除いた。その後、ダブレットになっている細胞を取り除く目的で網の目が100 μm、70 μm、40 μmのセルストレーナーを順番に通していった。さらに、30% percoll溶液 (GE)の上に細胞懸濁液を重層し、2000×gで5分間遠心した。この

操作によってダブレットになっている細胞はpercollの下層に沈殿し、一方で単細胞はpercollの上に残る。注意深く単細胞を単離し、細胞をHBSSで2回洗浄後してFACS解析の際にマーカーとする抗体染色を行った。CD326 (EpCAM) -FITC (MACS) (1:100) 、CD133/1 (AC133) -APC (MACS) (1:100) 、CD44-PE (BD) (1:200) の抗体を使用した。抗体の希釈はMACS buffer (BD) で行い、抗体の取り込みを抑える為に、4℃で30分間行った。PBSで2回洗浄後、1 mlあたり 10×10^6 細胞になるようにPBSに懸濁した。最後にPIを1/500量加えてサンプルとした。細胞集団の解析および目的細胞の単離にはFACS MoFlo (BD) を使用した。PI染色とFSCにより細胞の生死を判定し、EpCAMの発現の有無によりヒト上皮細胞の選別を行った。さらに、CD133、CD44両抗原陽性細胞をがん幹細胞のフラクションとして単離し、実験に用いた。

RNA-seq

網羅的な遺伝子発現パターンの比較はRNA-seqにより行った。細胞からNucleo Spin RNA column (MACHEREY-NAGEL) を使ってRNAを回収した。次世代シーケンサーを用いた実際の解析は東京大学分子細胞生物学研究所ゲノム情報解析分野に依頼し、共同研究としておこなった。

生細胞数の計測

細胞をPBS-EDTAで洗浄した後、トリプシン処理を行った。細胞が単一にまで離れたのを顕微鏡で確認し、10%FBSを含む培地を加えピペティングにより反応をとめた。懸濁した細胞を2×Trypan Blue solution (GOBCO) と混合し、染色されない細胞を生細胞として血球計算盤を用いて数えた。

Cell-Titer Glo assay

細胞の増殖を定量するのには、Cell-Titer Glo (Promega)を使用した。細胞内のATP

量に反応して蛍光を発する改良型ルシフェラーゼによって相対的に細胞量を定量することを可能にしている。実験は付属の説明書に従って行った。

マイクロアレイデータ解析

ヒト大腸がん検体および、正常腸管組織の遺伝子発現データセットは GEO から取得した (GSE20916) 。解析は Gene Spring version 12.6.1 (Agilent Technologies)を用いて行った。

トランスウェルアッセイ

トランスウェルアッセイには Transwell migration chambers (diameter 6.5 mm;pore size 8 μ m; Costar Corporation、 Cambridge、 MA) を使用した。実験は付属の説明書に従って行った。チャンバーの下面を 30 μ g ml⁻¹ の collagen type I (Koken, Tokyo, Japan) で 12 時間処理しコートした。siRNA 導入後 72 時間培養した細胞を 1 ウェルあたり 2.0 \times 10⁴ 個ロードし、3 時間インキュベーターに入れておいた。この間にロードされた細胞が異動する。その後、チャンバーを上に残った細胞を綿棒で完全に取除き、チャンバーの下面に張り付いている細胞を H&E 染色してカウントした。

Wound healing assays

siRNA をトランスフェクションしてから 72 時間後、p200 のチップを使って細胞面に一本の傷を作り、位相差顕微鏡を使って傷の写真を撮影した。その後、14 時間インキュベーター内で培養し、再び傷の写真を撮影した。培養前の写真と培養後の写真から培養後に細胞運動によって塞がれた傷の割合を算出した。

リポフェクション法による核酸導入

siRNA の導入

siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX (Lifetech) を使用した。実験は付属の

説明書に従って行った。

エレクトロポレーションによる遺伝子の導入

DLD-1 への発現ベクターの導入は NEPA21 エレクトロポレーター (Nepagene) を用いたエレクトロポレーション法により行った。実験は実験器付属の説明書に従って行った。DLD-1 細胞を 0.25%トリプシンにより単一細胞に分離し 1.0×10^6 個の細胞に対して 10 μ g の発現プラスミドを使用し、ポアリングパルス:パルス電圧 125 V; パルス幅 5 ms; パルス回数 2 の条件でエレクトロポレーションを行った。

shRNA 発現レンチウイルスの作成と感染

shRNA 発現用のウイルスベクターには pCS-Rfa-CG を用いた。標的配列をクローニングした pCS-Rfa-CG ベクター、pCMV-VSV-G-RSV-Rev および pCAG-HIVgp を HEK293FT 細胞に同時にトランスフェクションし、8 時間後に培地交換を行う。72 時間培養した後培養上清をフィルターに通して細胞残渣を取り除いた。上清を超遠心 (113,000 \times g、1.5 時間) してウイルスを沈殿させた後に PBS に再懸濁することで濃縮した。濃縮ウイルス液は HT1080 細胞を用いてタイターチェックを行った。HCT116 細胞への感染は MOI (multiplicity of infection) 100 で行った。使用した shRNA の配列は以下に示す。

RNA の抽出および cDNA の作成

細胞からの total RNA の抽出精製には TRISURE (BIOLINE) を用いた。実験は付属の説明書に従って行った。cDNA の合成は Prime Script RT Master Mix (TaKaRa) を使用した。実験は付属の説明書に従って行った。

q-RT-PCR

q-RT-PCR は Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche) を用いて行った。

cDNA を鋳型とし、Primer と 2×SYBR green master mix (Roche) を混ぜた反応液を加えて、PCR 反応と測定を行った。遺伝子の発現量は HPRT1 および Actin を内部標準として $\Delta\Delta C_t$ 法により算出した。使用した Primer は以下に示す。

ウェスタンブロッティング

細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate) で溶解し、4℃ で 30 分ローテーションした後、15,000rpm、15 分遠心し、上清をタンパク質サンプルとした。サンプルを SDS-PAGE で展開後、Immobilon Membrane (Millipore) にセミドライ法で転写した。ブロッキングは 5% スキムミルク (Wako) を含む TBST (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) 中で室温 1 時間震盪することで行い、TBST で希釈した 1 次抗体を加えて 4℃ で一晩反応させた。TBST でメンブレンを 10 分×3 回洗浄し、TBST で希釈した二次抗体 (HRP-conjugated) を加えて 4℃ で 1 時間反応させた。さらに TBST でメンブレンを 10 分×3 回洗浄し、HRP substrate (Millipore) をメンブレンに滴下して発色させた。蛍光は LAS4000 mini (FUJIFILM) で検出した。

ビオチン化 lncRNA の合成

Biotin pull-down に用いた lncRNA の合成は MAXIscript T7 kit (Life Technologies) を使用した。実験は付属の説明書に従った。テンプレートには lncRNA が挿入された pBlueScript を用いた。ビオチン標識された lncRNA を合成する際には本来合成に使う CTP の 40% を Biotin-14-CTP (Life Technologies) 置換して反応を行った。合成した RNA はホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動によるクオリティチェックを行った。

Biotin RNA pull-down アッセイ

lncRNA 結合タンパク質の探索および、結合の検証は Biotin RNA pull-down アッセイ

イによって行った。まず、対数増殖期にある HT-29 細胞 10 cm デッシュ 8 枚を準備した。回収した細胞ペレットの体積に対して 3 倍量の RIP buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1% NP40 5% glycerol 0.5 mM DTT) を加え氷上で 30 分静置する。その後、25G のシリンジを 10 回とおして細胞を破碎した。細胞破碎液を 15,000 rpm、15 分間遠心して上清を細胞抽出液とした。この段階で-80℃で凍結保存することが出来る。次に、pull-down に用いるベイト RNA の折りたたみを行った。in vitro transcription で合成された RNA は必ずしも熱力学的に適当な二次構造を取るとは限らない。一度熱を加えて RNA の二次構造を崩した後、適当な濃度の金属イオン存在下でゆっくり冷やす事で熱力学的に安定した構造をとらせることが出来る。400 ng のビオチンラベルしたベイト RNA を 90℃、3 分熱した後、20 分かけてゆっくり室温へ戻した。さらに、Refolding buffer (10 mM Tris pH 7.5, 0.1 M KCl, 10 mM MgCl₂) を加えてさらに室温で 10 分間静置した。これら二次構造をとらせたベイト RNA に細胞抽出液に加え 4℃で 3 時間混和した。Streptavidin dynabeads M280 をタンパク質と RNA の混合物に加えてさらに 30 分混和し、ビオチンとアビジンの結合力を利用してタンパク質-RNA 複合体ごとビーズに吸着させた。ビーズを 4 回洗浄後、SDS-サンプルバッファー (ナカライテクス)を加えて 95℃で 5 分間ボイルしたものを pull-down 産物とし、ウエスタンブロッティングまたは MS 解析用の銀染色に供した。

ペプチドマスフィンガープリンティング

切り出したポリアクリルアミドゲル内のタンパク質を酵素で消化し、生成されたペプチド断片の質量電荷比を測定することでタンパク質を同定することが出来る。まず、切り出したゲル片を室温にて acetonitrile 内に 15 分間静置し、脱水を行った。上清を取り除いた後に、ゲル片を遠心乾燥機 SpeedVac (Taitec) にかけて、乾燥させた。乾燥したゲル片に Reduction buffer (10 mM DTT、100 mM NH₄HCO₃)を加え、56℃にて 1 時間反応させ、分子ジスルフィド結合の還元を行った。反応液を取り除いた後、Alkylation buffer (55 mM iodoacetamide、100 mM NH₄HCO₃)を加えて遮光し、室温

で 45 分間反応させた。この反応により Cys 残基はカルバミドメチル化され、ジスルフィド結合の再形成が妨げられる。次に、acetonitrile を加えゲル片を脱水した。さらに、100 mM NH_4HCO_3 を加え続くトリプシン反応のためにゲル内の Buffer の置換を行った。最後に再び acetonitrile を加えて脱水し、これを SpeedVac にて完全に乾燥させた。Trypsin buffer (15 ng/ μl Trypsine gold (sequence grade, Promega)、50 mM NH_4HCO_3) 5 μl を加えて氷上に 3 分間静置し、ゲル片を豊潤させた。ここに 100 mM NH_4HCO_3 を加えて、37℃ で 6 時間反応させた。その後、断片化されたペプチドをゲルから回収した。20 μl の 20 mM NH_4HCO_3 を加え、室温で 20 分震盪し、消化ペプチドを溶出させた。ペプチド溶液を回収後残ったゲル片に 20 μl の Extraction buffer (5% formic acid、50% acetonitrile) を加えて再び 20 分間震盪した。この操作を 3 回繰り返して、得られた 80-100 μl のペプチドを SpeedVac にかけて蒸発乾固させた。乾燥したペプチドを 40 μl の Resuspension buffer (2% acetonitrile、0.1% formic acid) に溶解し分析用のサンプルを調整した。ペプチド断片の質量分布測定は Orbitrap-LTQ-Velos (Thermo) を用いて行った。

免疫不全マウスへの腫瘍細胞の皮下移植実験

腫瘍細胞の造腫瘍能を評価は免疫不全マウスを用いた腫瘍細胞の皮下移植実験によって行った。レンチウイルス感染後 5 日培養した HCT116 細胞を単一細胞にまでトリプシン処理した。トリプシナイズした細胞はトリパンブルー染色により生細胞数をカウントし、100 μl あたりの細胞数が 2.0×10^3 個になるように PBS 希釈した。この細胞溶液と等量の Matrigel growth factor reduced (BD) を混ぜ合わせ、免疫不全マウス 1 匹に対して 100 μl を皮下に移植した。移植用のマウスは BALB/cA-nu/nu を用いた。

腫瘍サイズの計測

免疫不全マウスの腫瘍移植部を 1 週間毎に確認および、ノギスを用いて長径と短径を測定し、 $\text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times \pi / 6$ により腫瘍体積の算出を行った。

リコンビナント DHX36 の精製

FLAG タグのついた DHX36 をクローニングした pcDNA3.1 ベクターをリポフェクションで HEK293FT 細胞に導入した。トランスフェクション 72 時間後、細胞を PBS で洗浄し、RIP buffer で細胞を溶解した。細胞抽出液に 100 μ l の抗 FLAG M2 agarose (Sigma) を加えて 4℃ で 4 時間混和してアガロースビーズに FLAG-DHX36 を吸着させた。続いて、抗体-ビーズを wash buffer (50 mM Tris-HCl pH7.9、0.1 mM EDTA、100 mM KCl、20% Glycerol、0.05% NP40) で 4 回洗浄した。最後に、抗体ビーズに 100 μ l の FLAG Elution buffer を加えて室温にて 30 分間静置し、リコンビナントタンパク質を溶出させた。リコンビナントタンパク質は CBB 染色によって濃度を測定した。

RNA G-quadruplex resolving assay

G-quadruplex は DNA および、RNA の G リッチな領域に形成される特殊な二次構造であるが、一部のヘリカーゼはこれらの構造を ATP 依存的に解くことができる。また、合成基質を用いて in vitro で活性を測定することが可能である。G-quadruplex 基質の準備、実験手順は論文に記述されている方法に従った。簡単に、K-Res buffer (100 mM KCl、10 mM NaCl、3 mM MgCl₂、50 mM Tris-HCl pH 8.0、70 mM glycine、10% glycerol) に 0.5 pmol の合成 RNA G-quadruplex 基質および、75 fmol のリコンビナント DHX36 を加えて 30℃ で 30 分間反応させた。反応産物を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、SYBR gold 染色によって染色した。反応を行う際に全長の *GSEC* および、*GSEC* 中の G-quadruplex を形成するドメインを加え DHX36 の酵素活性に与える影響を評価した。

RIP assay

DHX36 と lncRNA の結合は RIP assay によって検出した。1 サンプルにつき対数増殖きにある DLD-1 細胞を 1×10^7 細胞を準備した。準備した細胞を PBS で洗浄し、1ml

の RIP buffer を加えた後、4℃ で 30 分間ローテーションして細胞を溶解させた。夾雑物を遠心で除去した後、2 µg の抗 DHX36 抗体を加えて 4℃ で 1 時間混和した。抗体反応を十分行った後、20 µl の Protein G-coupled magnetic beads (Dynabeads Protein G; Life technologies) を加えてさらに 30 分混和した。RIP buffer で 3 回洗浄後、ビーズに TRIzol を加えて RNA を回収した。また、抗体を加える前の細胞抽出液を Input として 50 µl とっておき、同様に RNA を回収した。免疫沈降産物に含まれる RNA 全量を逆転写したものをテンプレートとして *GSEC* に対する Primer を使って q-RT-PCR を行った。

統計解析

統計解析は Mann-Whitney *U*-test 、Log-rank test および、Student's *t*-test を使って行った。 *P*-value < 0.05 のものを統計的に有意であるとした。

