

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08299

研究課題名(和文) IncRNA-転写因子複合体がもたらす大腸癌の腫瘍形成能維持機構

研究課題名(英文) Mechanism of colorectal tumorigenesis caused by IncRNA-Transcription factor complex

研究代表者

谷上 賢瑞 (Taniue, Kenzui)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：90648627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんは、Wnt/ $\beta$ -catenin経路の恒常的活性化によって生じると考えられている。また、長鎖ncRNAが癌化において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。本研究課題では、大腸がんにおいて長鎖ncRNAである ASBEL 及び転写制御因子である TCF3タンパク質が  $\beta$ -catenin によって同時に発現を誘導されていることを発見した。さらに、ASBELがTCF3と複合体を形成してATF3の発現を制御することが、大腸がんの腫瘍形成能に重要であることを明らかにした。ASBEL-TCF3経路を標的とした薬剤を創製することにより、大腸がんの治療に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays a key role in the tumorigenicity of colon cancer. Furthermore, it has been reported that lncRNAs are dysregulated in several steps of cancer development. Here we show that  $\beta$ -catenin directly activates the transcription of the lncRNA ASBEL (antisense ncRNA in the ANA/BTG3) and the transcription factor TCF3, both of which are required for the survival and tumorigenicity of colorectal cancer cells. ASBEL interacts with and recruits TCF3 to ATF3 locus, where it represses the expression of ATF3. Furthermore, we demonstrate that ASBEL-TCF3-mediated down-regulation of ATF3 expression is required for the proliferation and tumorigenicity of colon tumor cells. Our results reveal a pathway involving an lncRNA and two transcription factors that plays a key role in Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated tumorigenesis. Our results suggest that the  $\beta$ -catenin-ASBEL-TCF3-ATF3 pathway may be a promising target for the therapy of colon cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：ASBEL TCF3 ATF3  $\beta$ -catenin 大腸癌 腫瘍形成能 アンチセンスRNA

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの大部分の領域からタンパク質をコードしないノンコーディング RNA (ncRNA) が大量に転写されていることが知られている。近年、長鎖 ncRNA が転写や翻訳、スプライシングに至るまで、さまざまな機能を有していること、さらに長鎖 ncRNA の発現は、細胞種や発生段階によって厳密に制御されており、増殖・分化・癌化・胚発生・神経発生・幹細胞性の維持といった生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。また、大腸がんは、APC 変異がもたらす転写因子  $\beta$ -catenin の大量蓄積による Wnt 経路の恒常的活性化により、統制された遺伝子発現プロファイルが破綻して生じると考えられてきた。しかし、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が大腸がんの発生・維持を行う仕組みについては未だ明らかになっていない点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

(1) 次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 及び ChIP-seq データを統合することによって、 $\beta$ -catenin によって直接発現制御を受ける遺伝子群を網羅的に同定する

(2) 得られた遺伝子群の中から、大腸癌の増殖に関与するが、正常大腸細胞には影響を及ぼさない lncRNA を同定し、その機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 及び ChIP-seq データを統合することによって、 $\beta$ -catenin によって直接発現制御を受ける遺伝子群を網羅的に同定する。

(2) 発現抑制実験を行い、得られた遺伝子群の中から大腸癌細胞に機能的な lncRNA の同定を行う。また、得られた lncRNA 発現抑制株を用いて RNA-seq を行い、遺伝子発現プロファイルを得る。さらに得られた遺伝子発現プロファイルを用いて、IPA upstream 解析を行うことにより、lncRNA が制御するタンパク質の推定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ASBEL は、 $\beta$ -catenin の標的となる新規 lncRNA である

$\beta$ -catenin の発現を抑制した大腸癌細胞株 DLD-1 細胞を用意し、コントロール細胞と合わせて RNA-seq 解析を行った。結果、86 lncRNA を含む 2072 遺伝子が発現亢進し、33 lncRNA を含む 1512 遺伝子が発現減少した。続いて、 $\beta$ -catenin を標的とした抗体を用いて、

ChIP-seq 解析を行い、105 lncRNA を含む 813 遺伝子のプロモーター領域に  $\beta$ -catenin が結合することが明らかとなった。これらのデータを統合し、 $\beta$ -catenin によって 1 lncRNA を含む 74 遺伝子が直接発現減少し、2 lncRNA (AK092875, ASBEL) を含む 66 遺伝子が直接発現亢進させることを明らかにした。さらに得られた  $\beta$ -catenin ターゲット遺伝子群を用いて GSEA 解析を行い、LEF motif セットや APC ターゲット遺伝子セット、および ES-related 遺伝子セットなどがエンリッチすることを明らかにした。

