

# 癌発症における c-Myc 標的 ncRNA の機能解析

東京大学 分子細胞生物学研究所 癌幹細胞制御研究分野

川崎 善博

## 1. 目的

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る。大多数の大腸癌ではWntシグナル伝達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る。正常細胞におけるc-Mycは厳密な発現制御を受けており、細胞の増殖、アポトーシス、分化、運動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る(1)。しかしながら、c-Mycの過剰発現が癌の発症を誘導する分子機構については未だ不明な点が多い。申請者らは、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、c-Myc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長鎖non-coding RNA(ncRNA)を同定することに成功した。そこで本研究では、c-Mycの標的因子として同定したncRNAを手掛かりとしてc-Mycが誘導する大腸癌発症機構の全貌を解明し、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する。

## 2. 方法と結果

### 2-1 造腫瘍性に関わるc-Myc標的長鎖ncRNA: Minasの探索・同定

我々は、c-Mycの発現増大による細胞癌化機構を明らかにする為に、c-Mycをノックダウンした大腸癌細胞株(HT29細胞)を用いて次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、c-Mycの発現抑制によって発現が変動する長鎖ncRNAを120種類同定した。さらに、得られた候補因子の中から①抗c-Myc抗体を用いたChIP assayによって、そのプロモーター領域にc-Mycが直接結合していること、②Wntシグナル伝達経路の抑制( $\beta$ -cateninの発現抑制)によっても遺伝子発現が変動することを条件として絞り込みを行い、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達経路の下流因子であり、尚且つc-Mycの直接の標的因子として新規長鎖ncRNA: Minas (c-Myc-inducible natural antisense RNA)を同定した。さらに、siRNAを用いてMinasの発現を抑制すると大腸癌細胞株の増殖が顕著に抑制されたことから、Minasは機能性RNA分子として癌細胞の増殖に関わっていると考えられた。

### 2-2 大腸癌におけるMinasの発現

大腸癌組織におけるMinasの発現を定量的RT-PCRによって検討した。その結果、ほとんどの大腸癌症例においてMinasの発現が増大しており、Minasとc-Mycの遺伝子発現パターンには強い正の相関が認められた。

### 2-3 Minasの標的因子: Mrefの同定

最近の網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、ヒトのゲノムDNAでは両方の鎖が転写されている領域(センス-アンチセンスRNAのペア)が6000箇所以上も見つかっており、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察されている(2)。

Minasの反対鎖には、低分子量G蛋白質のRab5に対するヌクレオチド交換因子(GEF)をコードする新規遺伝子Mref(c-Myc regulated exchange factor)が存在していることから、Minasは内在性アンチセンスRNAとしてMrefの発現制御に関わっている可能性があると考えられた。事実、PP7タグを付加したMinasとFLAGタグを付加したPP7コート蛋白質を用いたRNA免疫沈降(RIP)によって、細胞内におけるMinasとMref遺伝子の相互作用が確認できた。また、siRNAを用いてMinasの発現を抑制するとMref mRNAの安定性および発現が増大することを見出した。したがって、MinasはMref mRNAと2本鎖RNAを形成することでMref mRNAの分解を促していると考えられた(図1)。さらに、Mrefはc-MycやMinasと逆相関して大腸癌での発現が減衰していること、 $\beta$ -catenin 或いはc-Mycの発現抑制によってMref遺伝子の発現が増大することを

見出した。加えて、c-Myc の発現抑制による HT29 細胞の増殖低下は Mref のノックダウンによって部分的にレスキューすることができた。これらの結果から、c-Myc の下流には Minas と Mref が存在し、Wnt/c-Myc/Minas/Mref 経路は大腸癌細胞の増殖に関わっている事が示唆された(図 1)。

#### 2-4 Mref の機能解析

新規蛋白質Mrefの機能を明らかにする為に、質量分析法によってMrefに相互作用する因子を探索したところ、Mref結合因子としてアダプター蛋白質Grb2を見出した。さらに、MrefはGrb2を介して活性化したEGF受容体(EGFR)と複合体を形成することを突き止めた。Rab5は増殖因子受容体などの膜たんぱく質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り、活性化したEGFRのダウンレギュレーションに関わっていることが明らかにされている(3, 4)。その為、Mrefはリガンド刺激に伴うEGFRのダウンレギュレーションを制御することでEGFRシグナル経路の調節に関わっている可能性が示唆された。これらの知見から、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル経路の異常亢進が新規長鎖ncRNA: Minasを介して細胞癌化を誘導する新たな機構の存在が示唆された(図 1)。