引用文献

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* **61**, 69–90
2. Kreso, A., and Dick, J. E. (2014) Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell.* **14**, 275–291
3. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* **445**, 111–115
4. O'Brien, C. a., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K. G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. (2012) ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. *Cancer Cell.* **21**, 777–792
5. Kemper, K., Prasetyanti, P. R., De Lau, W., Rodermond, H., Clevers, H., and Medema, J. P. (2012) Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. *Stem Cells.* **30**, 2378–86
6. Schepers, A. G., Snippert, H. J., Stange, D. E., van den Born, M., van Es, J. H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012) Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science (80-.).* **337**, 730–735
7. Klein, S. a, Seidel, D. J., Pearson, B. D., Singer, S. F., Michaels, P. J., Cox, D. I., Seidel, D. J., Eskridge, R. E., Peterson, T. C., Vose, R. S., Miao, B. Q.,

- Krishnaiah, P. R., Rao, C. R., Wu, F., Free, M., Wang, J., Trenberth, K. E., and Karl, T. R. (2005) The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science (80-.).* **309**, 1559–1563
8. Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N., Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks, T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L., and Lander, E. S. (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* **458**, 223–227
 9. Ulitsky, I., and Bartel, D. P. (2013) lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. *Cell.* **154**, 26–46
 10. Grote, P., and Herrmann, B. G. (2015) Long noncoding RNAs in organogenesis: making the difference. *Trends Genet.* **31**, 329–335
 11. Fatica, A., and Bozzoni, I. (2014) Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 7–21
 12. Herzing, L. B., Romer, J. T., Horn, J. M., and Ashworth, a (1997) Xist has properties of the X-chromosome inactivation centre. *Nature.* **386**, 272–275
 13. Wang, K. C., and Chang, H. Y. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell.* **43**, 904–14
 14. Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., Jiang, Z., Xu, J., Liu, Q., and Cao, X. (2014) The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science.* **344**, 310–3

15. Gong, C., and Maquat, L. E. (2011) lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*. **470**, 284–288
16. Kretz, M., Siprashvili, Z., Chu, C., Webster, D. E., Zehnder, A., Qu, K., Lee, C. S., Flockhart, R. J., Groff, A. F., Chow, J., Johnston, D., Kim, G. E., Spitale, R. C., Flynn, R. a., Zheng, G. X. Y., Aiyer, S., Raj, A., Rinn, J. L., Chang, H. Y., and Khavari, P. a. (2012) Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*. **493**, 231–235
17. Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., and Pandolfi, P. P. (2010) A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. **465**, 1033–1038
18. McHugh, C. A., Chen, C.-K., Chow, A., Surka, C. F., Tran, C., McDonel, P., Pandya-Jones, A., Blanco, M., Burghard, C., Moradian, A., Sweredoski, M. J., Shishkin, A. A., Su, J., Lander, E. S., Hess, S., Plath, K., and Guttman, M. (2015) The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature*. **521**, 232–236
19. Schmitz, K.-M., Mayer, C., Postepska, A., and Grummt, I. (2010) Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev*. **24**, 2264–9
20. Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B. R., Protacio, A., Flynn, R. a., Gupta, R. a., Wysocka, J., Lei, M., Dekker, J., Helms, J. a., and Chang, H. Y. (2011) A long noncoding RNA

maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*. **472**, 120–124

21. O’Leary, V. B., Ovsepian, S. V., Carrascosa, L. G., Buske, F. A., Radulovic, V., Niyazi, M., Moertl, S., Trau, M., Atkinson, M. J., and Anastasov, N. (2015) PARTICLE, a Triplex-Forming Long ncRNA, Regulates Locus-Specific Methylation in Response to Low-Dose Irradiation. *Cell Rep*. 10.1016/j.celrep.2015.03.043
22. Mondal, T., Subhash, S., Vaid, R., Enroth, S., Uday, S., Reinius, B., Mitra, S., Mohammed, A., James, A. R., Hoberg, E., Moustakas, A., Gyllenstein, U., Jones, S. J. M., Gustafsson, C. M., Sims, A. H., Westerlund, F., Gorab, E., and Kanduri, C. (2015) MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA–DNA triplex structures. *Nat. Commun.* **6**, 7743
23. Postepska-Igielska, A., Giwojna, A., Gasri-Plotnitsky, L., Schmitt, N., Dold, A., Ginsberg, D., and Grummt, I. (2015) LncRNA Khps1 Regulates Expression of the Proto-oncogene SPHK1 via Triplex-Mediated Changes in Chromatin Structure. *Mol. Cell*. **60**, 626–636
24. Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H. Y. (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. **329**, 689–693
25. Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G. P. (2010) Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci. Signal.* **3**, ra8

26. Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., and Pandolfi, P. P. (2010) A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. **465**, 1033–1038
27. Yang, F., Huo, X. S., Yuan, S. X., Zhang, L., Zhou, W. P., Wang, F., and Sun, S. H. (2013) Repression of the Long Noncoding RNA-LET by Histone Deacetylase 3 Contributes to Hypoxia-Mediated Metastasis. *Mol. Cell*. **49**, 1083–1096
28. Hu, X., Feng, Y., Zhang, D., Zhao, S. D., Hu, Z., Greshock, J., Zhang, Y., Yang, L., Zhong, X., Wang, L.-P., Jean, S., Li, C., Huang, Q., Katsaros, D., Montone, K. T., Tanyi, J. L., Lu, Y., Boyd, J., Nathanson, K. L., Li, H., Mills, G. B., and Zhang, L. (2014) A functional genomic approach identifies FAL1 as an oncogenic long noncoding RNA that associates with BMI1 and represses p21 expression in cancer. *Cancer Cell*. **26**, 344–57
29. Gutschner, T., and Diederichs, S. (2012) The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*. **9**, 703–19
30. Takayama, K.-I., Horie-Inoue, K., Katayama, S., Suzuki, T., Tsutsumi, S., Ikeda, K., Urano, T., Fujimura, T., Takagi, K., Takahashi, S., Homma, Y., Ouchi, Y., Aburatani, H., Hayashizaki, Y., and Inoue, S. (2013) Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *EMBO J*. **32**, 1665–80
31. Tseng, Y.-Y., Moriarity, B. S., Gong, W., Akiyama, R., Tiwari, A., Kawakami, H., Ronning, P., Reuland, B., Guenther, K., Beadnell, T. C., Essig, J., Otto, G. M., O’Sullivan, M. G., Largaespada, D. a., Schwertfeger, K. L., Marahrens, Y.,

- Kawakami, Y., and Bagchi, A. (2014) PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature*. 10.1038/nature13311
32. Liu, B., Sun, L., Liu, Q., Gong, C., Yao, Y., Lv, X., Lin, L., Yao, H., Su, F., Li, D., Zeng, M., and Song, E. (2015) A Cytoplasmic NF- κ B Interacting Long Noncoding RNA Blocks I κ B Phosphorylation and Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell*. **27**, 370–381
 33. Gupta, R. a, Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., and Chang, H. Y. (2010) Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. **464**, 1071–6
 34. Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Chen, T., Zhang, Y., Zhang, X.-O., Wu, Z., Zhang, S., Wang, H.-B., Ge, J., Lu, X., Yang, L., and Chen, L.-L. (2014) Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus. *Cell Res*. **24**, 513–531
 35. Graham, L. D., Pedersen, S. K., Brown, G. S., Ho, T., Kassir, Z., Moynihan, a. T., Vizgoft, E. K., Dunne, R., Pimlott, L., Young, G. P., LaPointe, L. C., and Molloy, P. L. (2011) Colorectal Neoplasia Differentially Expressed (CRNDE), a Novel Gene with Elevated Expression in Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Genes Cancer*. **2**, 829–840
 36. Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, a. K., and Neidle, S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*. **34**, 5402–5415

37. Maizels, N. (2015) G 4 -associated human diseases. **16**, 1–13
38. Wolfe, A. L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V. K., Sanghvi, V. R., Mavrakakis, K. J., Jiang, M., Roderick, J. E., Van der Meulen, J., Schatz, J. H., Rodrigo, C. M., Zhao, C., Rondou, P., de Stanchina, E., Teruya-Feldstein, J., Kelliher, M. a., Speleman, F., Porco, J. a., Pelletier, J., R  tsch, G., and Wendel, H.-G. (2014) RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*. **513**, 65–70
39. Millevoi, S., Moine, H., and Vagner, S. (2012) G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **3**, 495–507
40. Tran, H., Schilling, M., Wirbelauer, C., Hess, D., and Nagamine, Y. (2004) Facilitation of mRNA Deadenylation and Decay by the Exosome-Bound, DExH Protein RHAU. *Mol. Cell*. **13**, 101–111
41. Booy, E. P., Meier, M., Okun, N., Novakowski, S. K., Xiong, S., Stetefeld, J., and McKenna, S. a. (2012) The RNA helicase RHAU (DHX36) unwinds a G4-quadruplex in human telomerase RNA and promotes the formation of the P1 helix template boundary. *Nucleic Acids Res*. **40**, 4110–4124
42. Lattmann, S., Stadler, M. B., Vaughn, J. P., Akman, S. a., and Nagamine, Y. (2011) The DEAH-box RNA helicase RHAU binds an intramolecular RNA Gquadruplex in TERC and associates with telomerase holoenzyme. *Nucleic Acids Res*. **39**, 9390–9404
43. Vaughn, J. P., Creacy, S. D., Routh, E. D., Joyner-Butt, C., Jenkins, G. S., Pauli, S., Nagamine, Y., and Akman, S. a. (2005) The DEXH protein product

of the DHX36 gene is the major source of tetramolecular quadruplex G4-DNA resolving activity in HeLa cell lysates. *J. Biol. Chem.* **280**, 38117–38120

44. Booy, E. P., Howard, R., Marushchak, O., Ariyo, E. O., Meier, M., Novakowski, S. K., Deo, S. R., Dzananovic, E., Stetefeld, J., and Mckenna, S. a. (2014) The RNA helicase RHAU (DHX36) suppresses expression of the transcription factor PITX1. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3346–3361
45. Huang, W., Smaldino, P. J., Zhang, Q., Miller, L. D., Cao, P., Stadelman, K., Wan, M., Giri, B., Lei, M., Nagamine, Y., Vaughn, J. P., Akman, S. a., and Sui, G. (2012) Yin Yang 1 contains G-quadruplex structures in its promoter and 5'-UTR and its expression is modulated by G4 resolvase 1. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1033–1049
46. Kim, H.-N., Lee, J.-H., Bae, S.-C., Ryoo, H.-M., Kim, H.-H., Ha, H., and Lee, Z. H. (2011) Histone deacetylase inhibitor MS-275 stimulates bone formation in part by enhancing Dhx36-mediated TNAP transcription. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 2161–73
47. Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V. F., Iglesias, M., Céspedes, M. V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X. H.-F., Byrom, D., Riera, A., Rossell, D., Mangués, R., Massagué, J., Sancho, E., and Batlle, E. (2012) Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* **22**, 571–84
48. Dominguez, C., Fiset, J.-F., Chabot, B., and Allain, F. H.-T. (2010) Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 853–61

49. Cayrel, A. (2011) Essential role for the interaction between hnRNP H / F and a G quadruplex in 3' end processing and function during DNA damage. [10.1101/gad.607011.interaction](https://doi.org/10.1101/gad.607011.interaction)
50. Veraldi, K. L., Arhin, G. K., Martincic, K., Chung-Ganster, L. H., Wilusz, J., and Milcarek, C. (2001) hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1228–38
51. Wang, E., Dimova, N., and Cambi, F. (2007) PLP/DM20 ratio is regulated by hnRNPH and F and a novel G-rich enhancer in oligodendrocytes. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4164–78
52. Wang, E., and Cambi, F. (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H and F regulate the proteolipid protein/DM20 ratio by recruiting U1 small nuclear ribonucleoprotein through a complex array of G runs. *J. Biol. Chem.* **284**, 11194–204
53. Reznik, B., Clement, S. L., and Lykke-Andersen, J. (2014) hnRNP F complexes with tristetraprolin and stimulates ARE-mRNA decay. *PLoS One.* **9**, e100992
54. Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646–74
55. Höck, J., Weinmann, L., Ender, C., Rüdell, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., and Meister, G. (2007) Proteomic and functional analysis of

- Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* **8**, 1052–60
56. Xing, Z., Lin, A., Li, C., Liang, K., Wang, S., Liu, Y., Park, P. K., Qin, L., Wei, Y., Hawke, D. H., Hung, M.-C., Lin, C., and Yang, L. (2014) lncRNA Directs Cooperative Epigenetic Regulation Downstream of Chemokine Signals. *Cell.* **159**, 1110–1125

図と表

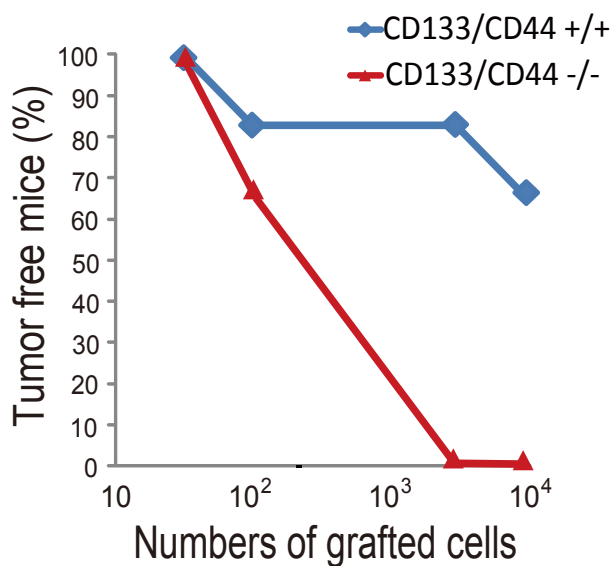
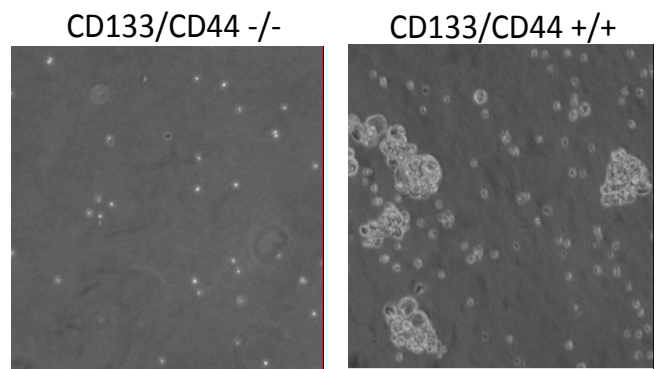
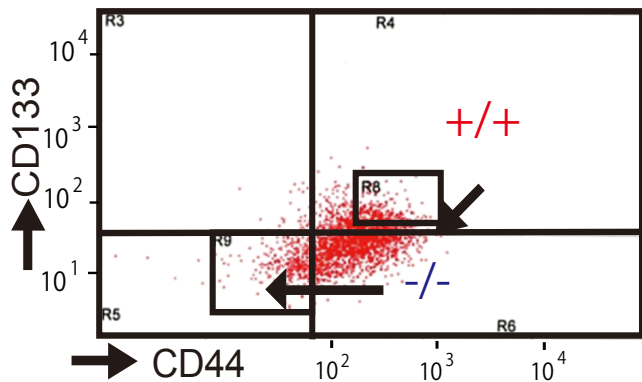


