

博士論文（要約）

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

本博士論文の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

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、2 つの新規 lncRNA を同定した。2 つの新規 lncRNA のうち、本研究では NR-Y について機能解析を行った。NR-Y 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、Protein X を同定した。Protein X は 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、Protein X 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 Protein X 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 Protein X を用いた in vitro G-quadruplex resolving assay により *GSEC* が Protein X の働きを抑えることを見いだした。

最後に、*GSEC* は Protein X 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ノ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と細胞の運動能が低下するが、Protein X 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。以上の結果から、*GSEC* は細胞運動抑制能を持つ Protein X 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 Cytokine X 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 Cytokine X 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 Cytokine X の発現が低下することが明らかとなった。従って、Cytokine X 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 Cytokine X 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、Cytokine X 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 Cytokine X の発現を制御しているメカニズムに Protein X が関わるか検討したが、Protein X の発現抑制によって Cytokine X の発現がレスキューされないことから、Cytokine X の発現調節において *GSEC* は Protein X 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 Protein Y を同定した。さらに、Protein Y 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 Protein Y と協調して Cytokine X 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 Protein X 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 Protein Y 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 Protein X 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 Protein X の結合配列である G-quadruplex を介して Protein X 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 Protein X 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、Protein Y と *GSEC* による Cytokine X の発現制御機能の詳細は不明であるが、Protein Y、*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 Protein Y の細胞内局在には影響を与えなかった。また、Protein Y と *GSEC* が協調的に働いていると考えると、この場合 *GSEC* が Protein Y 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。

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。毎年 120 万人が新たに大腸がんとして診断され、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。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れることで再発、転移のメカニズムを説明することが出来る。実際にご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。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。その後、CD133、CD44 両方のマーカーを用いる方、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。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。

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。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。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。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。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。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ヤフォールド、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。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ム抑制複合体 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。他にも DNMT3b のリクルートに働く TTF-1、HoxA クラスタから転写され、その場に WDR5 をリクルートしてくる HOTTIP 等がある。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。

スキヤフォールド

スキヤフォールド 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。スキヤフォールド 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

キャプフォールド 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。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。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。

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。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わることが知られている。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。

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。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。

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。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。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/XPB 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。

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。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。

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。

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