続いて、ASBEL が  $\beta$ -catenin の下流にあることを検証するために、DLD-1 及び SW480 細胞における  $\beta$ -catenin の発現を抑制した結果、RNA-seq 解析の結果と同様に ASBEL 及び既知  $\beta$ -catenin 標的遺伝子である AXIN2 の発現が減少することが明らかとなった。また、293FT 細胞において APC の発現を抑制すると、ASBEL 及び Axin2 の発現が上昇した。さらに、 $\beta$ -catenin 抗体を用いた ChIP 解析により、 $\beta$ -catenin は DLD-1 細胞及び SW480 細胞において、Axin2 及び ASBEL の転写開始点に結合し、ASBEL の転写開始点から 3500bp 上流には結合しないことが示された。以上の結果より、ASBEL は、 $\beta$ -catenin によって直接転写制御されている可能性が示唆された。

ASBEL のプロモーター領域には、TCF binding element (TBE) が 2 箇所存在する。次に我々は、 $\beta$ -catenin が ASBEL の転写を活性化することを、レポーターアッセイを行い確認した。結果、 $\beta$ -catenin の活性が上昇することにより、ASBEL プロモーター上に存在する 2 つの TBE を介して ASBEL の転写が促進されることが明らかとなった。

### (2) ASBEL は、大腸癌細胞株の造腫瘍性に必須である

ASBEL の大腸癌細胞に対する影響を確認するために、ヒト大腸癌細胞株である HCT 116、DLD-1、及び Caco-2 と、ヒト角化細胞 HaCaT の ASBEL の発現を抑制し細胞増殖試験を実施した。結果、ASBEL の発現が低下すると、大腸癌細胞株では細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。一方、ヒト正常細胞である HaCaT においては、ASBEL の発現を抑制しても細胞増殖に影響しなかった。すなわち、ASBEL は *in vitro* で、大腸癌細胞株の増殖に関与することが分かった。続いて、AnnexinV assay を行い、大腸癌細胞株 HCT116 細胞株において ASBEL の発現を抑制すると、アポトーシスが促進することが明らかになった。一方、ヒト正常細胞である HaCaT においては、ASBEL の発現を抑制してもアポトーシスには影響しなかった。これらのことより、ASBEL の発現を抑制したことによって引き起こされる細胞増殖の抑制には、アポトーシスが関与していることが示唆され、ASBEL は大腸癌細胞株に対してアポトーシスを抑制する方向に機能していること

が推察された。さらに、細胞の浸潤能に ASBEL が関与しているかを、トランスウェルを用いた invasion アッセイで調べた。その結果、ASBEL の発現を抑制することにより、HCT 116、DLD-1 の浸潤能が減少することが観察された。

In vitro で、ASBEL が大腸癌に深く関与することが示されたため、次に、in vivo における腫瘍増殖への ASBEL の関与を調べた。ASBEL の発現を抑制した HCT 116、HT29、DLD-1 細胞をヌードマウスに移植して腫瘍体積を経時的に測定したところ、ASBEL の発現を抑制した細胞は、コントロール細胞と比較して、腫瘍形成能が低下していることが分かった。さらに、ヒト大腸癌の臨床検体における ASBEL の発現量を qRT-PCR で確認した。in vitro、in vivo の結果と一致して、Glade I-III において、ASBEL の発現が正常組織と比較して発現が上昇していることが明らかとなった。以上の結果より、ASBEL は、in vitro、in vivo で、大腸癌の腫瘍形成能に寄与することが示された。

### (3) ASBEL は転写因子 TCF3 と結合する

ASBEL が制御する遺伝子群を IPA analysis で解析を行い、ASBEL が  $\beta$ -catenin と同様に、細胞増殖、細胞死、細胞運動に関連する経路に存在することを明らかにした。さらに Upstream 解析の結果より、ASBEL の発現を抑制することによって、TCF3 の機能が阻害されることが明らかとなった。TCF3 は、bHLH を有する転写因子であり、E-box (CANNTG) 配列を標的とすることが知られている。続いて、TCF3 抗体を用いた RIP 実験及び biotin 化 ASBEL を bait とした pull-down assay を行い、ASBEL が TCF3 と結合することを明らかにした。次に、TCF3 の大腸がん組織における発現を確認した。結果、大腸正常組織と比較して大腸がん組織において TCF3 の発現が亢進していることを明らかにした。

