

論文内容要旨

**The transcribed-ultraconserved regions in
prostate and gastric cancer:**

**DNA hypermethylation and microRNA- associated
regulation**

(前立腺癌、胃癌における転写超保存領域の

DNA メチル化およびマイクロ RNA を介した発現調節機構)

Oncogene, in press.

主指導教員：安井 弥教授

(基礎生命科学部門 分子病理学)

副指導教員：松原 昭郎教授

(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

副指導教員：大上 直秀准教授

(基礎生命科学部門 分子病理学)

後藤 景介

(医歯薬学総合研究科 創生医化学専攻)

転写超保存領域 (Transcribed Ultra-Conserved Region; T-UCRs)は、蛋白質をコードしない非翻訳 RNA (non-coding RNA)のうち、ヒトやマウスなど生物種を超えてほぼ 100%同一の配列を示すものである。近年の研究から、いくつかの T-UCRs が癌において発現異常を示すことが報告されている。このことは T-UCRs が癌関連遺伝子として働いていることを示唆するものであるが、癌における T-UCRs の具体的な詳細な発現調節機構や生物学的な意義については不明な点が多い。本研究では前立腺癌、胃癌を材料に癌における T-UCRs の発現調節機構、および生物学的機能解析を行った。

マイクロアレイ解析において有意な発現低下を示した 26 領域の T-UCRs に着目し、前立腺癌、正常前立腺組織サンプルを用いた定量的 RT-PCR によりそれぞれの発現を比較した。Uc.73+、Uc.118+A、Uc.158+A、Uc.241+A、Uc.346+A など 14 領域の T-UCRs が前立腺癌において有意な発現低下を認めた。胃癌組織、正常胃粘膜組織を用いても比較検討を行い、同様の傾向が認められたが、Uc.416+A は胃癌において有意な発現上昇を認めた。

発現低下を示した領域に対して DNA メチル化による発現抑制機構を想定した。5-Aza-dC による脱メチル化処理による発現変化を調べたところ、Uc.158+A は前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145 と、胃癌細胞株 MKN-45、MKN-74 のいずれにおいても共通して 5-Aza-dC の濃度依存的に発現が回復した。さらに、Uc.158+A の上流に存在する CpG アイランドが癌特異的なメチル化を受けていることがバイサルファイトシーケンスにより明らかとなった。ルシフェラーゼアッセイからこの領域がプロモーター活性を有しており、メチル化によりレポーター活性が著しく低下することも示された。以上のことから、Uc.158+A は癌において DNA メチル化により発現が抑制されていることが明らかとなった。

胃癌において発現上昇を認めた Uc.416+A に対しては、5-Aza-dC 処理による発現変化が認められなかったことから、microRNA を介した発現制御機構を想定した。オンラインデータベースを用い相補的な配列を有する microRNA を検索することにより miR-153 を同定、Uc.416+A と miR-153 との間の相関関係につき解析を進めた。胃癌組織、正常胃粘膜組織を用いた定量的 RT-PCR では、胃癌において miR-153 の発現は有意に低下しており、Uc.416+A の発現と miR-153 の発現は逆相関関係にあった。胃癌細胞株を用いた *in vitro* の実験から、miR-153 を強制発現させると Uc.416+A の発現が低下し、反対に miR-153 を抑制すると Uc.416+A の発現は上昇することが示された。ルシフェラーゼアッセイでは、Uc.416+A 発現ベクターのレポーター活性が miR-153 存在下で有意に低下することが示された。また、siRNA を用い Uc.416+A の発現をノックダウンさせるとき細胞増殖が有意に抑制された。さらに、マイクロアレイ解析から Uc.416+A ノックダウンにより *IGFBP1*、*IGFBP6* の有意な発現上昇と、*HOXB5*、*HOXB6* の有意な発現低下を認めた。定量的 RT-PCR においても同様に、Uc.416+A のノックダウンにより *IGFBP1*、*IGFBP6* の発現上昇と、*HOXB5*、*HOXB6* の発現低下が確認された。以上のことから、Uc.416+A は胃癌においてこれらの遺伝子の発現調節を介して細胞の増殖に関与し、癌遺伝子として作用していることが示された。

以上の結果より、特定の T-UCR は前立腺癌、胃癌において発現異常を示し、その発現制御には DNA メチル化、microRNA が関わるということが明らかとなった。すなわち、発現異常を示す T-UCRs ががんにおける新しい診断マーカー、治療標的として応用される可能性が示された。