

(様式D18)

学位論文審査結果の報告書

氏 名 苗村 円佳

生 年 月 日 平成 2年 9月 8日

本籍 (国籍) 大阪府

学位の種類 博 士 (工学)

学位記番号 第 49 号

学位授与の条件 (博士の学位) 学位規程第5条該当

論 文 題 目 _____

がん化に関与する長鎖ノンコーディングRNAの探索とその

作用機構の解明

審 査 委 員

(主 査) 神武 洋二郎



(副主査) 藤井 政幸



(副主査) 森田 資隆



(副 査) _____



(副 査) _____



本論文では、ガン化シグナルによって発現変動する長鎖ノンコーディングRNA (long non-coding RNA; lncRNA) の探索とその作用機構の解明について述べている。

第1章では、本研究の背景と目的を述べている。近年、大規模トランスクリプトーム解析によって、タンパク質をコードしないlncRNAが、ヒトで一万個以上存在することが明らかとなった。最近の研究により、lncRNAは細胞分化、アポトーシス、細胞老化などの制御に関与することが明らかとなっている。しかし、lncRNAとガン化との関連は不明である。これまでに著者の所属する研究室では、ガン化シグナルによって複数のlncRNAの発現量が変動することを見出した。その中で、ガン化シグナルによって発現量が減少するlncRNA、*ANRIL*はヒト正常線維芽細胞において、ポリコムタンパク質複合体PRC2を*INK4*遺伝子座ヘリクルトメントすることで、CDKインヒビター*p15*及び*p16*の転写を抑制し、細胞老化抑制に関与していることがわかっている。そこで本研究では、ガン細胞における*ANRIL*の機能解明と、ガン化シグナルによって発現量が変動する機能性lncRNAのさらなる探索および作用機構の解明を目的とした。

第2章では、非小細胞肺癌細胞H1299とヒト子宮頸癌細胞HeLaにおける*ANRIL*の機能解析について述べている。*ANRIL*の発現解析の結果、*ANRIL*は正常細胞と比較して、各種ガン細胞で高発現していた。また、HeLaおよびH1299細胞において、*ANRIL*をノックダウンすると、*p15*の転写が活性化し、細胞増殖が顕著に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、*ANRIL*は*p15*の転写抑制を介して、H1299およびHeLa細胞の増殖を促進する機能を持つことが考えられた。

第3章では、結腸癌細胞HCT116における*ANRIL*の機能解析について述べている。*ANRIL*ノックダウンを行った結果、HCT116細胞の増殖が顕著に抑制された。これまで著者の所属する研究室では、*ANRIL*ノックダウンにより、*p15*及び*p16*の転写が活性化することを報告した。そこで、HCT116細胞においても、*ANRIL*ノックダウンにより、*p15*の転写が活性化するかをリアルタイムRT-PCRによって検討した。その結果、*ANRIL*は、HCT116細胞において、*p15*の転写抑制には関与していないことが明らかとなった。次にHCT116細胞において、*ANRIL*は細胞周期制御に関与するかを検討した。細胞周期解析を行った結果、*ANRIL*ノックダウンにより、細胞周期のS期の細胞数が増加することが明らかとなった。さらに、コントロール細胞と比較して*ANRIL*ノックダウンした細胞の三次元増殖が抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、*ANRIL*は結腸癌細胞HCT116において、細胞周期のS期進行を促進することにより、二次元及び三次元増殖を正に制御する機能を持つことが考えられた。

第4章では、ガン化シグナル (活性型H-Ras変異体過剰発現) によって発現変動するlncRNAの探索とその作用機構の解明について述べている。ガン化シグナルによって、lncRNA、*OIP5-AS1*の発現量が減少することが明らかとなった。そこで、HeLa細胞を用いて、*OIP5-AS1*の機能解析を行った。*OIP5-AS1*をノックダウンした結果、コントロール細胞と比較して、*OIP5-AS1*をノックダウンした細胞の細胞数が減少することが明らかとなった。次に、*OIP5-AS1*がアポトーシスあるいは細胞周期制御に関与するかを検討した。コントロール細胞と*OIP5-AS1*ノックダウン細胞では、アポトーシスを起こしている細胞に有意な差は見られなかった。一方、細胞周期解析の結果、*OIP5-AS1*ノックダウンにより、細胞周期のG2/M期の細胞数が増加することが明らかとなった。これらの結果から、*OIP5-AS1*はアポトーシスには関与せず、細胞周期のG2/M期進行を促進することにより、HeLa細胞の増殖を正に制御することが考えられた。

以上本研究の結果、ガン化シグナルによって発現量が減少する*ANRIL*と*OIP5-AS1*は、細胞周期制御を介して、子宮頸癌細胞、肺癌細胞、結腸癌細胞の増殖を促進する機能を持つことが考えられた。

平成30年2月2日、産業理工学研究科産業理工学専攻の博士論文公聴会において、発表・提出された博士課程3年苗村円佳氏の論文「がん化に関与する長鎖ノンコーディングRNAの探索とその作用機構の解明」について内容を審査した。