続いて、TCF3 の発現を抑制することによって、大腸癌細胞株の細胞生存率が減少する一方、ヒト角化細胞株 HaCaT では、細胞生存率は変化しないことを明らかにした。また AnneinV assay を行った結果、TCF3 の発現を抑制することによる細胞生存率の減少はアポトーシスによるものであることが明らかとなった。

### (4) ASBEL-TCF3 の結合は、 $\beta$ -catenin により制御される細胞増殖に必要である

$\beta$ -catenin を対象とした RNA-seq、ChIP-seq 解析の結果から、TCF3 も  $\beta$ -catenin によって制御されることが明らかとなった。そこで HCT 116 及び SW480 細胞における  $\beta$ -catenin の発現を抑制すると、TCF3 の発現が減少することが確認された。また、293FT 細胞における APC の発現を抑制すると、ASBEL と同

様に TCF3 の発現が上昇することが確認された。

続いて、 $\beta$ -catenin 抗体を用いた ChIP アッセイを行った結果、 $\beta$ -catenin は TCF3 の転写開始点に結合することが示された。また、TCF3 は ASBEL と同様にプロモーター領域に TBE 部位を 1 つ有する。そこでレポーターアッセイを行った結果、TCF3 も、TBE を介して  $\beta$ -catenin により転写制御されることが明らかとなった。

次に、 $\beta$ -catenin が制御する大腸癌細胞の増殖に、TCF3 と ASBEL がどのように関与するかを確認した。 $\beta$ -catenin の発現を抑制すると、HCT 116 の細胞生存率は半分程度減少した。その際、ASBEL と TCF3 両因子を過剰発現すると、 $\beta$ -catenin による細胞生存率の減少が緩和された。一方、ASBEL のみ、もしくは TCF3 のみの過剰発現では、 $\beta$ -catenin による細胞生存率の減少に影響はなかった。すなわち、TCF3 と ASBEL 両方同時に制御することが、 $\beta$ -catenin による大腸癌細胞株の増殖に必要であることが示唆された。

### (5) ASBEL-TCF3 による ATF3 発現抑制が、大腸癌細胞の増殖に必要である

これまでの検討より、ASBEL、TCF3 は、それぞれ  $\beta$ -catenin により発現調節され、さらに ASBEL と TCF3 が複合体を形成し (ASBEL-TCF3)、大腸癌細胞株の増殖に寄与していることが示唆された。続いて我々は、ASBEL-TCF3 複合体がどのように大腸癌細胞株の腫瘍形成能を制御しているかを明らかにするために、ASBEL-TCF3 複合体の下流にある分子について解析を進めた。結果、HCT 116 における ASBEL 及び TCF3 の発現を抑制することにより、ATF3 の発現が上昇することが明らかとなった。ATF3 は、グリオブラストーマ、大腸癌、膀胱癌、肺癌で発現上昇していることが過去に示されている。

続いてヌードマウスを用いて、in vivo における腫瘍形成能にどのような影響を与えるかを確認した結果、ATF3 の発現を抑制しておく、ASBEL 及び TCF3 の発現を抑制によって引き起こされる腫瘍形成能の抑制が緩和されることが明らかとなった。さらに、ヒト大腸癌の臨床検体における ATF3 の発現量を qRT-PCR で調べた。結果、ATF3 は、stage I~IV で発現減少が見られた。以上の結果より、ASBEL-TCF3 による大腸癌細胞の腫瘍形成能の維持には、ATF3 の発現抑制が必須であることが示唆された。

### (6) ASBEL-TCF3 は、ATF3 の TCF-binding site (TBS) を介して ATF3 の発現調節をする

ASBEL-TCF3 が、どのようにして ATF3 の発現調節をしているかを調べるために、まず、ASBEL の細胞内での局在を確認した。その結果、ASBEL は、他の lncRNA と同様に、核内に局在することが判明し、ASBEL-TCF3 が、核内で ATF3 の転写を調節していることが示