Figure 1 CD133/CD44陽性細胞はがん幹細胞様の性質を示す

(左上) 大腸がん検体由来細胞からのFACSソート

(右上) CD133/CD44陰性細胞とCD133/CD44陽性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。

(下) CD133/CD44陰性細胞とCD133/CD44陽性細胞をそれぞれ30、100、300、1000細胞免疫不全マウスへ移植し、1ヶ月後に腫瘍が形成されたマウスの数をカウントした。n=3~5/group

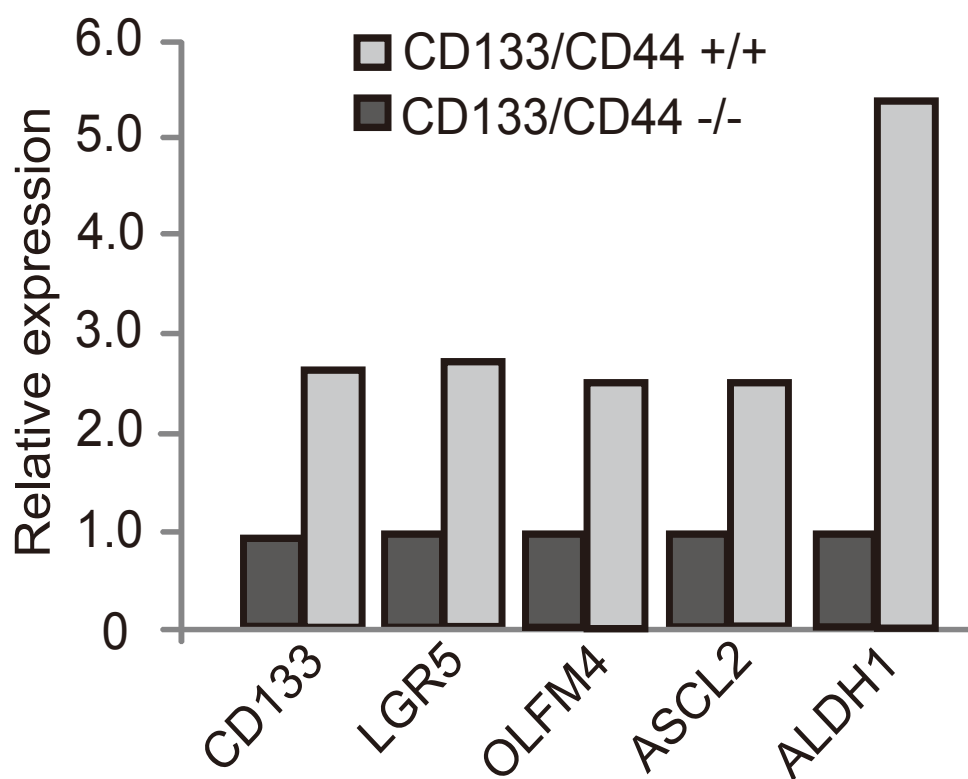


Figure 2 CD133/CD44陽性細胞は幹細胞マーカーの発現が高い

大腸がん検体由来細胞から単離したCD133/CD44陰性細胞とCD133/CD44陽性細胞からmRNAを抽出しRNA-seqによって幹細胞マーカーの発現量を比較した。

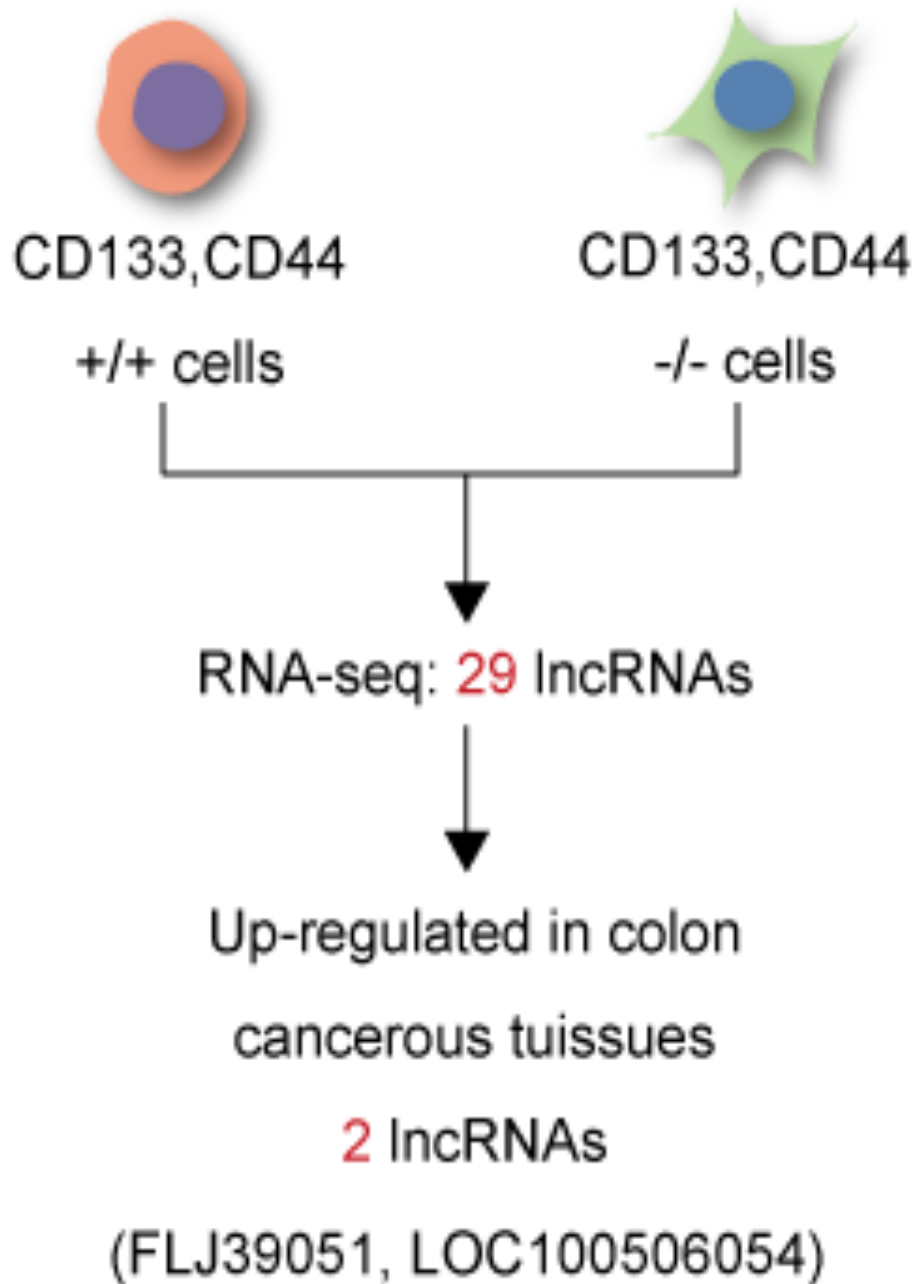


Figure 3 スクリーニングの概要

RNA-seq解析によりCD133/CD44陰性細胞に比べ、CD133/CD44陽性細胞で発現の高いlncRNAを同定した。さらに、正常組織と大腸がん組織を比べて、大腸がんで発現の亢進しているlncRNAに絞り込んだ。

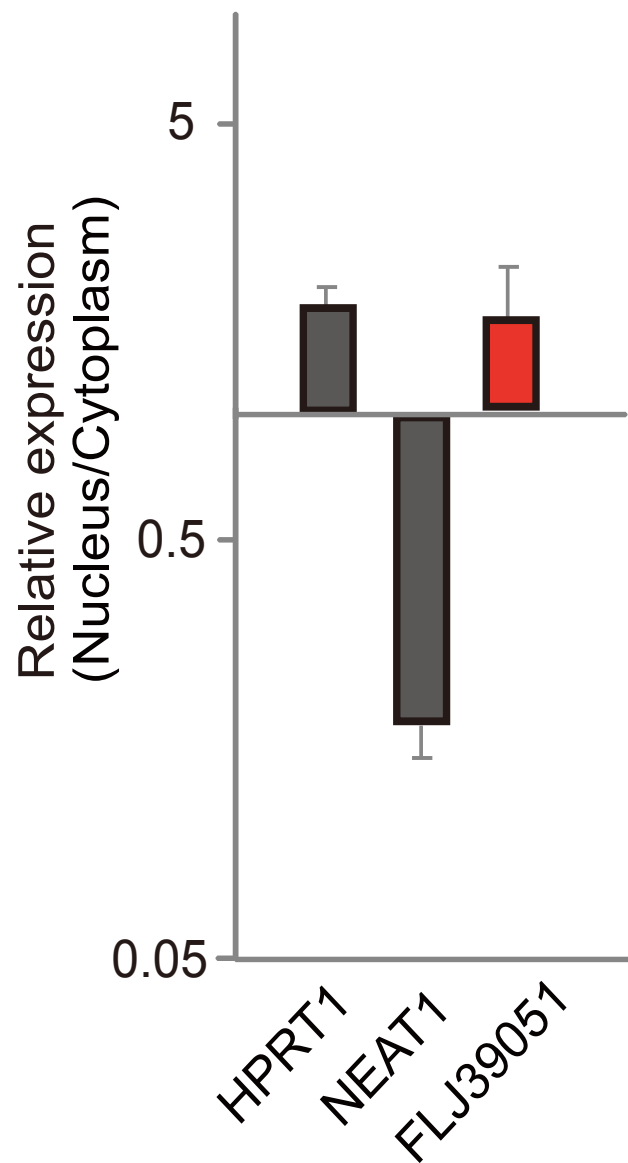


Figure 4 FLJ39051は細胞質に局在する

DLD-1細胞の細胞質および、核画分からRNAを抽出し各転写産物の量をqRT-PCRによって定量した。*HPRT1*を細胞質局在RNA、*NEAT1*を核内RNAマーカーとして用いた。

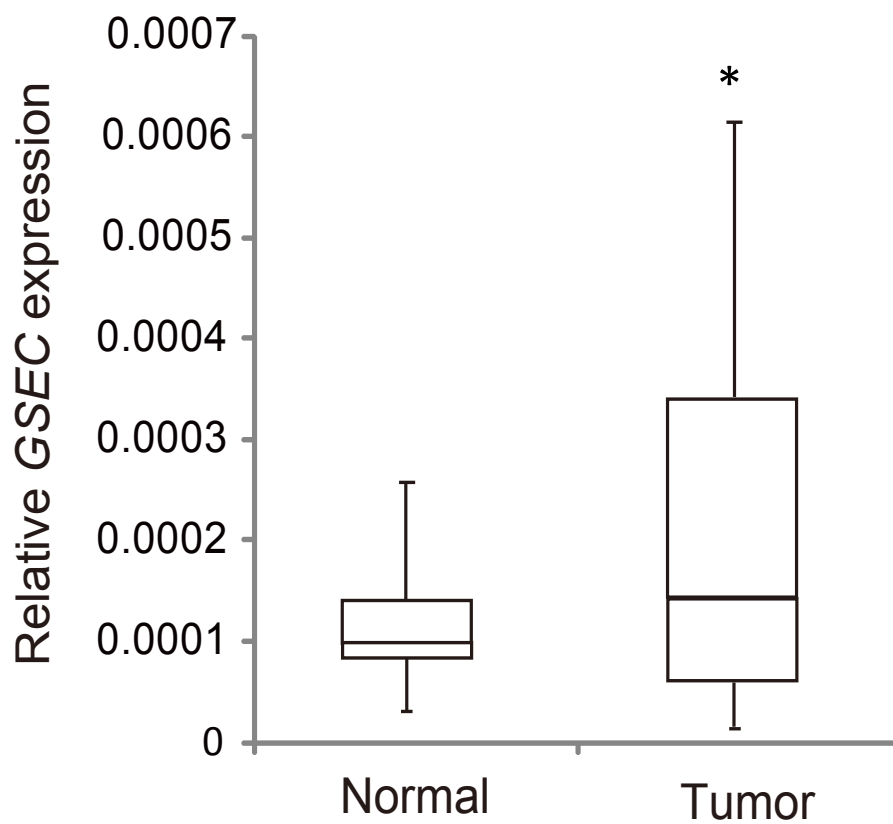


Figure 5 GSECはがんで発現が高い

大腸がん検体のがん組織および正常部におけるGSECの発現解析。*GSEC*の発現量をqRT-PCRにより定量した。内部標準として*Actin*をもちいた。n=22

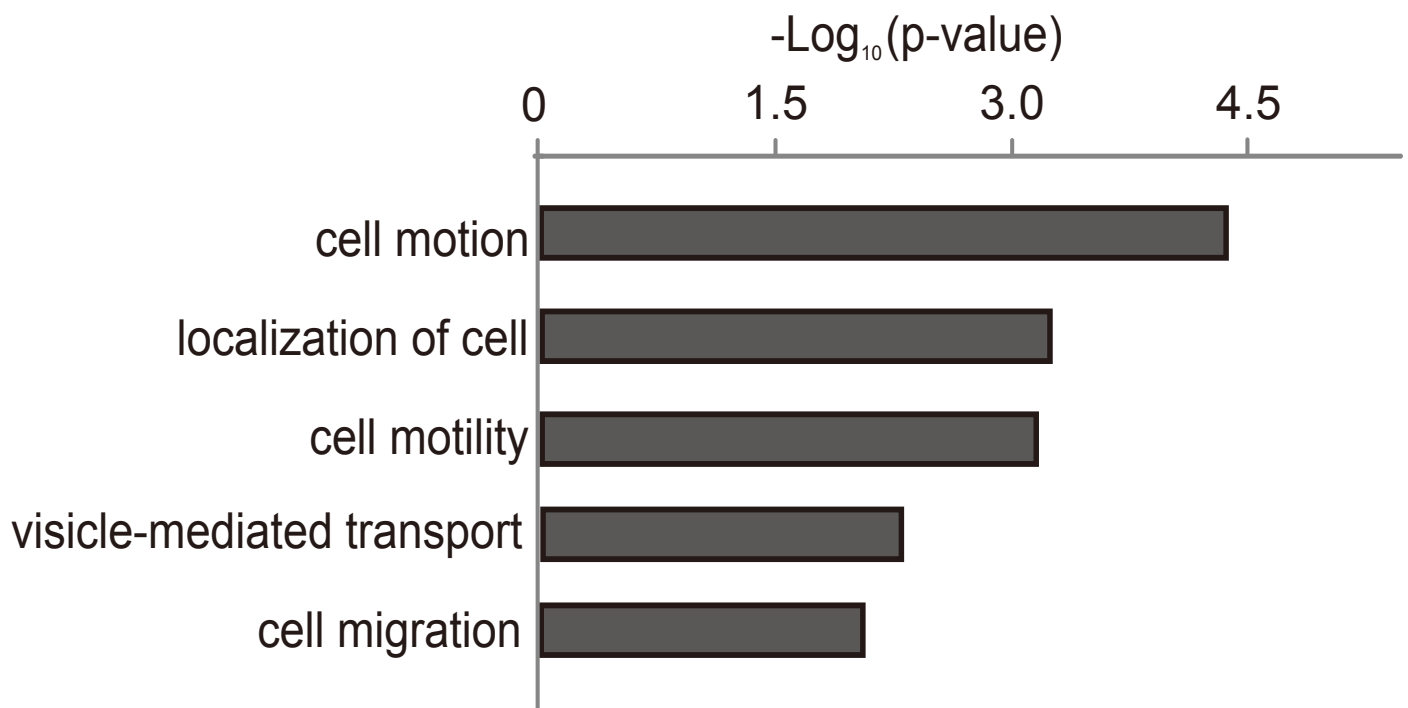


Figure 6 大腸がん検体において発現量が*GSEC*と正の相関を示す遺伝子群のGO解析

TCGAデータベースに登録されている大腸がん検体の遺伝子発現プロファイル(n=192)において*GSEC*と正の相関を示す遺伝子群($r>0.3$)のGO解析を行った。