### 3. 考察

近年の大規模なトランスクリプトーム解析によって、高等生物には膨大な数の長鎖ncRNAが存在していることが明らかになった。これまでに解析された極一部の長鎖ncRNAは遺伝子発現制御から発生・分化などの生命現象に至る様々な局面で重要な機能を担っていたが、ほとんどの長鎖ncRNAについては、実際に「機能性RNA分子」として働いているのかも含めて生理機能は全く明らかにされていない。さらに、長鎖ncRNAが癌発症に及ぼす影響とその作用機序の解明にも迫ることが出来ていない為、本研究課題はこの領域の新たな分子基盤の構築として意義深いものであると言える。また、本研究はc-Mycが惹起する癌発症と長鎖ncRNAを繋ぐ新たな概念であるが、癌・動脈硬化・糖尿病性網膜症などの疾患ではc-Mycに依存した細胞増殖という共通した現象がみられることから、本概念は癌の枠を超えて他の疾患にも適用する可能性が考えられ、本研究成果の応用展開も非常に興味深いと考える。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りましたアステラス病態代謝研究会に心より深く感謝致します。

### 4. 参考文献

- 1) Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. Nat Rev Cancer. 8, 976-990, 2008
- 2) Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engström PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C, Antisense transcription in the mammalian transcriptome. Science. 309, 1564-1566. 2005
- 3) Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol. 10, 513-525, 2009
- 4) Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol. 7, 505-516. 2006

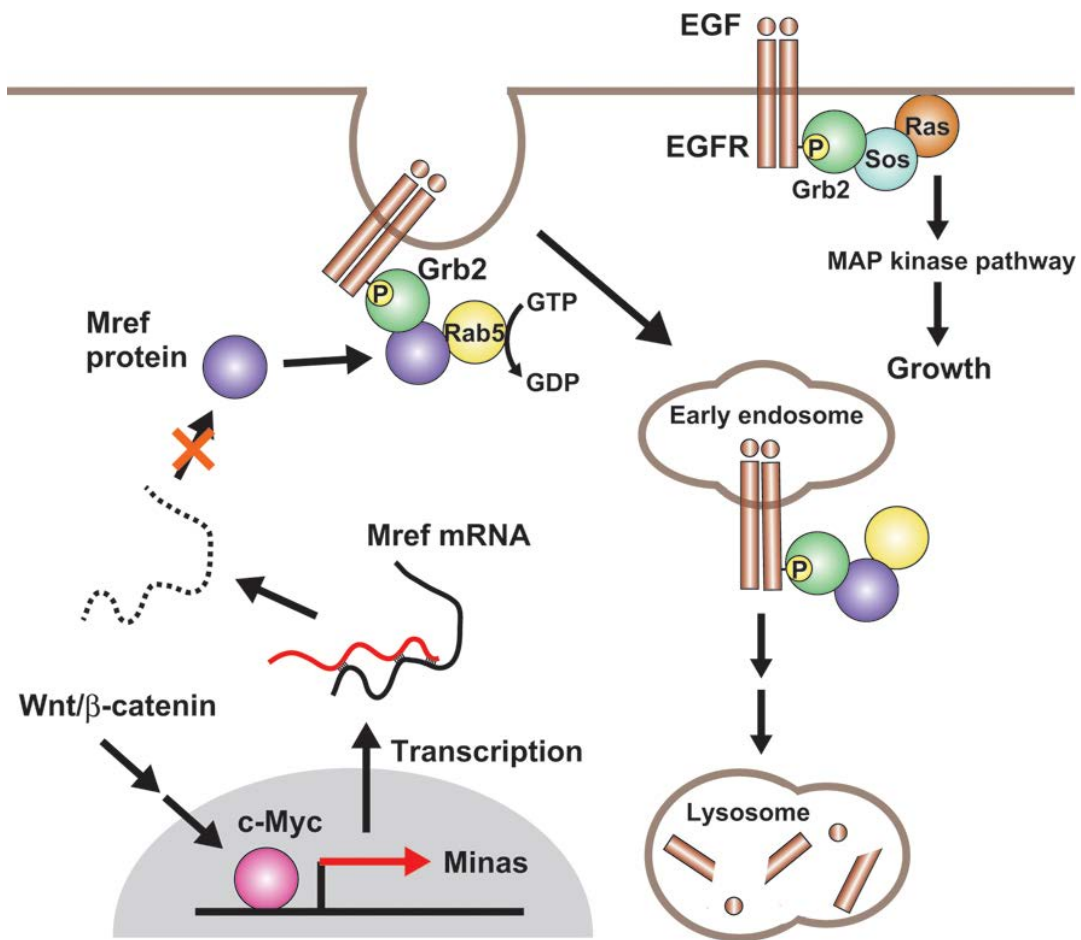


図 1 : モデル図

Wnt/β-catenin シグナル経路の異常が新規長鎖 ncRNA: Minas を介して細胞の癌化を誘導する仕組み