

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04692

研究課題名(和文) Wnt/c-Myc経路を介した新たな発癌機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying colorectal tumorigenesis driven by Wnt/c-Myc signaling

研究代表者

川崎 善博 (Kawasaki, Yoshihiro)

東京大学・定量生命科学研究所・客員准教授

研究者番号：10376642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はWnt/c-Myc経路の直接の標的遺伝子となる新規lncRNA(MYUと命名)を見出しました。MYUは大多数の大腸がんで発現が亢進しており、大腸がん細胞の腫瘍形成能に必須であることを見出しました。さらに、MYUはRNA結合タンパク質hnRNP-Kと結合し、CDK6の発現上昇を招くことによって細胞周期のG1期からS期への進行を促進することを見出しました。これらの結果から、MYU/hnRNP-K/CDK6カスケードはWnt/c-Mycの下流として働き、大腸がん細胞の増殖や造腫瘍性に大事な働きをしていることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子であるc-Mycは様々なシグナル経路のハブ因子として機能することが知られています。そのため、c-Mycを直接阻害する薬剤は大きな副作用があると予想されます。したがって、c-Mycが誘発するがんに対してはMYU、hnRNP-K、CDK6による情報伝達の仕組みががんの分子標的薬を創製する上で重要な標的に成り得ると期待できました。

研究成果の概要(英文)：We identified a direct target of c-Myc, termed MYU, and showed that MYU was upregulated in most colon cancers and required for the tumorigenicity of colon cancer cells. Furthermore, we demonstrated that MYU associated with the RNA binding protein hnRNP-K to stabilize CDK6 expression and thereby promoted the G1-S transition of the cell cycle. These results suggest that the MYU/hnRNP-K/CDK6 pathway functions downstream of Wnt/c-Myc signaling and plays a critical role in the proliferation and tumorigenicity of colon cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：Wnt c-Myc lncRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

癌関連遺伝子の変異や発現異常が癌の発症・進展に深く関わっていることは良く知られています。大多数の大腸癌では Wnt シグナル経路の異常亢進が起こっており、癌遺伝子 c-Myc が細胞の癌化に関わる最も重要な Wnt シグナル標的因子の一つであると考えられています。正常細胞において c-Myc は細胞の増殖、アポトーシス、分化、運動、幹細胞性など多様な生命現象に関わっていることが明らかにされていますが、c-Myc の発現増大が細胞の癌化を誘導する分子機構に関しては不明な点が多く残されています。

## 2. 研究の目的

転写因子である c-Myc は膨大な数の標的因子の発現を制御することにより、細胞の増殖やアポトーシスなどの様々な生命現象に関わっていることが示されています。一方で、c-Myc の標的因子に関しては専ら蛋白質をコードする遺伝子に焦点を当てた解析が進められてきました。そこで、c-Myc による発癌機構の解明につながる新たな手掛かりを得るために、long non-coding RNA (lncRNA) に着目して c-Myc の標的因子を探索しました。次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析から c-Myc の発現抑制によって発現が変動する因子を探索したところ、Wnt/c-Myc 経路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 long non-coding RNA (lncRNA) : MYU を同定することに成功しました。そこで本研究では、Wnt/c-Myc 経路の標的因子として同定した MYU を手掛かりとして、Wnt/c-Myc 経路が誘導する細胞癌化機構の理解に新たな局面を開き、大腸癌の新しい診断法や分子標的治療法開発の為の足掛かりを得ることを目的としました。

## 3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いた網羅的解析によって  $\beta$ -catenin, c-Myc あるいは MYU をノックダウンした大腸癌細胞で共通して発現が低下する遺伝子を探したところ、Wnt/c-Myc/MYU 経路の下流因子として細胞周期関連分子であるサイクリン依存性キナーゼ 6 (CDK6) を同定することに成功しました。そこで、MYU の作用機構を明らかにするために、Streptavidin-Dynabeads に結合したビオチン標識 MYU を用いて細胞抽出液から結合蛋白質を pull-down 法によって回収し、LC-MS/MS 分析によって相互作用因子を探索しました。その結果、RNA 結合タンパク質 hnRNP-K を MYU 結合蛋白質として同定することができました。さらに、siRNA を用いて hnRNP-K をノックダウンすると細胞増殖と CDK6 の発現が低下したことから、hnRNP-K が Wnt/c-Myc/MYU/CDK6 カスケードの構成因子として働いていることが示唆されていました。そこで本研究では、以下の方法で詳細な解析を遂行しました。