唆された。

次に ENCODE プロジェクトによる ChIP-seq のデータを用い、ATF3 の転写開始点より下流、1641-2220bp の位置に TCF3-binding site (TBS) が存在することを明らかにした。続いて、抗 TCF3 抗体を用いた ChIP アッセイで、ATF3 の TBS 部位が沈降してくることが判明した。さらに、TCF3 による ATF3 の TBS 部位への結合は、ASBEL をノックダウンすることにより阻害されることが明らかとなった。また、biotin-ASBEL を bait とした pulldown アッセイにおいても、ASBEL が ATF3 遺伝子座における TBS に結合していることが確認された。

続いて、我々は SV40 プロモーター活性を持つレポーターベクター (Luc-Enh) の下流に ATF3 の TBS 配列 (+1641-2240) を繋げたレポーターベクター (Luc-ATF3-Enh) を構築した。続いて、ASBEL もしくは TCF3 の発現を抑制し、エンハンサー活性にどのような影響があるかを Luciferase アッセイによって確認した。その結果、ASBEL または TCF3 の発現を抑制すると、エンハンサー活性が上昇することが示された。一方、ASBEL 及び TCF3 を単独で強制発現してもエンハンサー活性に影響を与えないが、ASBEL と TCF3 を同時に共発現させると顕著にレポーター活性が減少することが明らかとなった。以上の結果より、ASBEL は、TCF3 を ATF3 遺伝子座に誘導することによって、ATF3 の発現を抑制していることを見出しました。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① PIK3CA and KRAS mutations in cell free circulating DNA are useful markers for monitoring ovarian clear cell carcinoma.

Morikawa A, Hayashi T, Shimizu N, Kobayashi M, Taniue K, Takahashi S, Tachibana K, Saito M, Kawabata S, Iida Y, Ueda K, Saito M, Yanaihara N, Tanabe H, Yamada K, Takano H, Nureki O, Okamoto S, Akiyama T.

*Oncotarget*. 22, 15266-15274 (2018) 査読有  
DOI: 10.18632/oncotarget.24555

② ASBEL-TCF3 complex is required for the tumorigenicity of colorectal cancer cells.

Taniue K, Kurimoto A, Takeda Y, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Yuki K, Katsuhiko S, Akiyama T.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 113, 2739-12744 (2016) 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1605938113

③ Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of

UHRF1.

Taniue K, Kurimoto A, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Iwasaki K, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Hiyoshi M, Kitayama J, Negishi L, Kawasaki Y, Akiyama T.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(5), 1273-8, (2016) 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1500992113

④ Susceptibility to proteases of anti-Tn-antigen MLS128 binding glycoproteins expressed in human colon cancer cells.

Oura F, Yajima Y, Nakata M, Taniue K, Akiyama T, Nakada H, Yamamoto K, Fujita-Yamaguchi Y.

*Biosci Trends*. 9, 49-55, (2015) 査読有

DOI: 10.5582/bst.2014.01127

⑤ Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K upregulates the kinetochore complex component NUF2 and promotes the tumorigenicity of colon cancer cells.

Sugimasa H\*, Taniue K\*, Kurimoto A, Takeda Y, Kawasaki Y, Akiyama T. \*These authors contributed equally to this work.

*Biochem Biophys Res Commun*. 459, 29-35, (2015) 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.043

[学会発表] (計 13 件)

(招待講演)

① 第 76 回 日本癌学会学術総会、2017 年 “Colorectal cancer and long ncRNA”

Kenzui Taniue, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

② 第 69 回 日本細胞生物学会大会、仙台、宮城、仙台国際センター、2017 年 6 月 14 日 “大腸がんと長鎖ノンコーディング RNA”

谷上 賢瑞、武田 泰子、秋山 徹

③ The 101th Life Science in Japanese, 2017 年 “LncRNAs in Colon cancer”

谷上 賢瑞

(公募発表)

④ 新学術領域 「ノンコーディング RNA ネットワーク」領域 第三回領域班会議、2016 年

“Elucidation of the mechanisms by which lncRNA-mediated epigenetic regulation promotes the colorectal tumorigenesis”

谷上 賢瑞

⑤ 第 75 回 日本癌学会学術総会、2016 年

“Long non-coding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1”

Kenzui Taniue, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

⑥ 新学術領域 「ノンコーディング RNA ネットワーク」領域 第三回領域班会議、2016 年

オタクソノミ」領域 第二回班会議、箱根、  
リゾートピア箱根、2015年6月9日  
“Elucidation of the mechanisms by which  
lncRNA-mediated epigenetic regulation  
promotes the colorectal tumorigenesis”  
**谷上 賢瑞**

