

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02771

研究課題名(和文)多機能性を有したWnt/c-Myc標的lncRNAによる細胞癌化機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of a multifunctional Wnt/c-Myc target lncRNA in tumorigenesis

研究代表者

川崎 善博(KAWASAKI, Yoshihiro)

関西医科大学・附属光免疫医学研究所・准教授

研究者番号：10376642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：大多数の大腸がんではWntシグナル経路の異常亢進が起こっており、がん遺伝子c-Mycが細胞のがん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る。申請者らはWnt/c-Myc経路の直接の標的遺伝子として同定したlncRNA MYUに着目した解析をすすめ、分子生物学的および生化学的な解析からlncRNA MYUがペプチドを産み出し、大腸がん細胞が増殖する上でそのペプチドが大事な役割を果たしていることを見出した。さらに、MYU由来ペプチドに結合する候補タンパク質を複数見出し、MYUが支える細胞増殖制御機構を明らかにするための手掛かりを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高等生物には膨大な数のlncRNAが存在しているが、ほとんどのlncRNAについては生理機能が未だに不明のままである。さらに、lncRNAが疾患発症に及ぼす影響とその作用機序の解明にも十分に迫ることが出来ていない。本研究では、non-coding RNAとして分類されてきたlncRNA MYUが機能を有したペプチドを産み出しているという新たな一面を見出した。本研究で得られた成果は、lncRNAに関わる細胞増殖制御機構を明らかにするための重要な知見となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aberrant activation of Wnt/b-catenin signaling is a major driving force in colon cancer. Wnt/b-catenin signaling induces the expression of the transcription factor c-Myc, leading to cell proliferation and tumorigenesis. We showed that MYU, a direct target lncRNA of Wnt/c-Myc, generated small functional peptide by molecular and biochemical analyses. We also found candidate proteins associated with MYU-derived peptide and they would provide clues to investigate the mechanism behind Wnt/c-Myc/MYU-mediated tumor growth.

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

大多数の大腸がんでは Wnt シグナル経路の異常亢進が起こっており、がん遺伝子 c-Myc が細胞のがん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る。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るが、c-Myc の発現増大が細胞のがん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る。

2. 研究の目的

転写因子としてはたらく c-Myc の研究には長い歴史があるが、c-Myc の標的遺伝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た。そこで、申請者らは c-Myc による発がん機構の解明につながる新たな手掛かりを得るために、長鎖 non-coding RNA (lncRNA) に着目して c-Myc の標的を探索したところ、Wnt/c-Myc 経路の直接の標的遺伝子として新規 lncRNA *MYU* を同定することに成功した。そして、*MYU* が大多数の大腸がん発現が亢進していること、および *MYU* は大腸がん細胞の増殖能と造腫瘍性に必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた。そこで本研究では、これまでの研究内容をさらに発展させ、Wnt/c-Myc/*MYU* 経路を介した大腸がん発症機構の詳細を解明し、大腸がんの新しい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た。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、*MYU* は RNA 結合タンパク質 hnRNP-K と結合することで細胞周期を進める機能をもつ CDK6 の発現上昇を招いていること、および *MYU* によって発現の増えた CDK6 が大腸がん細胞の増殖の要因になっていることを突き止めていた。しかしながら、*MYU* の発現抑制による細胞増殖阻害効果は CDK6 の過剰発現だけでは十分に回復しない。したがって、*MYU* は CDK6 には依存しない何らかの新たな機能を有することが推測できた。

(1) *MYU* が内在性アンチセンス RNA としてはたらくメカニズムの解明

ヒトゲノムにおいては 6,000 種類以上の遺伝子が反対鎖にオーバーラップ遺伝子 (アンチセンス RNA) を持っていることが明らかにされており、アンチセンス RNA はセンス遺伝子と 2 本鎖 RNA を形成することでセンス遺伝子の発現を制御していると推測されている。*MYU* の反対鎖には新規遺伝子 *VPS9D1* が存在することから、*MYU* は内在性アンチセンス RNA として *VPS9D1* の発現制御に関わっている可能性があると考えられた。そこで、*MYU* と *VPS9D1* mRNA の細胞内相互作用の有無を pull-down assay にて解析した。また、*VPS9D1* は低分子量 G 蛋白質の Rab5 選択的活性化ドメインを持つことから、Rab5 を活性化する GEF (guanine nucleotide exchange factor) で

あると推測された。Rab5 は EGFR を細胞内へ取り込むエンドサイトーシスに必須の分子であることから、*MYU* が EGFR の細胞内取り込みに与える影響を FACS を用いて調べた。加えて、Wnt 経路や c-Myc は幹細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしていることから、*MYU* 複合体ががん幹細胞における役割を明らかにするために、ヒト大腸がん手術検体から大腸がんオルガノイドの樹立を行った。

(2) *MYU* が機能性ペプチドをコードしている可能性の追求

シヨ糖密度勾配遠心法を用いた細胞質リボソームの分画解析から、*MYU* はポリソーム画分に多量に存在していることを突き止めていた。さらに、*MYU* はポリ A 鎖を有することから、*MYU* は通常の mRNA と同様に翻訳されている可能性が示唆された。*MYU* の塩基配列からは 3 つの短い ORF が推測できたことから、各々 ORF 候補について翻訳されペプチドを産み出しているかどうかの詳細を解析した。また、*MYU* 由来ペプチドが内在的に発現しているのかどうかを調べるために、*MYU* に対する抗体の作成に取り組んだ。さらに、*MYU* 由来ペプチドの機能を明らかにするために、*MYU* 由来ペプチドに相互作用するタンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) *MYU* が内在性アンチセンス RNA としてはたらくメカニズムの解明