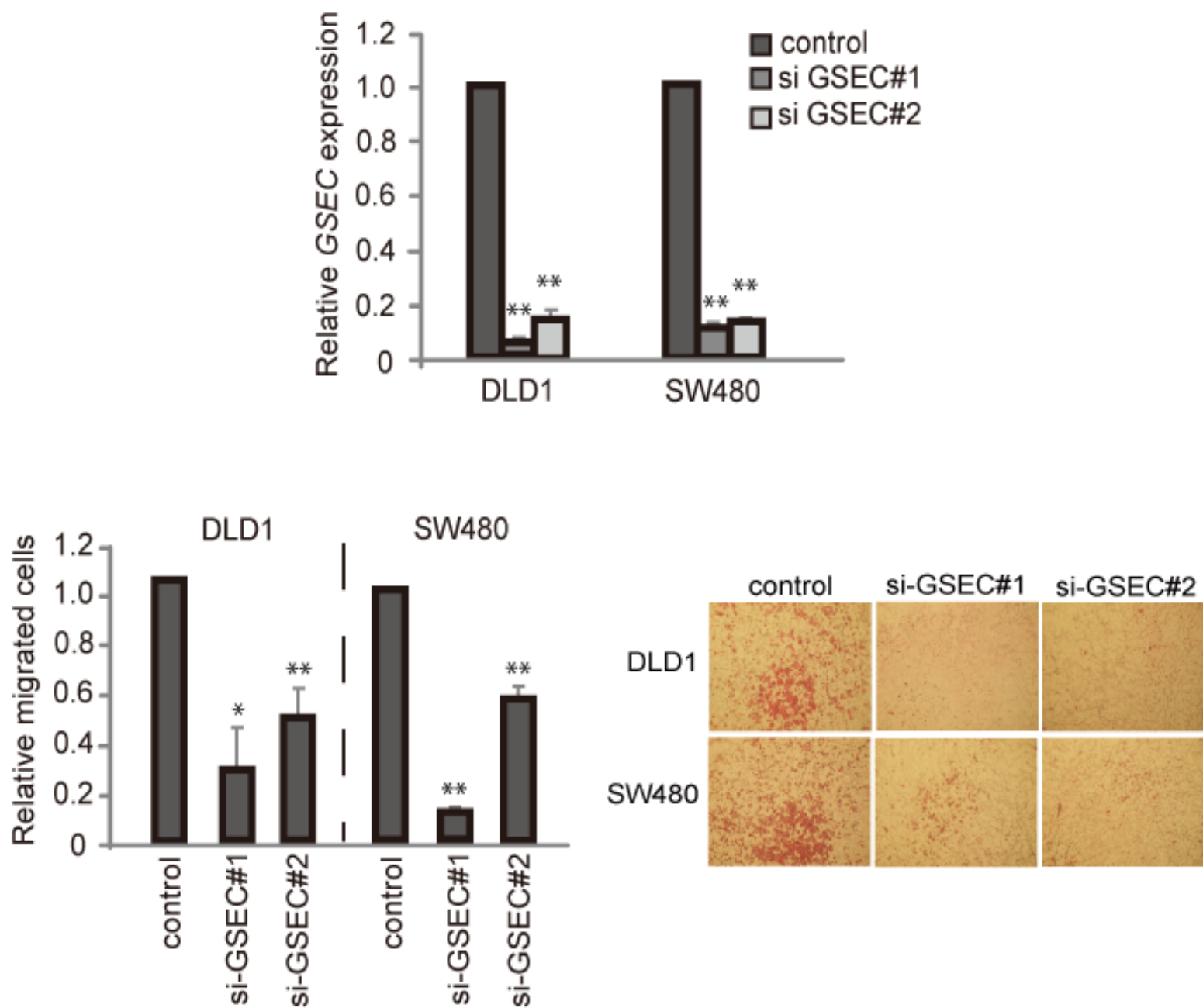


Figure 7 *GSEC*の発現抑制によって大腸がん細胞の運動能が低下する

(上) *GSEC*を発現抑制したDLD-1細胞、SW480細胞における*GSEC*のqRT-PCR解析。*GSEC*に対する異なる2種類のsiRNAを実験に用いた。値は*HPRT1*で補正した相対発現量を示す(平均値±標準偏差、n=3)。**: $p < 0.01$ 。

(左下) DLD-1細胞および、SW480細胞に各siRNAをトランスフェクションし、Transwell migration chamberを用いてトランスウェルアッセイを行った。値は移動した細胞数を示す(平均値±標準偏差、n=3)。*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 。

(右下) トランスウェルアッセイにおける移動した細胞をH&E染色した。

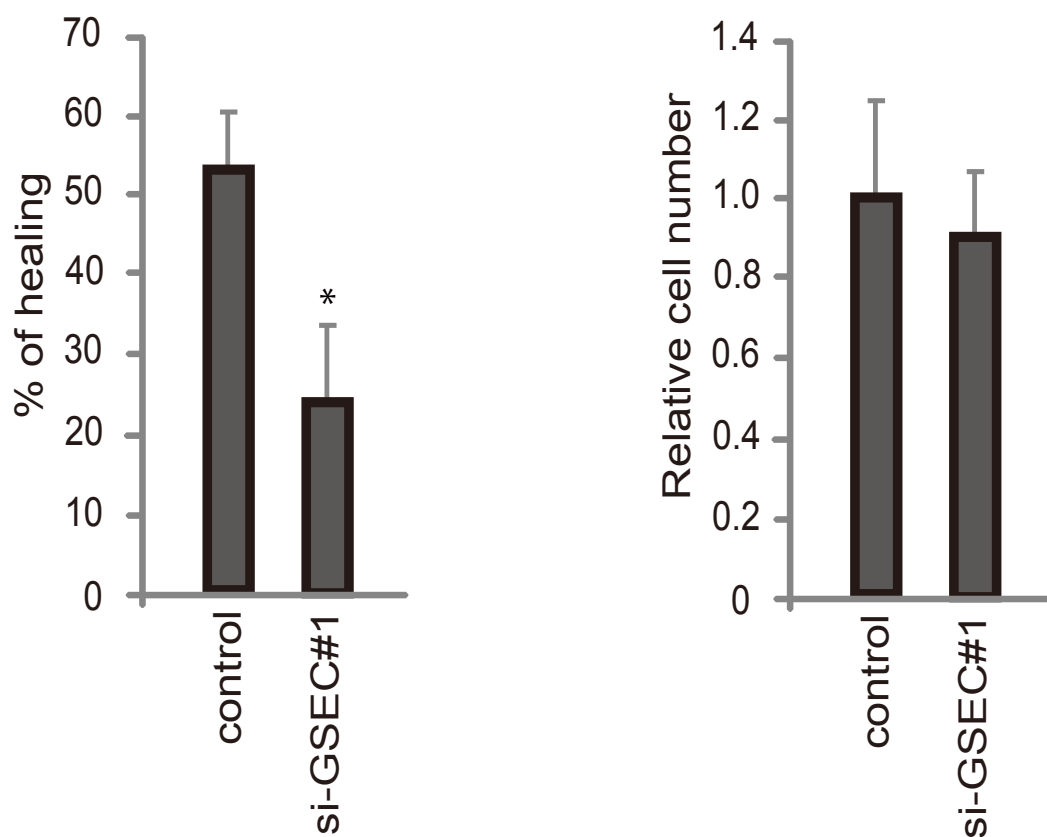


Figure 8 *GSEC*の発現抑制によって大腸がん細胞の運動能が低下する

(左) DLD-1細胞に各siRNAをトランスフェクションし、Wound healing assayに供した。(平均値±標準偏差、n=3)。*: $p<0.05$ 、**: $p<0.01$ 。

(右) DLD-1細胞に各siRNAをトランスフェクションし、3日後の細胞数をカウントした。(平均値±標準偏差、n=3)。

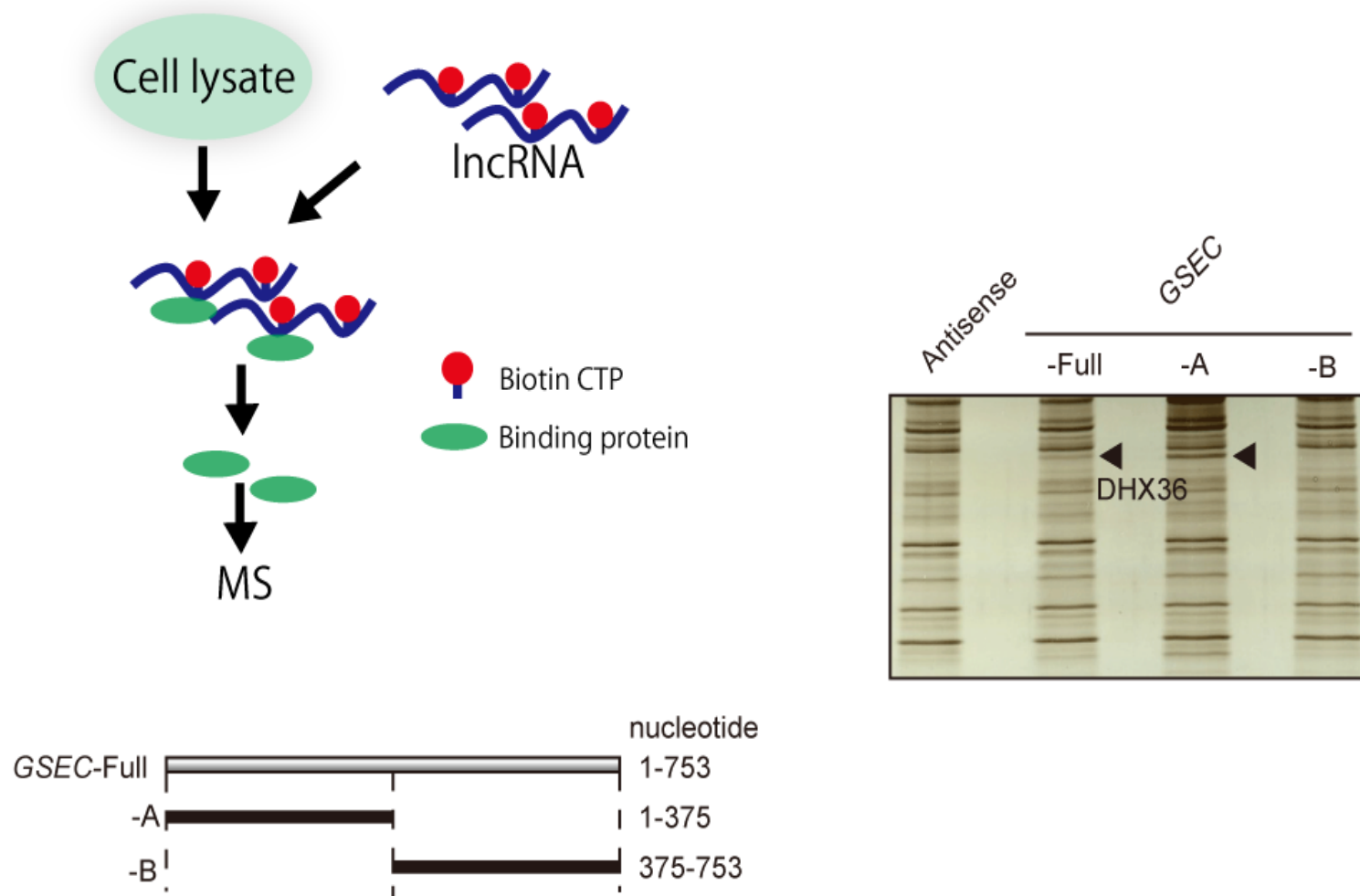


Figure 9 *GSEC*結合タンパク質の探索

(左上) *GSEC*結合タンパク質の精製スキーム。ビオチン化CTPでラベルした*GSEC*と細胞抽出液を混和し、ストレプトアビジンを用いてタンパク質と*GSEC*の複合体を精製した。

(左下) 精製に用いた全長および、断片化した*GSEC*の模式図

(右) *GSEC*結合タンパク質の銀染色像。*GSEC*結合タンパク質をSDS-PAGEで展開後、銀染色によって可視化した。アンチセンスの*GSEC*をコントロールとして用いた。センス鎖特異的なバンドを切り出してMS解析に供した。

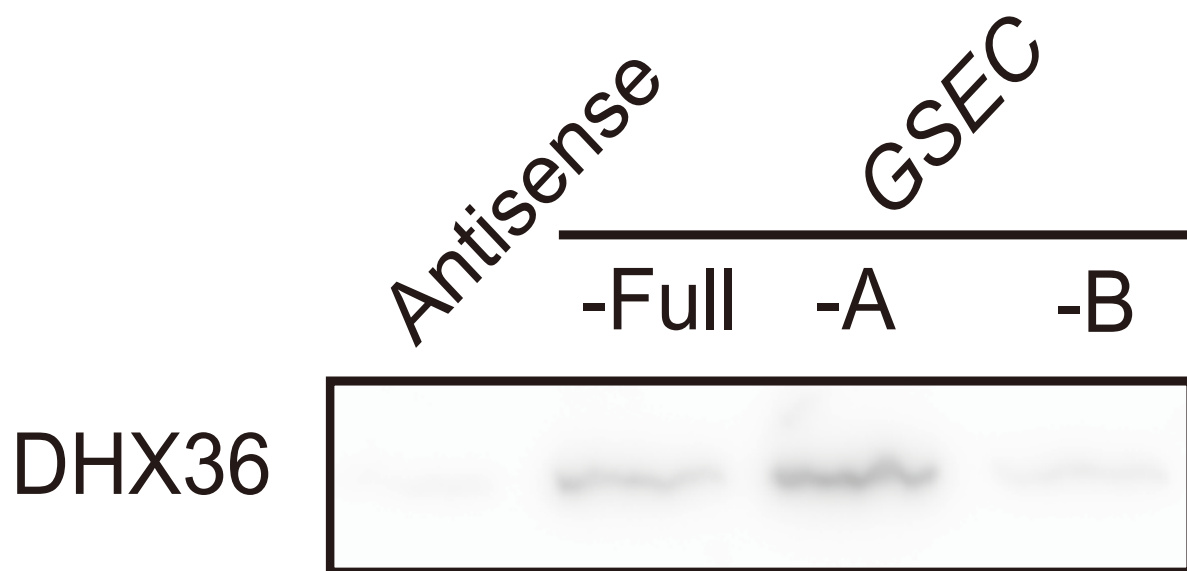


Figure 10 *GSEC*はDHX36と結合する（ビオチンプルダウン）

ビオチン化CTPでラベルした *GSEC*と細胞抽出液を混和し、ストレプトアビジンを用いた pull-downによって *GSEC*の結合タンパク質を精製した。得られた産物をSDS-PAGEで展開後、抗DHX36抗体を用いたウエスタンブロッティングによって *GSEC*とDHX36の結合を確認したアンチセンスの *GSEC*をコントロールとして用いた。