### (1) 癌発症における Wnt/c-Myc/MYU カスケードの機能解析

CDK6 が細胞周期の G1 期から S 期への移行に必須の役割をしていることは良く知られています。そこで、フローサイトメトリー (FACS) を用いて細胞内 DNA 量を測定することによって、本経路構成因子のノックダウンが細胞周期の進行に与える影響を検証しました。また、Wnt/c-Myc と MYU/hnRNP-K/CDK6 の関連性を明らかにする為に、c-Myc の発現抑制で低下する大腸癌細胞の細胞周期進行が下流因子の MYU や CDK6 を過剰発現することで回復するかどうかを検討しました。さらに、c-Myc 経路が発現増大していない癌細胞株や正常細胞での MYU の重要性を比較検討しました。

### (2) MYU/hnRNP-K 複合体が CDK6 mRNA の安定性を制御する機構の解明

MYU 結合タンパク質として hnRNP-K を見出し、MYU/hnRNP-K 複合体は CDK6 mRNA の 3'-UTR に結合することで CDK6 mRNA の安定化促進に関わっていることを明らかにしていました。CDK6 mRNA の 3'-UTR が有する hnRNP-K 結合領域のすぐ近傍には、種を超えて高度に保存された miR-16 の標的配列が 1 箇所だけ存在します。miR-16 は細胞増殖の抑制を誘導することで癌抑制的に作用することが知られています。実際、pre-miR-16 を細胞に導入すると CDK6 mRNA の発現/安定性と細胞増殖が低下することを確認できました。そこで、miR-16 結合領域を含む CDK6-3'-UTR 断片を Luciferase 遺伝子の下流に繋げたコンストラクト (Luc-CDK6-3'-UTR) を作成し、miR-16 の強制発現が Luc-CDK6-3'-UTR の Luciferase 活性に与える影響を検討しました。また並行して、miR-16 結合部位に変異を導入したコンストラクションも作成し、Luciferase assay を行いました。さらに、MYU/hnRNP-K 複合体が miR-16 の働きに与える影響を、CDK6-3'UTR を bait とした pull-down assay で検討しました。

### (3) 新たな MYU 相互作用因子を介した大腸がん発症機構の解析

上記 (1) の解析によって Wnt/c-Myc 経路の直接の標的因子として同定した MYU による CDK6 の発現亢進が、大腸がん細胞が有する造腫瘍性の要因になっていることが示唆されました。一方、

CDK6 の過剰発現だけでは MYU のノックダウンで起こる現象を十分にレスキューできず、この結果は腫瘍形成に寄与する未だ明らかにされていない仕組みが MYU には存在していることを強く示唆していると考えられました。そこで、MYU の新たな機能を明らかにするために、hnRNP-K を同定した方法（ビオチン標識 MYU を用いて得られた pull-down 産物を LC-MS/MS 解析する）とは異なる手法を用いて MYU に結合する蛋白質の探索を行いました。MYU に対するビオチン標識アンチセンスオリゴを用いて内在性 MYU と 2 本鎖を形成させ、内在性の MYU を含む複合体を細胞抽出液から精製することで新たな MYU 結合タンパク質を探索しました。

#### 4. 研究成果

##### (1) 癌発症における Wnt/c-Myc/MYU カスケードの機能解析

LS180 細胞（大腸がん細胞株）を用いて  $\beta$ -catenin, c-Myc, MYU, hnRNP-K もしくは CDK6 をノックダウンすると細胞周期の G1 期から S 期への進行が抑制される（G1 arrest）ことを見出しました。さらに、これらの G1 arrest は CDK6 の過剰発現によって部分的にレスキューされることが確認できました。また、c-Myc のノックダウンで抑制された G1 期から S 期への進行は、MYU の強制発現によっても部分的に回復しました。これらの研究成果から、Wnt/c-Myc/MYU/hnRNP-K/CDK6 カスケードの存在と細胞周期進行において本カスケードが重要な働きを担っていることが明らかになりました。