第1章では、本研究の背景と、本研究の目的に至った経緯が詳細に述べられている。はじめに、タンパク質をコードしないノンコーディングRNA (noncoding RNA: ncRNA) について、その種類と機能について述べられている。次に、ncRNAの中でも、最近注目されている長鎖ノンコーディングRNA (long noncoding RNA: lncRNA) について、その発見の経緯とこれまで明らかとなっている機能について述べられている。これまでの大規模トランスクリプトーム解析により、ヒトで約1万個以上のlncRNAの存在が報告されている。そのいくつかは、転写制御、核内構造体形成、翻訳制御、トランスポゾン制御などに関わっていることが分かっているが、ほとんどのlncRNAの機能は不明である。本章では、これまでに機能が明らかとされたHOTAIRやXISTなどのlncRNAの機能について、述べられている。特に本研究で注目したlncRNA、ANRILが、転写抑制因子であるポリコムタンパク質複合体のリクルーターとして機能すること、CDKインヒビターp15、p16の転写抑制を介して、細胞老化制御に関わっていることが述べられている。さらに、同氏が所属する研究室によって、がん化シグナルによって複数のlncRNAの発現量が変動すること、その中にANRILが含まれていたことが述べられている。これらの知見をふまえて、本研究に至った経緯について述べられている。以上、第1章では、本研究の背景と目的が、十分に述べられている。

第2章では、非小細胞肺癌細胞H1299と子宮頸癌細胞HeLaにおけるANRILの機能解明のために行った実験の操作、結果、考察が十分に述べられている。本章の研究から、ANRILは正常細胞と比較して、H1299やHeLa細胞などの各種がん細胞で高発現していることが明らかとなった。ANRILノックダウンの結果、H1299及びHeLa細胞において、CDKインヒビターであるp15のmRNA量が増加し、細胞増殖が顕著に抑制された。これらの結果から、ANRILはp15の転写抑制を介して、H1299及びHeLa細胞の増殖を促進する機能を持つという考察に至ったことが述べられている。

第3章では、結腸癌細胞HCT116におけるANRILの機能解明に関する実験の操作、結果、考察が十分に述べられている。本章の研究から、HCT116細胞において、ANRILはCDKインヒビターp15の転写抑制には関与していないこと、細胞周期のS期進行を促進する機能を持つことが明らかとなった。さらにANRILノックダウンの結果、HCT116細胞の二次元、三次元増殖が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、ANRILは細胞周期のS期進行を促進することにより、HCT116細胞の増殖を正に制御する機能を持つという考察に至ったことが述べられている。




第4章では、がん化シグナルによって発現量が減少するOIP5-AS1の機能と作用機構の解明に関する実験の操作、結果、考察が十分に述べられている。本章の研究から、OIP5-AS1ノックダウンにより、子宮頸癌細胞HeLaの増殖が抑制されることが明らかとなった。さらにOIP5-AS1ノックダウンにより、細胞周期のG2/M期にいる細胞数が増加することが明らかとなった。これらの結果から、OIP5-AS1は、細胞周期のG2/M期進行を促進することにより、HeLa細胞の増殖を正に制御する機能を持つという考察に至ったことが述べられている。

第5章では、本研究全体の総括が記載されている。本研究結果から、ANRILは各種がん細胞で高発現していること、ANRILはCDKインヒビターp15の転写抑制を介して、非小細胞肺癌細胞H1299と子宮頸癌細胞HeLaの増殖を促進する機能を持つという考察に至ったことが述べられている。さらにANRILは、結腸癌細胞HCT116の三次元増殖促進に関与することが述べられている。また、がん化シグナルによって発現量が減少するOIP5-AS1が、子宮頸癌細胞HeLaのG2/M期進行を促進することにより、細胞増殖を正に制御する機能を持つことが述べられている。今後の課題として、ANRILやOIP5-AS1による細胞周期制御メカニズムの解明とその標的遺伝子の探索が挙げられている。

本研究は、長鎖ノンコーディングRNAであるANRILとOIP5-AS1が、がん細胞増殖制御に関与することを示唆するものであり、学術的に非常に重要な発見である。また同氏の研究結果から、ANRILやOIP5-AS1は、がん治療薬の分子標的やがん診断マーカーになることが期待されることから、同氏の研究成果は、社会的意義も大きいと考えられる。以上、本論文は、綿密な実験計画の下に正確な実験とデータを集積した優れた研究成果であり、博士(工学)の学位論文として値するものと評価できる。

博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 30 年 2 月 2 日

審 査 委 員	主 査	神武 洋二郎	
	副主査	藤井 政幸	
	副主査	森田 資隆	
	副 査		印
学位申請者氏名	苗村 円佳		
論 文 題 目	がん化に関与する長鎖ノンコーディングRNAの探索と その作用機構の解明		
(試験結果の要旨)			
<p>平成30年2月2日、博士論文公聴会を開催し、提出論文の内容についての発表を行い、その後、その研究成果を確認するために論文の内容を中心とした口頭試験を行った。同公聴会における質疑応答に対する応答は適切であり、これをもって申請者は最終試験に合格したものと判定する。</p>			