

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 歯 学 ）	氏名	星野 博昭
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・ 2 項該当		
論 文 題 目			
新規 <i>long non-coding RNA</i> による <i>Dentin matrix protein-1</i> 遺伝子発現制御機構の解析			
論文審査担当者			
主 査	宿南 知佐	教授	印
審査委員	香西 克之	教授	
審査委員	宮内 睦美	准教授	
〔論文審査の要旨〕			
<p>近年, ヒトやマウスの大規模なゲノム解析が進み, これまで意味のないとされてきた非遺伝子座領域中のゲノム配列において, タンパク質を翻訳しない non-coding RNA (ncRNA) が転写されることが明らかとなってきた。その中でも, long ncRNA (lncRNA) は一般的に 200 塩基以上の長さを持つものと定義され, 数十塩基の micro RNA 等とは区別される。lncRNA のゲノム上での局在, 総数および各種組織や細胞での発現パターンは未だ十分に解明されていないものの, 局所のクロマチンリモデリングに関与してその近傍遺伝子の発現を調節する lncRNA の存在が示されている。Dentin matrix protein-1 (DMP-1) は分泌性タンパク質で, <i>in vitro</i> では歯髄細胞の分化誘導時に発現誘導され, <i>in vivo</i> では象牙質の形成・成熟に必須の役割を担っている。しかし, <i>DMP-1</i> を恒常的に高発現している細胞株は少なく, その制御機構は未だ十分に解明されていない。そこで本研究では, lncRNA による <i>DMP-1</i> 発現制御機構を明らかにするために, <i>DMP-1</i> を高発現する細胞株を探索し, 見出した細胞株の <i>DMP-1</i> 転写調節領域において, lncRNA の探索・同定およびその機能解析を行った。[材料および方法]</p> <p>1. 各種細胞株における <i>DMP-1</i> 発現量の検討: ヒト骨肉腫由来細胞株および口腔癌由来細胞株 12 種類を低血清培地で 24 時間培養した後, 細胞培養上清および細胞溶解液を回収した。得られたタンパク質溶液を SDS-PAGE に展開し, 抗 <i>DMP-1</i> 抗体を用いた Western blotting によって <i>DMP-1</i> 発現を検討した。さらに, <i>DMP-1</i> の細胞質内局在を免疫蛍光染色にて解析した。また, 同様に培養した各種細胞株から total RNA を抽出し, 合成した cDNA を用いて</p>			

quantitative PCR(qPCR)を行った。2. *DMP-1* 転写調節領域付近における lncRNA の探索：① PCR スクリーニング；*DMP-1* 転写調節領域付近に約 100 bp を増幅させるようにランダムに作製した複数の primer pairs を用いて qPCR を行った。② *in vivo* での *DMP-1* および新規 RNA 発現量の検討；TissueScan™ Cancer and Normal Tissue cDNA Arrays (ORIGENE 社) を用いて、48 種類の頭頸部癌組織において *DMP-1* および新規 RNA の発現を qPCR にて解析した。③ 新規 RNA の全長クローニング；qPCR にて増幅が見られた領域を起点に、RACE にて新規 RNA の 5' および 3' 末端を同定し、全長 RNA を決定した。3. *DMP-1* と *lncRNA* の相互依存的遺伝子発現の検討：① *DMP-1* および *lncRNA* 発現抑制による相互依存性の検討；*DMP-1* および *lncRNA* に特異的な siRNA を作製し、歯肉癌由来細胞株に遺伝子導入した。48 時間培養した後に total RNA を抽出し、*DMP-1* および *lncRNA* 発現変化を qPCR にて解析した。② *DMP-1* および *lncRNA* 発現抑制による RNA 分解速度への影響の検討；上記同様、歯肉癌細胞株にそれぞれの siRNA を遺伝子導入し、48 時間培養した後に α -Amanitin 試薬を添加した。その後、3 時間おきに total RNA を抽出し、*DMP-1* および *lncRNA* 発現変化を qPCR にて解析した。③ *DMP-1* と *lncRNA* の直接的会合の検討；*In vitro* translation によって作製したビオチン化 *DMP-1* を歯肉癌由来細胞株の細胞溶解液と混和した後に、ストレプトアビジンビーズによる RNA pull down によってビオチン化 *DMP-1* に直接会合する *lncRNA* 量を qPCR にて検討した。4. *DMP-1* および *lncRNA* 発現抑制による細胞増殖への影響の検討；上記同様、各種細胞株にそれぞれの siRNA を遺伝子導入し、48 時間培養した後に Crystal violet 染色にて細胞数を比較した。[結果] qPCR, Western blotting, 免疫蛍光染色による検討から、ヒト口腔癌由来細胞株に *DMP-1* が高発現していることを見出した。また、PCR スクリーニングによって、*DMP-1* 転写調節領域付近に新規 RNA が存在することを明らかとし、*in vitro* および *in vivo* 両解析結果から、*DMP-1* および新規 RNA の発現量には高い正の相関関係があることが明らかとなった。そして、RACE によって *DMP-1* 転写開始領域上流の antisense 鎖に 3,442 塩基数を有する新規 *lncRNA* を同定した。さらに、siRNA 導入発現抑制による相互依存性、 α -Amanitin 試薬による RNA 分解速度、ならびに RNA pull down による直接会合の検討の結果、*lncRNA* は *DMP-1* 5' UTR を介して *DMP-1* と相補的に結合していることが示唆された。加えて Crystal violet 染色による細胞増殖への影響の検討によって、*DMP-1* および *lncRNA* 発現抑制依存性に口腔癌由来細胞株の細胞数が減少した。[結論および考察] *DMP-1* 高発現細胞株の *DMP-1* 転写開始領域上流に新規 *lncRNA* を同定した。この *lncRNA* は *DMP-1* との直接会合によって *DMP-1* 発現を制御することが明らかとなった。以上の結果から、本研究によって *DMP-1* および *lncRNA* 発現の制御、あるいは *DMP-1* と *lncRNA* の会合の制御が、口腔癌治療薬開発の標的として有用である可能性が示唆された。また、*DMP-1* を高発現する終末分化した骨細胞・象牙芽細胞においても同様の発現調整メカニズムが存在すると考えられることから、この *lncRNA* は硬組織再生に関わる候補因子であることが推定された。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