さらに、c-Myc が発現増大していない癌細胞株や正常細胞での MYU の重要性を比較検討しました。その結果、MYU の発現が極めて低い CCD-112CoN 細胞（正常大腸細胞）で MYU の発現を抑制しても細胞の増殖速度に大きな差は認められませんでした。また、一部の乳がんでは c-Myc の発現が増大していることが知られています。そこで、c-Myc の発現が高い乳がん細胞株（SKBR3, MDA-MB-453）と低い乳がん細胞株（BT20 と MDA-MB-157）を用いて、細胞増殖における c-Myc/MYU の重要性を比較検討しました。その結果、c-Myc の発現が高い乳がん細胞株（SKBR3, MDA-MB-453）では MYU の発現も高く、c-Myc や MYU のノックダウンで細胞の増殖速度が顕著に低下しました。また、SKBR3 細胞が有する軟寒天コロニー形成能も、c-Myc や MYU の発現抑制で低下しました。一方、c-Myc の発現が低い乳がん細胞株（BT20 と MDA-MB-157）では MYU の発現も低く抑えられており、c-Myc や MYU をノックダウンしても細胞増殖能に大きな差は見られませんでした。したがって、MYU は c-Myc が誘導する細胞増殖に重要な働きをしていることが示唆されました。

##### (2) MYU/hnRNP-K 複合体が CDK6 mRNA の安定性を制御する機構の解明

Luciferase 遺伝子の下流に miR-16 認識領域を含む CDK6-3'-UTR 断片をつないだコンストラクション（Luc-CDK6-3'-UTR）を作成し、Luciferase 活性を調べることで miR-16 が直接 CDK6 の発現に影響を与えているかどうかを検討しました。その結果、DLD-1 細胞（大腸がん細胞株）に miR-16 を強制発現すると Luciferase 活性が大きく低下することが分かりました。一方、miR-16 認識領域に変異を導入した場合は、Luciferase 活性の低下はみられませんでした。したがって、miR-16 は CDK6-3'-UTR に直接作用することで CDK6 の発現を抑制していることが明らかになりました。また、Luc-CDK6-3'-UTR を用いた Luciferase assay から、MYU や hnRNP-K を強制発現しておくことで、miR-16 による Luciferase 活性の低下が抑えられることが分かりました。したがって、MYU/hnRNP-K 複合体は miR-16 の機能を妨げる働きがあることが示唆されました。

次に、CDK6-3'-UTR を bait とした pull-down assay によって、MYU/hnRNP-K 複合体が miR-16 の機能を妨げるメカニズムの解析を行いました。LS180 細胞（大腸がん細胞株）で miR-16 を強制発現すると、CDK6-3'-UTR を bait とした pull-down 産物に miR-16/Ago2 複合体が確認できました。しかしながら、hnRNP-K をノックダウンしておくことで CDK6-3'-UTR と共沈する miR-16/Ago2 複合体の量が増大しました。したがって、MYU/hnRNP-K 複合体は miR-16 が CDK6-3'-UTR に結合するのを妨げることによって、CDK6 の発現を正に制御していることが示唆されました。

##### (3) 新たな MYU 相互作用因子を介した大腸がん発症機構の解析

MYU に対するビオチン標識アンチセンスオリゴを用いて内在性の MYU を含む複合体を細胞抽出液から精製し、得られた産物を LC-MS/MS 解析することで新たに 27 種類の MYU 相互作用候補因子を同定することに成功しました。その中には、核酸結合モチーフを有する蛋白質 14 種類とリボソーム構成因子 10 種類が含まれていました。さらに、公共データベース（CERES, <https://depmap.org/ceres/>）を用いた癌細胞の増殖に重要な遺伝子の絞り込み等から、14 種類の中では SKI1V2L2, hnRNP-H1, NUDT21 が大腸癌細胞の増殖に深く関わっていることが分かりました。また、結合候補タンパク質のリストには増殖に必須でない分子も含まれていたことから、MYU は細胞増殖以外にも多様な作用を持つ可能性があると考えられました。今後、これらの因子を手掛かりにして MYU/相互作用因子複合体が癌細胞の増殖や造腫瘍性に与える影響について詳