MYU 及び PP7 タグ を付加した *Vps9d1* を HEK293 細胞で強制発現し、PP7 タグによる pull-down 実験を行った結果、*MYU* と *Vps9d1* mRNA が結合していることを示す明確な結果を得た。さらに、*MYU* の発現抑制が EGFR の細胞内取り込みに与える影響を調べた。EGF 刺激後 (HeLa 細胞 : 0 分、5 分、15 分、30 分) に蛍光標識した EGFR 抗体を用いて細胞染色を行い、FACS にて EGFR が細胞内に取り込まれる割合を調べたが、*MYU* の発現を抑制してもコントロールと比べて明確な差は認められなかった。また並行して、(がん) 幹細胞における *MYU* の役割を明らかにするために、ヒト大腸がん手術検体の供与を受け、既報に則って大腸がん組織および手術時に同時に切除される周辺正常組織からそれぞれのオルガノイドの樹立を試みた。その結果、本研究期間内に正常大腸組織由来 10 株、大腸がん組織由来 5 株のオルガノイドの樹立に成功した。

(2) *MYU* が機能性ペプチドをコードしている可能性の追求

推測した ORF からペプチドが発現するかどうかを調べるため、それぞれの ORF の C 末端に FLAG 配列をノックインした *MYU* 全長発現ベクターを作成し、大腸がん細胞へ導入した後、FLAG 抗体による western blotting を行った。その結果、3 つの ORF のうちの 1 つに由来する 84 アミノ酸残基のペプチド (*MYU*-pep) の発現が再現性良く検出できた。そこで、*MYU*-pep の開始コドン (ATG) を潰した mutant を作成し、再び FLAG 抗体による western blot 実験を行った。その結果、*MYU*-pep の発現は全く確認できなくなった。したがって、*MYU* は 84 アミノ酸残基のペプチドを産み出している可能性が示唆された。さらに、*MYU* の発現抑制で低下した大腸がん細胞の増殖能が *MYU*-pep の強制発現でレスキューできたことから、*MYU*-pep は大腸がん細胞の増殖に重要で

あることが示唆された。そこで、MYU-pep が内在的に発現しているのかどうかを調べるために、MYU-pep に対する抗体の作成に取り組んだ。最初、MYU-pep の C 末端領域を免疫したウサギの血清からアフィニティーカラムを用いて抗 MYU-pep 抗体を精製し、western blot 法による抗体の特性評価を行ったが、MYU-pep 以外の非特異的なバンドが多数検出され、抗体の特異性に大きな問題があることが分かった。そこで次に、ラットを使ったモノクローナル抗体 (MYU-pep mAb) の作製を行った (共同研究)。得られた抗体と LS180 細胞 (大腸がん細胞株) 由来 cell lysate を用いて免疫沈降/Western blot 実験を行ったところ、目的の位置に band が得られ、MYU-pep mAb は内在性の MYU-pep を認識できる抗体であると考えられた。今後、MYU-pep mAb のさらなる characterize を進めるとともに、様々な細胞・組織における内在性 MYU-pep の発現パターンおよび局在部位を Western blot や染色実験により明らかにする予定である。また、HA タグを付加した MYU-pep を細胞に強制発現させ、HA 抗体を用いて得られた免疫沈降物の LC-MS/MS 分析から 8 種類の MYU-pep 結合候補因子が得られた (共同研究)。得られた結合候補因子の中から細胞増殖に大事な因子を絞り込み、その因子を手掛かりにして、細胞増殖制御機構における MYU-pep の役割解明に今後取り組む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshihiro Kawasaki, Akiko Hayashi, Shoko Sakai, Naoko Tokushige, Shota Sasagawa, Hidewaki Nakagawa, Yuko Mimori-Kiyosue
2. 発表標題 APC mutant cells exploit compensatory chromosome alterations to gain tumor initiation and progression potential
3. 学会等名 第82回日本癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川崎 善博, 林 昭子, 酒井 晶子, 徳重 直子, 笹川 翔太, 中川 英刀, 清末 優子
2. 発表標題 APC変異細胞は染色体異常を起こしてがん化能を獲得する
3. 学会等名 第95回日本組織培養学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Hayashi A, Sakai S, Tokushige N, Sasagawa S, Nakagawa H, Mimori-Kiyosue Y
2. 発表標題 APC mutant cells exploit compensatory chromosome alterations to improve proliferative potential
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Tokushige N, Sakai S, Hayashi A, Mimori-Kiyosue Y
2. 発表標題 Toward the analysis of mechanisms regulating the mode of cell division of intestinal stem cells
3. 学会等名 理研BDR Retreat 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Tokushige N, Sakai S, Hayashi A, Mimori-Kiyosue Y
2. 発表標題 Toward the analysis of mechanisms regulating the mode of cell division of intestinal stem cells
3. 学会等名 理研BDRオルガノイドプロジェクトAnnual meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Akiyama T, Mimori-Kiyosue Y
2. 発表標題 Compensatory chromosome alterations to restore tumor cell fitness
3. 学会等名 第80回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawasaki Y, Hayashi A, Sakai S, Tokushige N, Mimori-Kiyosue Y
2. 発表標題 APC-mutant cells exploit compensatory chromosome alterations to restore tumour cell fitness
3. 学会等名 理研BDR Retreat 2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 TA細胞の検出試薬、がん幹細胞の増殖性の検出試薬、TA細胞の検出方法、増殖性のがん幹細胞の検出方法、TA細胞の精製方法、増殖性のがん幹細胞の精製方法、細胞集団、および非ヒト動物	発明者 川崎善博、清末優子、日笠幸一郎	権利者 関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-058370	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------