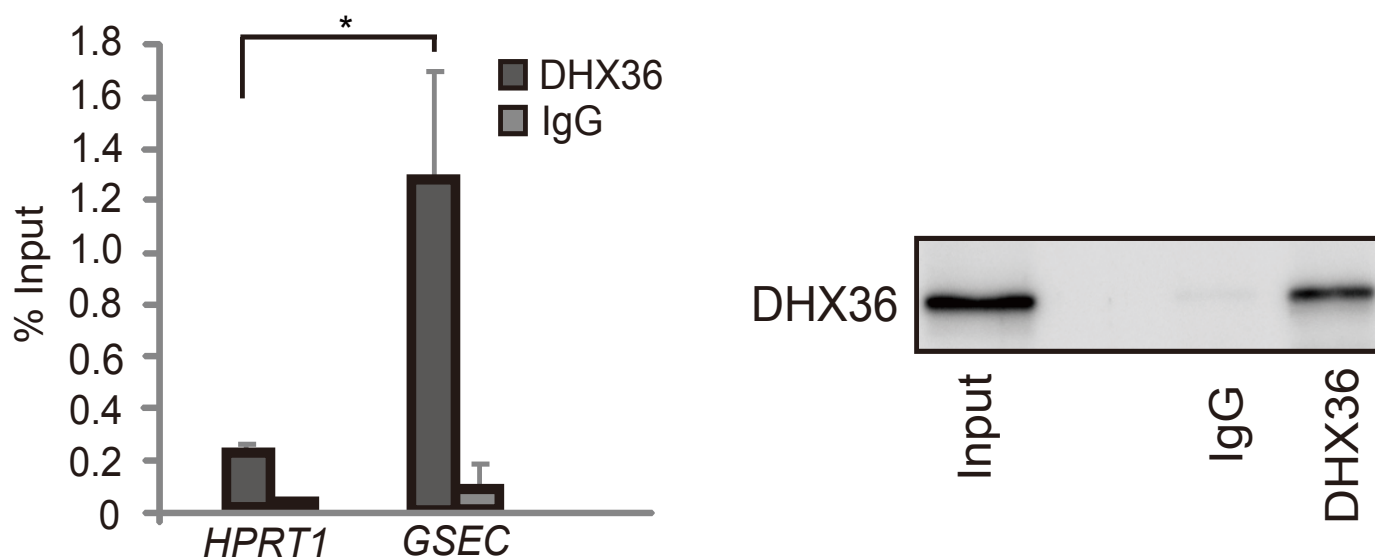


Figure 11 *GSEC*はDHX36と結合する (RIP assay)

(左) 抗DHX36抗体およびIgGを用いてRIP assay を行った。 *HPRT1*をコントロールとして用いた。(平均値±標準偏差、n=3)。*:p<0.05。
(右) RIPサンプルのウェスタンブロッティング解析。

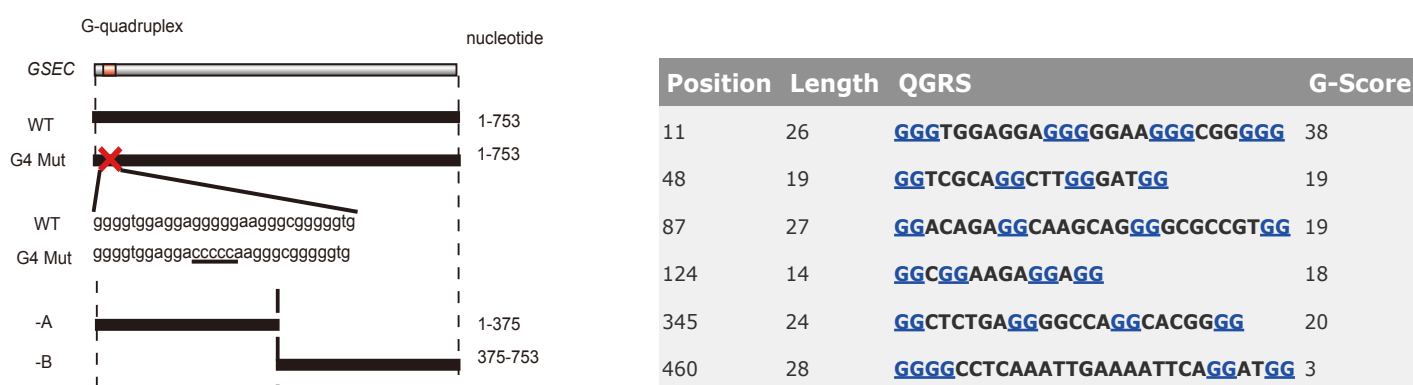


Figure 12 *GSEC*はG-quadruplex構造を持っている

(左) *GSEC*転写産物の模式図。赤い印がG-quadruplex構造を示す。模式図に示した変異体は今後の実験に用いた。

(右) *GSEC*の塩基配列をQGRA mapperによって解析した。11-26部分の塩基が高いスコアをしめした。

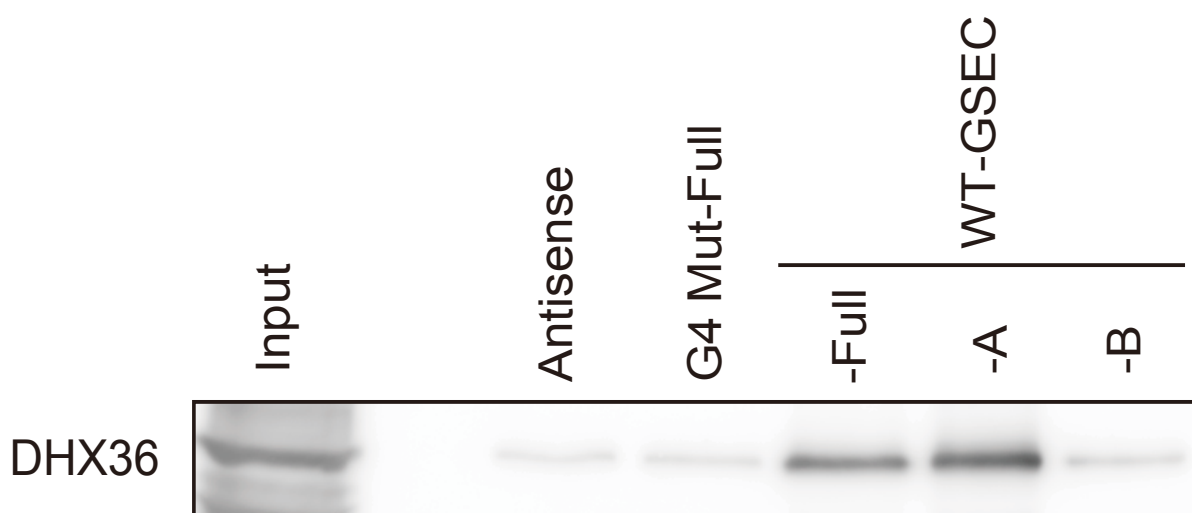


Figure 13 *GSEC*はG-quadruplexを介してDHX36と結合している

ビオチン化CTPでラベルした *GSEC* と細胞抽出液を混和し、ストレプトアビジンを用いた pull-down によって *GSEC* の結合タンパク質を精製した。得られた産物を SDS-PAGE で展開後、抗DHX36抗体を用いたウエスタンブロッティングによって *GSEC* と DHX36 の結合を確認したアンチセンスの *GSEC* をコントロールとして用いた。G4 MutはG-quadruplex構造を形成しない *GSEC* の変異体を示す。

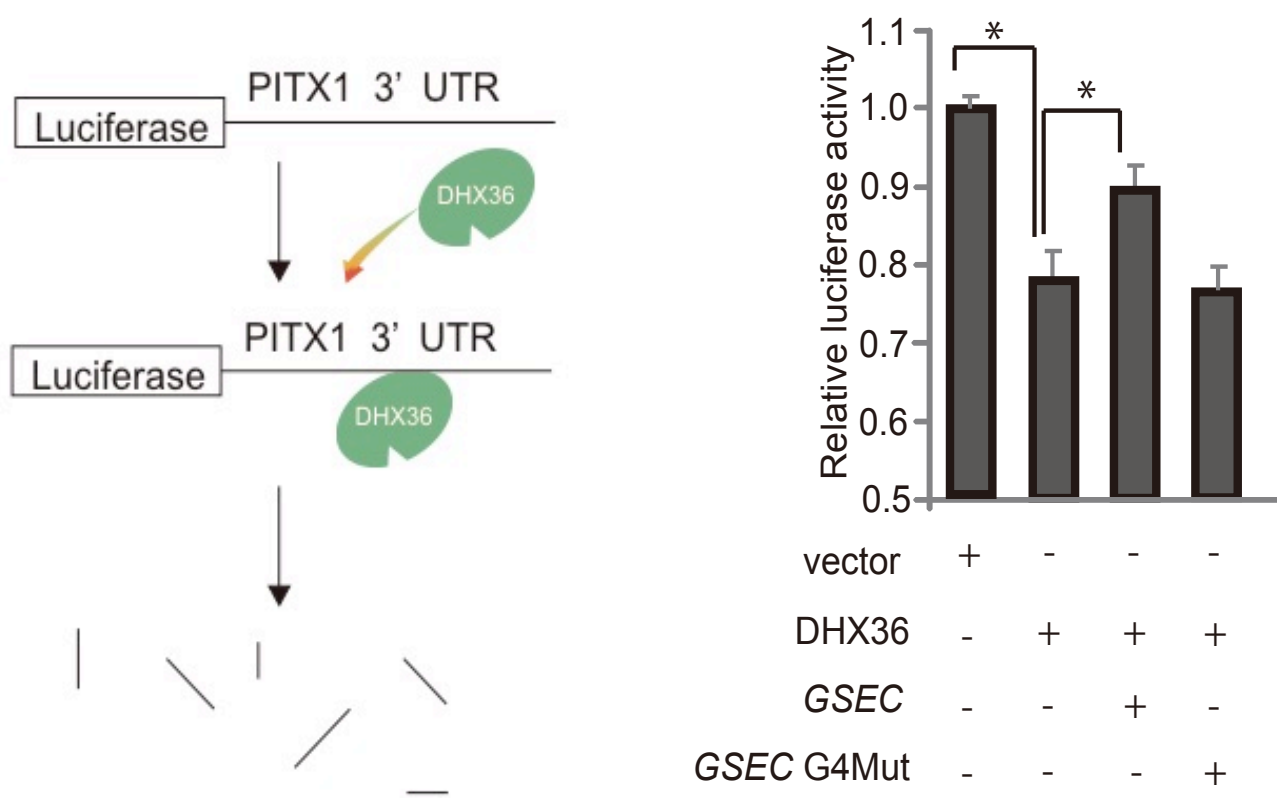


Figure 14 GSECはDHX36の活性を阻害する

(左) レポーターアッセイに用いたコンストラクト。ルシフェラーゼ遺伝子の下流にPITX1遺伝子の3'UTR 配列を連結させた。3'UTR 中のG-quadruplexがDHX36によって解かれるとルシフェラーゼmRNAが分解され、ルシフェラーゼ活性が低下する。

(右) DLD-1細胞にGSECとDHX36を発現させて、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールとしてGSEC G4 Mutを用いた。

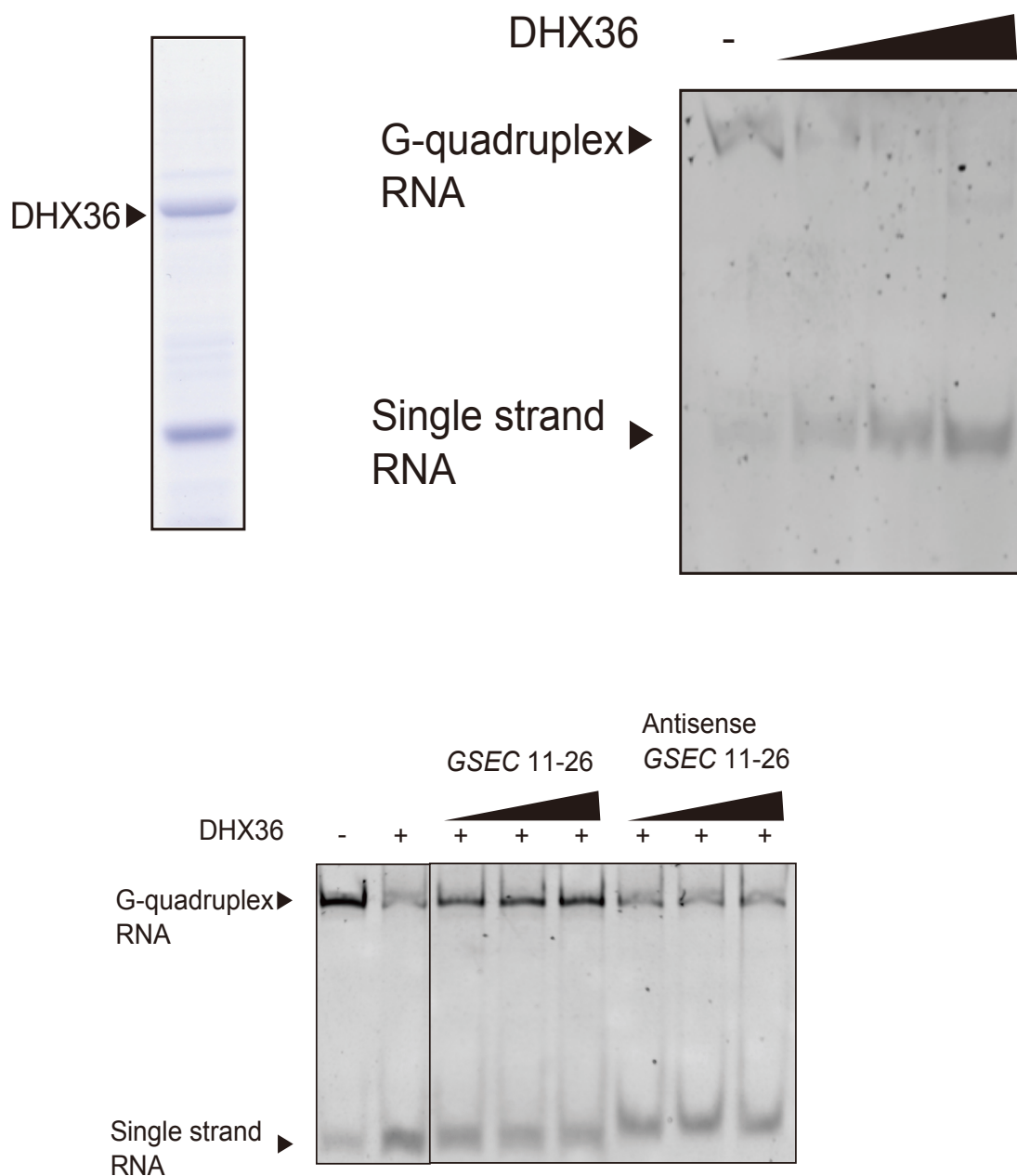


Figure 15 *GSEC*のG-quadruplexは in vitroでDHX36の活性を阻害する

(上) FLAGタグ融合DHX36をHEK293細胞に発現させ、抗FLAG抗体を用いて精製した。精製タンパクはSDS-PAGEによって展開後、CBB染色によって可視化した。精製タンパクの活性はG-quadruplex resolving assay によって確認した。