(ポスター発表)

⑦第17回東京大学生命科学シンポジウム、  
東京、東京大学、2017年6月9日  
“The ASBEL-TCF3 complex is required for the  
tumorigenicity of colorectal cancer cells”  
**Kenzui Taniue**, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

⑧H28年度第2回分生研研究交流会、東京、  
東京大学、2017年3月13日  
“The ASBEL-TCF3 complex is required for the  
tumorigenicity of colorectal cancer cells”  
**Kenzui Taniue**, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

⑨2016 the American Society for Cell Biology  
Annual Meeting, San Francisco, California, USA,  
Moscone Center, 2016年12月4日  
“The ASBEL-TCF3 complex is required for the  
tumorigenicity of colorectal cancer cells”  
**Kenzui Taniue**, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

⑩第39回日本分子生物学会年会、横浜、神  
奈川、パシフィコ横浜、2016年11月30日  
“β-catenin-mediated upregulation of the  
ASBEL-TCF3 complex is critical for colorectal  
tumorigenesis”  
**Kenzui Taniue**, Tetsu Akiyama

⑪ American Association for Cancer Research  
Annual Meeting 2016, New Orleans, Louisiana,  
Ernest N. Morial Convention Center, USA, 2016  
年4月13日  
“Long non-coding RNA UPAT promotes colon  
tumorigenesis by inhibiting degradation of  
UHRF1”  
**Kenzui Taniue**, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

⑫ American Association for Cancer Research  
Meeting “Noncoding RNAs and Cancer”, Boston,  
Massachusetts, USA, Boston Renaissance  
Waterfront Hotel, 2015年12月6日  
“Long non-coding RNA UPAT promotes colon  
tumorigenesis by inhibiting degradation of  
UHRF1”  
**Kenzui Taniue**, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

⑬H27年度第1回分生研研究交流会、東京、  
2015年6月8日  
“Long non-coding RNA UPAT promotes colon  
tumorigenesis by inhibiting degradation of  
UHRF1”  
**Kenzui Taniue**, Akiko Kurimoto, Hironobu  
Sugimasa, Yasuko Takeda, Tetsu Akiyama

[図書] (計 5 件)

①【連載】いま、がんのクリニカルシーケ  
ンスがおもしろい！  
—腫瘍由来循環 DNA の超微量・超低頻度変  
異解析はがん診断を変えるか—  
企画 / **谷上 賢瑞**, 西塚 哲, 八谷 剛史,  
中川 英刀  
実験医学 (2016)

②【連載】いま、がんのクリニカルシーケ  
ンスがおもしろい！  
第1回 がん診断の新たなマテリアル、  
ctDNA  
西塚 哲, **谷上 賢瑞**, 八谷 剛史, 中川  
英刀  
実験医学, 34, 948-952, (2016)

③【連載】いま、がんのクリニカルシーケ  
ンスがおもしろい！  
第2回 臨床現場から ctDNA サンプル抽出ま  
で  
**谷上 賢瑞**, 西塚 哲, 八谷 剛史, 中川  
英刀  
実験医学, 34, 1319-1324, (2016)

④【連載】いま、がんのクリニカルシーケ  
ンスがおもしろい！  
第3回 ctDNA 解析技術：検出感度と網羅性  
八谷 剛史, **谷上 賢瑞**, 西塚 哲, 中川  
英刀  
実験医学, 34, 1460-1466, (2016)

⑤RNA-seq を用いた lncRNA の同定  
**谷上 賢瑞**  
実験医学 増刊 ノンコーディング RNA テキ  
ストブック, 33, 176-182, (2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

東大、長鎖ノンコーディング RNA が制御する新たな大腸がん化のメカニズムを解明  
<http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=425688&lindID=5>

長鎖ノンコーディング RNA が制御する新たな大腸がん化のメカニズム  
[http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/wordpress/wp-content/uploads/2016/10/pressrelease\\_281018.pdf](http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/wordpress/wp-content/uploads/2016/10/pressrelease_281018.pdf)

大腸がんの発症に重要な長いノンコーディング RNA の発見  
<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/identification-of-long-non-coding-RNA-critical-for-development-of-colorectal-cancer.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

谷上 賢瑞 (TANIUE Kenzui)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：90648627

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

なし