

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 25 年度博士課程 進学  
氏名 松村 厚佑  
指導教員 秋山 徹

論文題目 大腸がんにおける新規長鎖非コード RNA の機能解析

### 序論

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。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らることで再発、転移のメカニズムが説明されつつある。

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。特に、長さが 200 塩基以上あるものは長鎖非コード RNA (long non-coding RNA ; lncRNA) と呼ばれている。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、といった生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。また、いくつかの lncRNA はがんにおいて発現異常が起こっており、がん遺伝子としての機能を持っていることが示されてきた。

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、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

当研究室では、CD133、CD44 抗原を指標にした FACS 分取により大腸がん検体からがん幹細胞を単離する手法を既に確立していたため、実験には CD133、CD44 陽性がん幹細胞を用いた。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い、CD133/CD44 陽性細胞において 3 倍以上発現の高い 29 個の lncRNA を抽出した。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 種の lncRNA からさらに正常腸管組織に比べて大腸がん組織で発現亢進しているものを選択し、LOC100506054、FLJ39051 の 2 遺伝子を同定することに成功した。2 つの新規 lncRNA のうち、本研究では FLJ39051 について機能解析を行った。FLJ39051 はその後の機能解析から G-quadruplex 構造をもっていることが明らかとなった。この特徴に基づいて筆者らはこの新規 lncRNA を *GSEC* (G-quadruplex forming sequence containing lncRNA) と命名した。

### *GSEC* による大腸がん細胞の運動能亢進機構の解明

*GSEC* の大腸がんにおける機能解析の足がかりを得る為に、まず大腸がん検体における *GSEC* の発現解析を行った。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を抽出し GO 解析を行ったところ、cell motion といった細胞運動に関する GO term が有為に出現した。この結果から、*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が示唆された。がんの浸潤や転移といった性質にはがん細胞の運動能が大きく関わっている。そこで、*GSEC* の細胞運動能への影響をトランスウェルアッセイ、wound healing アッセイにより検討したところ、*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ことが明らかとなった。

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。そこで、*GSEC* が大腸がん細胞の運動能を調節するメカニズムを明らかにするために、ビオチンラベルした *GSEC* をベイトに用いた pull-down 法により *GSEC* 結合タンパク質の探索を行い、DHX36 を同定した。DHX36 は DEAH-box RNA ヘリカ

ーゼファミリーに属しており、DNA、RNA 中に存在する特殊な二次構造である G-quadruplex を解きほぐす活性を持っていることが知られている。さらに、DHX36 はこの活性を介して細胞内で転写、mRNA の安定性を制御している。*GSEC* の塩基配列解析の結果、*GSEC* は G-quadruplex 構造をもっており、G-quadruplex を介して DHX36 と結合していることが明らかとなった。さらに、レポーターアッセイ、リコンビナントの DHX36 を用いた *in vitro* G-quadruplex resolving assay により *GSEC* が DHX36 の働きを抑えることを見いだした。

最後に、*GSEC* は DHX36 依存的なメカニズムで細胞運動の亢進を引き起こしているのかをダブルロックダウン実験により検討した。*GSEC* の発現を抑制しておくことと細胞の運動能が低下するが、DHX36 を同時にロックダウンしておくこと、低下した運動能が殆ど完全にレスキューされた。以上の結果から、*GSEC* は細胞運動抑制能を持つ DHX36 の働きを抑制することで、大腸がん細胞の運動能を亢進していることが示唆された。

#### 大腸がん細胞の造腫瘍過程における *GSEC* の機能解析

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。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。shRNA を用いて *GSEC* を恒常的に発現抑制した HCT116 細胞の免疫不全マウスへの移植実験によって、*GSEC* の発現抑制により腫瘍の生着が抑制されることを見いだした。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。このユニークな表現型が TGF- $\beta$  シグナルを抑制した際の xenograft モデルの結果と極めて似通っていたため、*GSEC* が TGF- $\beta$  の発現に与える影響を検討したところ、*GSEC* の発現抑制に伴い *TGFB2* の発現が低下することが明らかとなった。従って、*TGFB2* は *GSEC* の下流因子として働いている可能性があると考えられた。さらに、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も大腸がん細胞の生着が抑制された。

続いて、*GSEC* が *TGFB2* の発現を制御しているメカニズムに DHX36 が関わるか検討したが、DHX36 の発現抑制によって *TGFB2* の発現がレスキューされないことから、*TGFB2* の発現調節において *GSEC* は DHX36 が関わる機構とは別のメカニズムで働いていると考えられた。そこで、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、*GSEC* 結合タンパク質として新たに hnRNPF を同定した。さらに、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。これらの結果から、*GSEC*

は hnRNPF と協調して *TGFB2* の発現を促進することで大腸がん細胞の造腫瘍性維持に働いている可能性が示唆された。

## 考察

本研究では新規 lncRNA *GSEC* の発現が大腸がんにおいて亢進していること、さらにその発現を抑制することによって細胞運動能および造腫瘍能の低下が引き起こされることを見いだした。そのメカニズムとして *GSEC* は *DHX36* の活性を抑制することで細胞運動能の亢進を引き起こしていることを明らかにした。また、一方で hnRNPF と協調的に働くことで造腫瘍能を維持していることも判明した。これまでの実験結果から、*GSEC* が *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。一般にデコイ RNA は、標的タンパク質との結合コンセンサス配列を持っているが、*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、本来の標的と競合していると推測される。また、hnRNPF と *GSEC* による *TGFB2* の発現制御機能の詳細は不明であるが、hnRNPF、*GSEC* 双方ともに細胞質に局在している。現在までに細胞質 lncRNA の作用としては、分子デコイ、タンパク質の標的へのリクルートのためのガイド、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。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 のデコイとして機能している可能性も考えにくい。従って、*GSEC* は他の 2 つのメカニズム、もしくは全く新規のメカニズムで機能していると推察される。