(下) *GSEC*存在下、非存在下でのDHX36を用いたG-quadruplex RNA resolution assays。1 pmolのG-quadruplex RNA基質をDHX36と混和し、10%の非変性PAGEによって展開した。アッセイは*GSEC*のG-quadruplex形成配列またはアンチセンス存在下で行った。

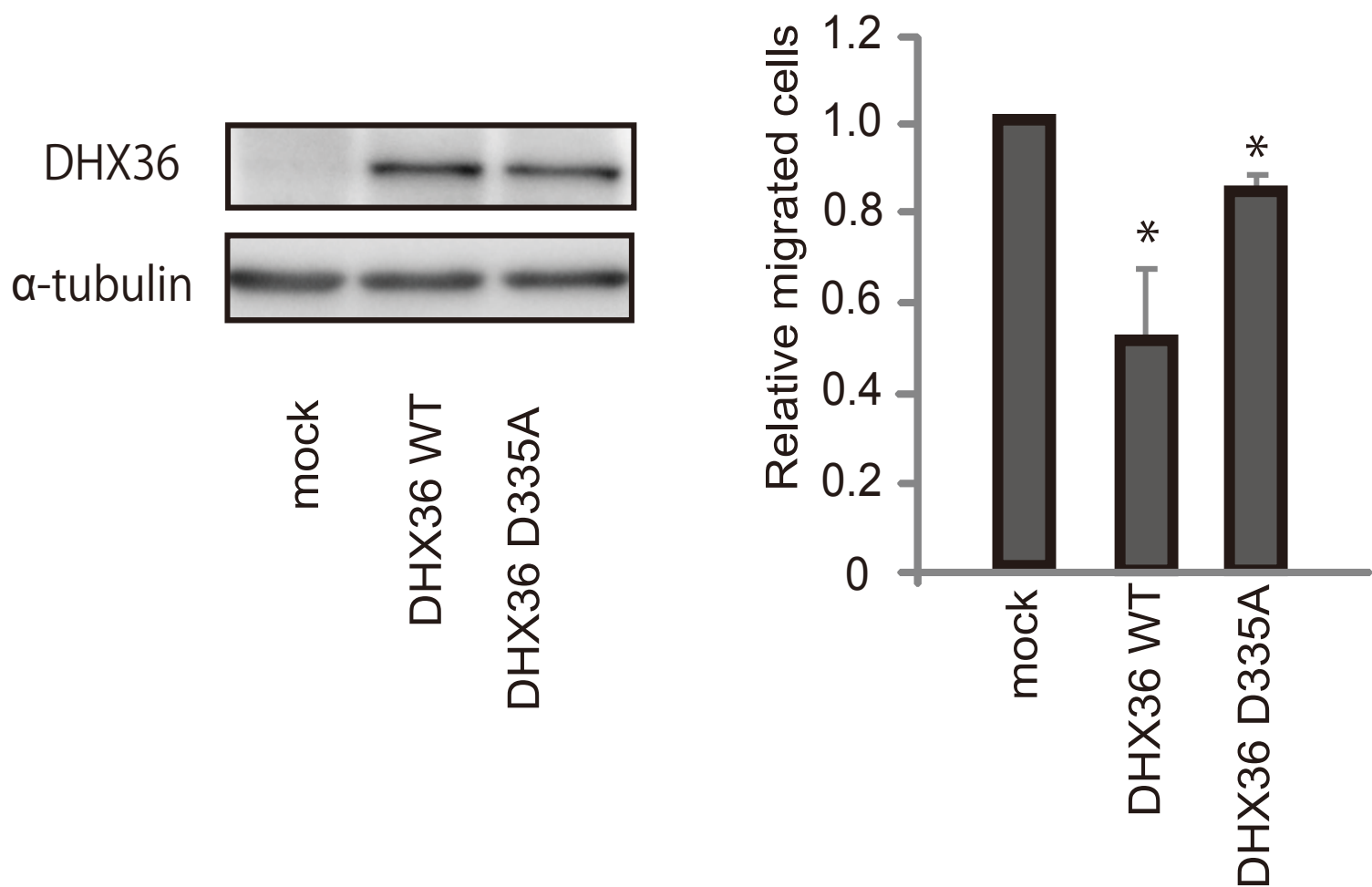


Figure 16 DHX36の強制発現によってDLD-1細胞の運動能が抑制される

(左) DHX36およびDHX36の活性変異体(D335A)をDLD-1細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液をウェスタンブロッティング解析に供した。

(右) DHX36およびDHX36の活性変異体(D335A)をDLD-1細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液をトランスウェルアッセイに供した。(平均値±標準偏差、n=3)。

*:p<0.05。

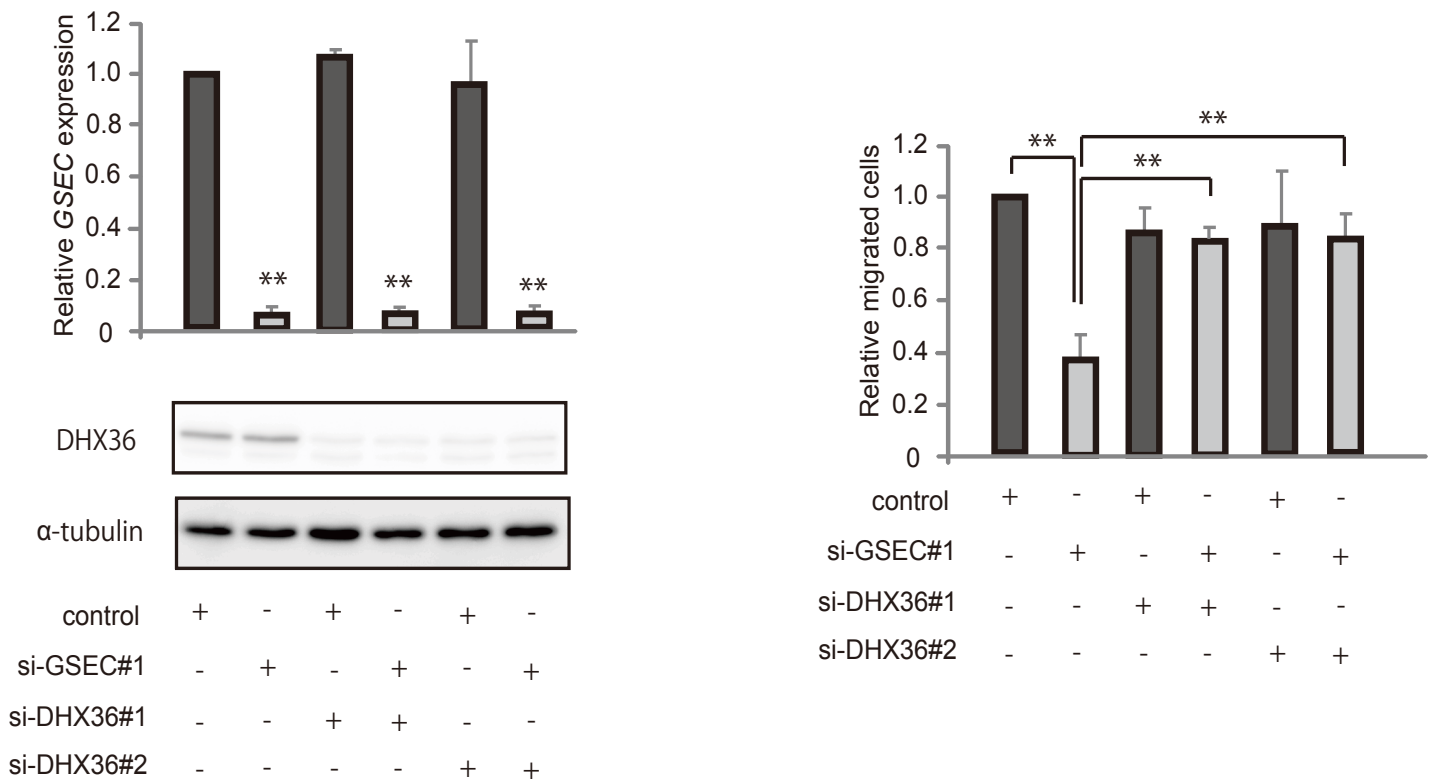


Figure 17 DHX36の発現抑制によって細胞運動能がレスキューされる

(左) *GSEC*およびDHX36を発現抑制したDLD-1細胞における*GSEC*とDHX36の発現量。値はHPRT1で補正した相対発現量を示す (平均値±標準偏差、n=3)。*:p<0.05、**:p<0.01。内部標準としてα-Tubulinを用いた。

(右) DLD-1細胞および、SW480細胞に各siRNAをトランスフェクションし、Transwell migration chamberを用いてトランスウェルアッセイを行った。示す (平均値±標準偏差、n=3)。*:p<0.05、**:p<0.01。