細な解析を遂行し、*MYU* が関わる大腸癌発症機構の理解を深める必要があると考えられました。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawasaki Y, Miyamoto M, Oda T, Matsumura K, Negishi L, Nakato R, Suda S, Yokota N, Shirahige K, Akiyama T	4. 巻 20
2. 論文標題 The novel lncRNA CALIC upregulates AXL to promote colon cancer metastasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 e47052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201847052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto M, Hayashi T, Kawasaki Y, Akiyama T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Sp5 negatively regulates the proliferation of HCT116 cells by upregulating the transcription of p27.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 4005-4009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.7793.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura K, Kawasaki Y, Miyamoto M, Kamoshida Y, Nakamura J, Negishi L, Suda S, Akiyama T.	4. 巻 36
2. 論文標題 The novel G-quadruplex-containing long non-coding RNA GSEC antagonizes DHX36 and modulates colon cancer cell migration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1191-1199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/onc.2016.282.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 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	4. 巻 113
2. 論文標題 Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.	6. 最初と最後の頁 1273-1288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1500992113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawada G, et al.	4. 巻 150
2. 論文標題 Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1171-1182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2016.01.035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chaboub LS, Manalo JM, Lee HK, Glasgow SM, Chen F, Kawasaki Y, Akiyama T, Kuo CT, Creighton CJ, Mohila CA, Deneen B	4. 巻 36
2. 論文標題 Temporal Profiling of Astrocyte Precursors Reveals Parallel Roles for Asef during Development and after Injury	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 11904-11917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1658-16.2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawasaki Y, Komiya M, Matsumura K, Negishi L, Suda S, Okuno M, Yokota N, Osada T, Nagashima T, Hiyoshi M, Okada-Hatakeyama M, Kitayama J, Shirahige K, Akiyama T	4. 巻 16
2. 論文標題 MYU, a target lncRNA for Wnt/c-Myc signaling, mediates induction of CDK6 to promote cell cycle progression	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 2554-2564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2016.08.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yoshihiro Kawasaki, Masaya Miyamoto, Kosuke Matsumura, Lumi Negishi, Takeaki Oda, Ryuichiro Nakato2, Sakiko Suda, Naoko Yokota, Katsuhiko Shirahige, Tetsu Akiyama
2. 発表標題 The novel lncRNA CALIC upregulates AXL to promote colon cancer metastasis
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Kawasaki, Masaya Miyamoto, Kosuke Matsumura, Lumi Negishi, Takeaki Oda, Ryuichiro Nakato2, Sakiko Suda, Naoko Yokota, Katsuhiko Shirahige, Tetsu Akiyama
2. 発表標題 The novel lncRNA CALIC upregulates AXL to promote colon cancer metastasis
3. 学会等名 第71回細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiro Kawasaki, Masaya Miyamoto, Sakiko Suda and Tetsu Akiyama
2. 発表標題 The novel lncRNA CASCA induces the expression of AXL to promote colon cancer cell migration and drug resistance
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Akiyama T
2. 発表標題 The Novel G-quadruplex-Containing lncRNA GSEC Modulates Colon Cancer Cell Migration
3. 学会等名 第75回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 川崎 善博、小宮 美文、松村 厚佑、根岸 瑠美、須田 咲希子、奥野 ます美、横田 直子、長田 知也、長嶋 剛史、日吉 雅也、岡田 眞里子、北山 丈二、白髭 克彦、秋山 徹
2. 発表標題 Wnt/c-Myc経路の新規標的lncRNA : MYUはCDK6の発現を誘導して細胞周期を進める
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 川崎善博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 26
3. 書名 阻害剤・活性化剤ハンドブック	

1. 著者名 川崎善博, 秋山徹	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 4
3. 書名 別冊「医学のあゆみ」がん微小環境の病態理解と制御	

1. 著者名 川崎善博, 秋山徹	4. 発行年 2016年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 4
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考