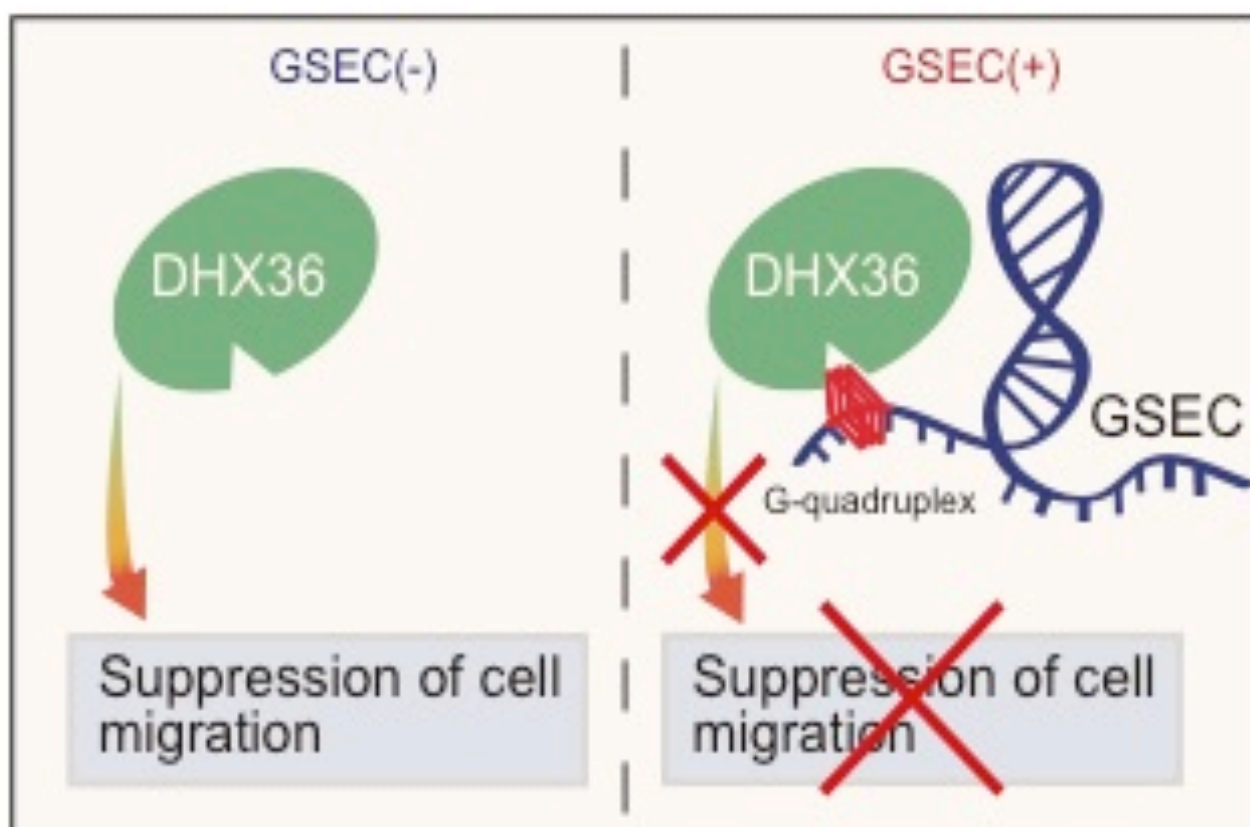


Figure 18 *GSEC*がDHX36を介して細胞運動能を制御しているモデル図

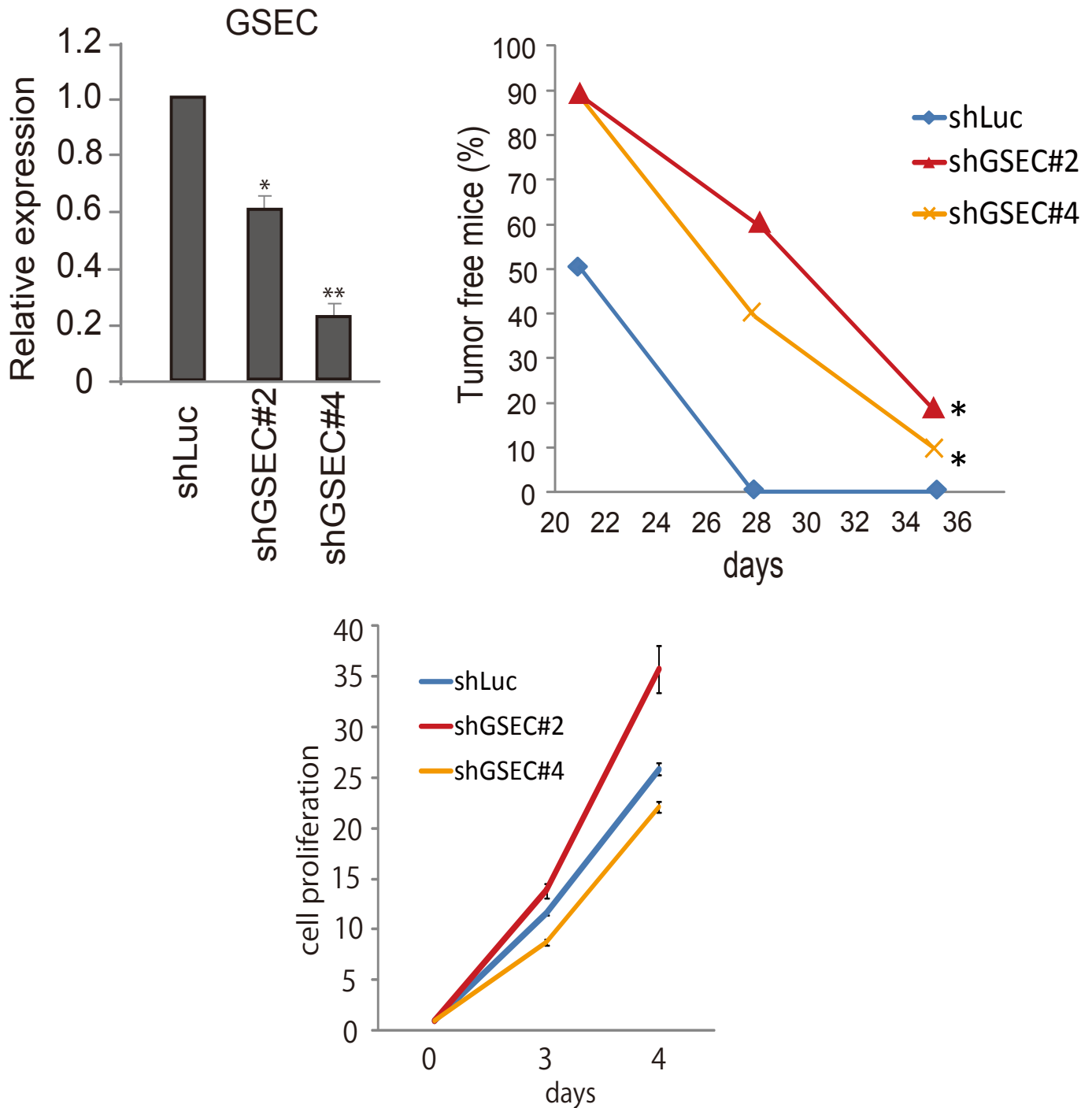


Figure 19 *GSEC*の発現抑制によって腫瘍の生着が抑制される

(左上) *GSEC*を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスを感染させたHCT116細胞における*GSEC*のqRT-PCR解析。*GSEC*に対する異なる2種類のshRNAを実験に用いた。値は*HPRT1*で補正した相対発現量を示す(平均値±標準偏差、n=3)。**:p<0.01(平均値±標準偏差、n=3)。*:p<0.05、**:p<0.01。

(右上) *GSEC*を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスを感染させたHCT116細胞をマウスの皮下に移植し、腫瘍の形成が確認されるまでの日数を計測した。コントロールとしてLuciferaseに対するshRNAを用いた。n=10。*:p<0.05。

(下) *GSEC*を発現抑制したHCT116細胞の平面培養条件下における細胞増殖(平均値±標準偏差、n=3)。

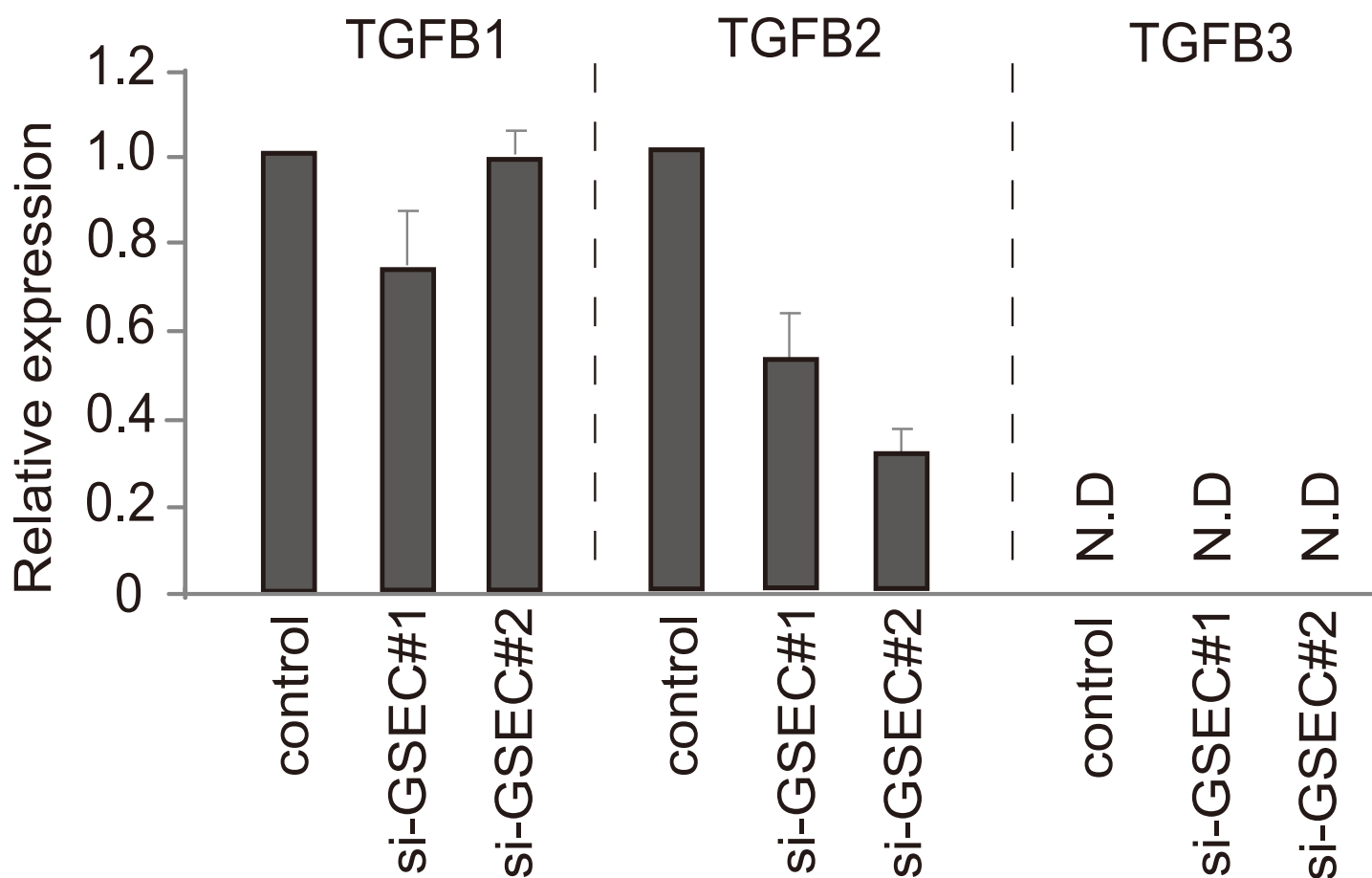


Figure 20 *GSEC*の発現抑制によって*TGFB2*の発現量が低下する

*GSEC*を発現抑制したHCT116細胞における*TGFB1*、*TGFB2*、*TGFB3*のqRT-PCR解析。*GSEC*に対する異なる2種類のsiRNAを実験に用いた。値は*HPRT1*で補正した相対発現量を示す(平均値±標準偏差、n=2)。

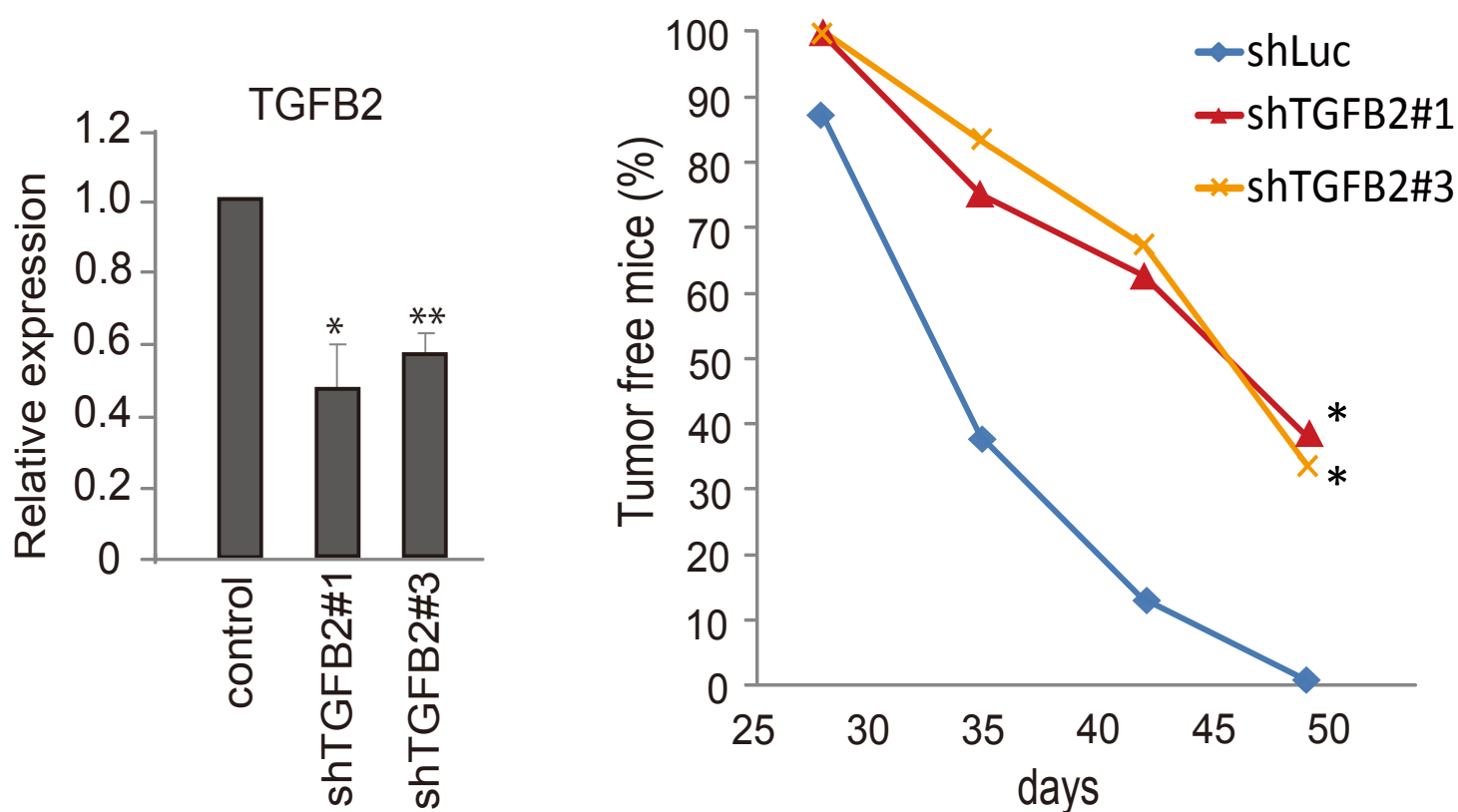


Figure 21 *TGFB2*の発現抑制によって腫瘍の生着が抑制される

(左) *TGFB2*を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスを感染させたHCT116細胞における*TGFB2*のqRT-PCR解析。*TGFB2*に対する異なる2種類のshRNAを実験に用いた。値は*HPRT1*で補正した相対発現量を示す(平均値±標準偏差、n=3)。**:p<0.01 (平均値±標準偏差、n=3)。*:p<0.05、**:p<0.01。

(右)*TGFB2*を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスを感染させたHCT116細胞をマウスの皮下に移植し、腫瘍の形成が確認されるまでの日数を計測した。コントロールとしてLuciferaseに対するshRNAを用いた。n=7~8。*:p<0.05。

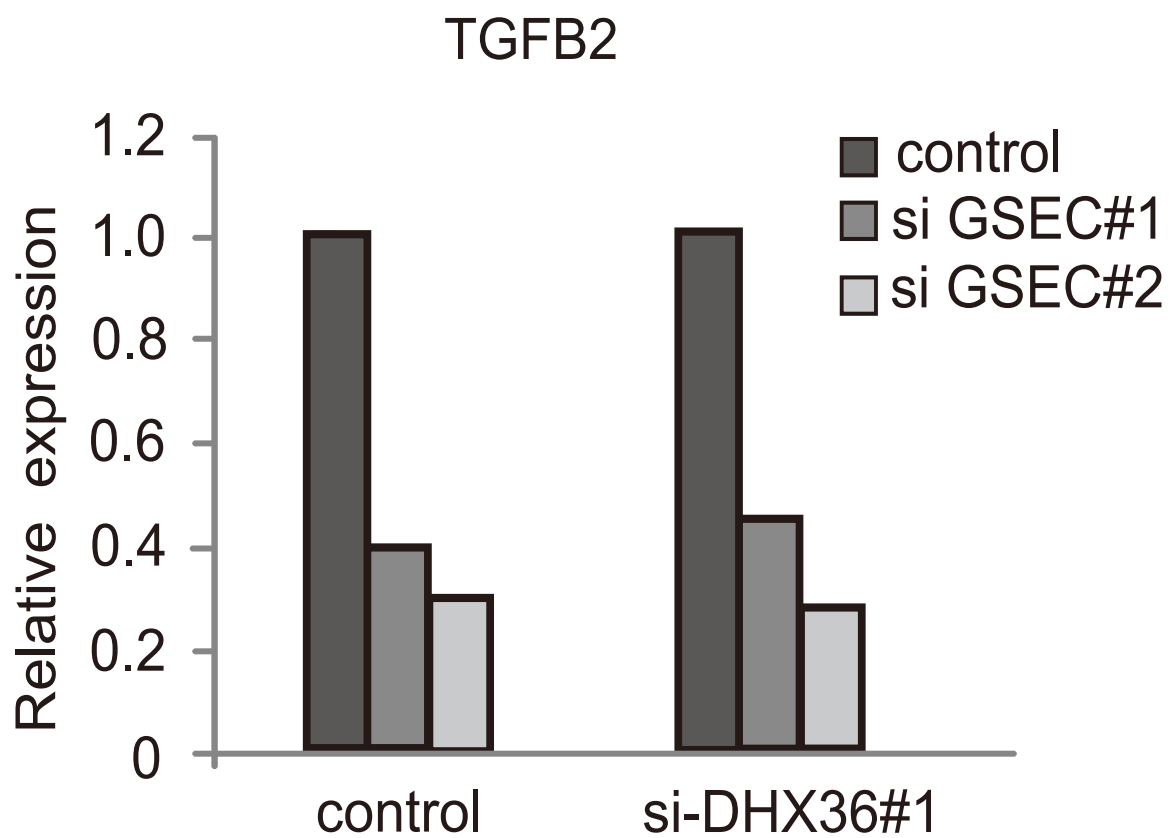


Figure 22 DHX36の発現抑制しても *TGFB2*の発現量はレスキューされない

*GSEC*およびDHX36を発現抑制したHCT116細胞における *TGFB2*の発現量。値はHPRT1で補正した相対発現量を示す (n=1)。

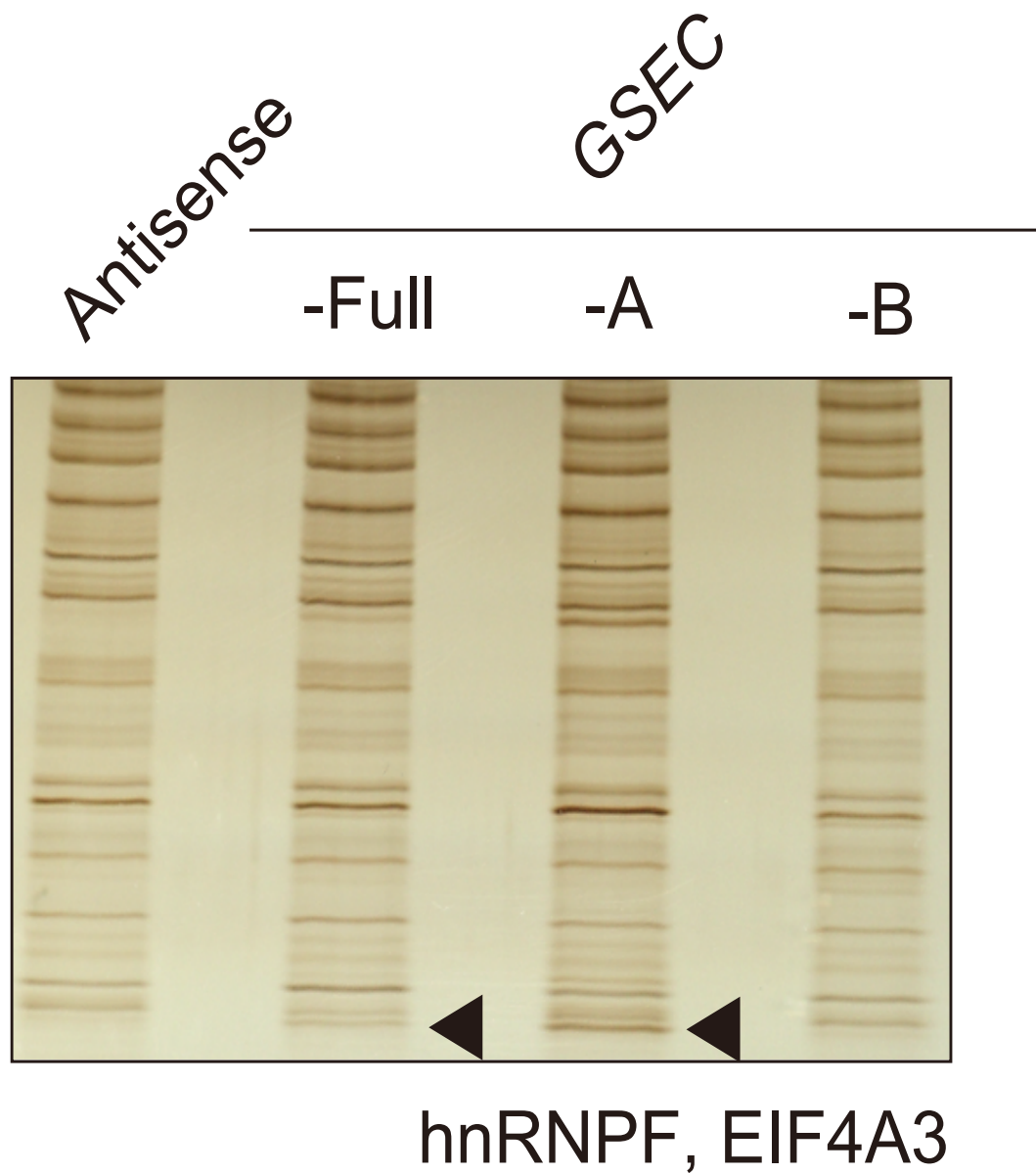


Figure 23 *GSEC*はhnRNPFと結合する

*GSEC*結合タンパク質の銀染色像。*GSEC*結合タンパク質をSDS-PAGEで展開後、銀染色によって可視化した。アンチセンスの*GSEC*をコントロールとして用いた。センス鎖特異的なバンドを切り出してMS解析に供した。

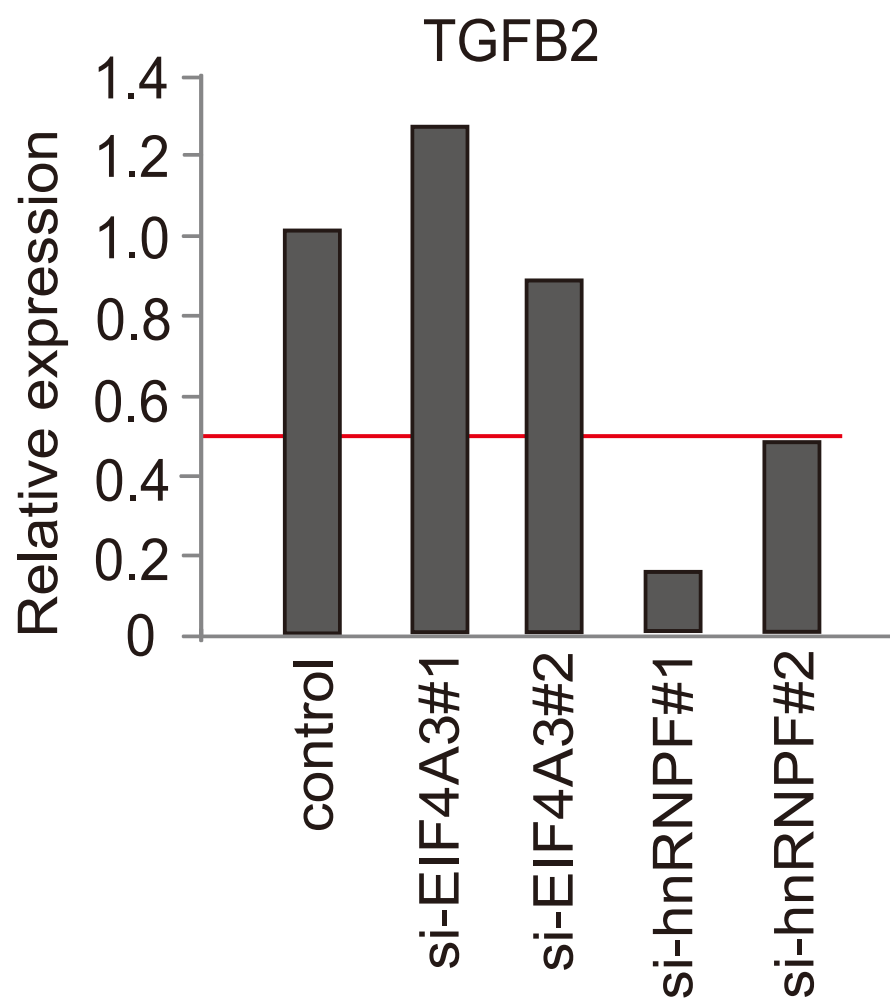


Figure 24 hnRNPFの発現抑制によって*TGFB2*の発現が低下する

*GSEC*を発現抑制したHCT116細胞における*TGFB2*のRT-PCR解析。*GSEC*に対する異なる2種類のsiRNAを実験に用いた。値はHPRT1で補正した相対発現量を示す。赤線は発現量0.5のラインを示す。

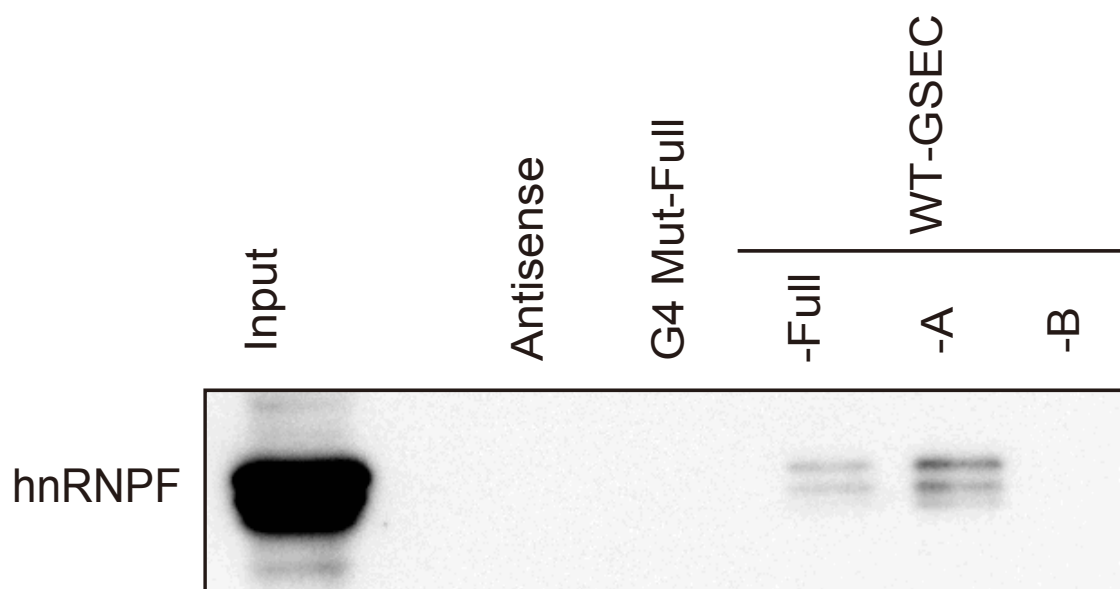


Figure 25 *GSEC*はhnRNPFと結合する

ストレプトアビジンを用いてタンパク質と *GSEC* の複合体を精製した。 *GSEC* 結合タンパク質をSDS-PAGEで展開後、抗hnRNPF抗体を用いたウエスタンブロッティングによって *GSEC* とhnRNPFの結合を確認したアンチセンスの *GSEC* をコントロールとして用いた。G4 MutはG-quadruplex形成する配列に変異を導入した *GSEC* を示す。

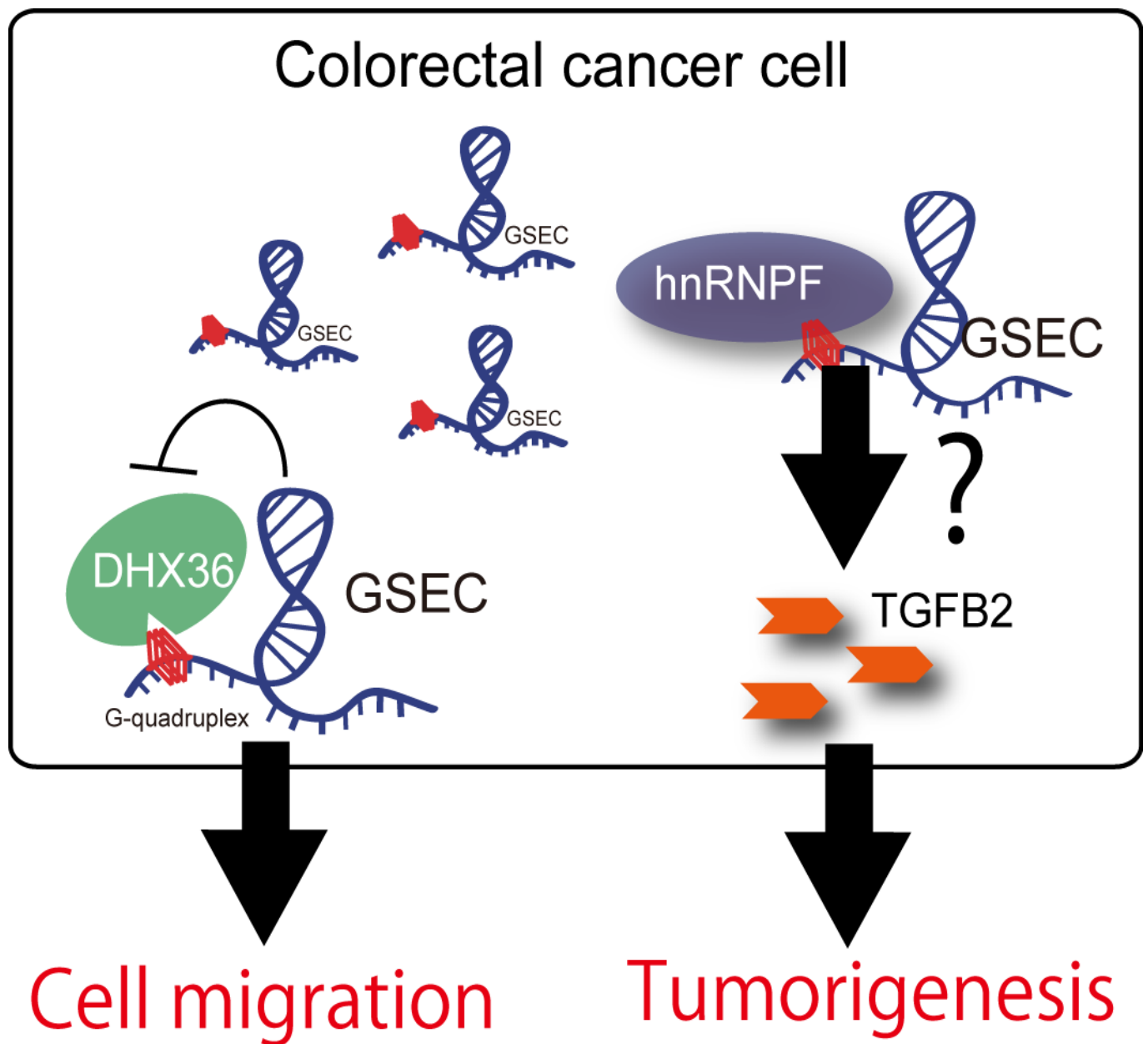


Figure 26 *GSEC*の大腸がんにおける機能のモデル図

*GSEC*は大腸がん細胞において、DHX36の機能を抑制することで細胞の運動能を亢進しており、一方でhnRNPFと協調して働くことでTGFB2の発現を促進している。分泌されたTGFB2は間質に存在する細胞群に作用し、がん細胞の生存に有利な微小環境を作り出していると考えられる。

謝辞

本研究にあたり、私を学生として受け入れてくださり、終始ご指導・ご鞭撻をいただ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、秋山徹教授に心より御礼申し上げます。また、日々の実験と研究室生活のあらゆる場面でお世話になりました、秋山研の皆様がこの場を借り手御礼申し上げます。特に、川崎先生には実験に対する助言から、結果についての議論に至まで丁寧にご指導を賜りました。加えて、精神的に辛い時期にも支えてくださり厚く御礼申し上げます。

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。大腸がん検定の検体を提供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、東京大学分子細胞生物学研究所白鬚研究員のスタッフの皆様。

FACS 操作を行うにあたって多くの助言を与えてくださった宮田奈保子氏。

常に隣でディスカッションに付き合ってください、また、研究のみならず人としての在り方を教えてくださった宮本昌弥博士、杉政宏信博士に深く感謝いたします。特に宮本博士には公私ともにお世話になり、秋山研に来てからの生活を本当に素晴らしいものとしてくださりました。大腸がんグループの実験を手伝ってくださった奥野ます美氏、須田咲子氏、後輩として研究生活を豊かなものとしてくださった中村次郎君に感謝致します。最後に、研究生活を見守ってくださった家族に深く御礼申し上げます。

2015 年 12 月 松村 厚佑