

平成27年3月

大平崇人 学位論文審査要旨

主査 林 一彦
副主査 岡田 太
同 久郷 裕之

主論文

miR-19b regulates *hTERT* mRNA expression through targeting *PITX1* mRNA in melanoma cells

(黒色腫細胞において、miR-19bは*PITX1* mRNAを標的として*hTERT* mRNAの発現を制御する)

(著者：大平崇人、砂村直洋、中山祐二、尾崎充彦、岡田太、押村光雄、久郷裕之)

平成27年 SCIENTIFIC REPORTS DOI:10.1038/srep08201 9 pages

参考論文

1. Identification of *PITX1* as a *TERT* suppressor gene located on human chromosome 5

(ヒト5番染色体上に位置する*TERT*抑制遺伝子として*PITX1*の同定)

(著者：Dong-Lai Qi、大平崇人、藤崎央子、井上敏昭、太田力、尾崎充彦、

大城恵理子、瀬古朋美、青木慎介、押村光雄、久郷裕之)

平成23年 Molecular and Cellular Biology 31巻 1624頁～1636頁

2. Human chromosome 5 carries a transcriptional regulator of human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*)

(ヒト5番染色体は、ヒトテロメラーヌ逆転写酵素*hTERT*を制御する遺伝子を保有する)

(著者：Dong-Lai Qi、大平崇人、押村光雄、久郷裕之)

平成22年 Biochemical and Biophysical Research Communications 398巻
695頁～701頁

学 位 論 文 要 旨

miR-19b regulates *hTERT* mRNA expression through targeting *PITX1* mRNA in melanoma cells

(黒色腫細胞において、miR-19bは*PITX1* mRNAを標的として*hTERT* mRNAの発現を制御する)

テロメラーゼは、多くのヒトがん細胞で活性化しており、テロメアの短小化に起因する細胞老化システムを破綻させ無制限な増殖能の獲得に寄与していると考えられている。したがって、テロメラーゼの制御機構の解明は、発がん過程の理解に繋がる知見を与えることが期待される。著者らは先行研究にて、染色体工学的手法を用い、ヒト5番染色体上にテロメラーゼの酵素活性中心であるhuman telomerase reverse transcriptase遺伝子(*hTERT*)を抑制する因子の存在を明らかにし(参考文献1)、paired-like homeodomain1遺伝子(*PITX1*)がその本体であることを同定した(参考文献2)。しかし、*PITX1*を制御する上流因子については未知のまま残されていた。

microRNA(miRNA)は、20-25塩基程度の非コードRNAであり標的遺伝子の3'UTRに結合し、翻訳阻害を引き起こす。最近、種々のがんで、miRNAの機能異常が発がん過程に深く関与していることが報告されている。本研究では、メラノーマにおける*PITX1*の発現低下の原因の一つがmiRNAである可能性について検討している。

方 法

著者らは、miRNA標的予測ソフトTargetScan6.2を用いて*PITX1*を標的とするmiRNAを検索した。得られた候補miRNAに対する過剰発現実験およびノックダウン実験により、*PITX1*および*hTERT*における発現動態への影響を検討した。また、候補miRNAが*PITX1*のmRNAを直接標的とするか否か検討する目的で、*PITX1*の3'UTR領域をルシフェラーゼ遺伝子に融合させたプラスミドを構築して、レポーター解析によって評価を行った。遺伝子の発現量は定量的RT-PCR法およびウエスタンブロッティングによって解析を行い、テロメラーゼ活性はTRAP(Telomeric repeat amplification protocol)法により評価した。加えて、細胞増殖能の評価のために細胞数を計測した。さらに、メラノーマの臨床検体を用いた遺伝子の発現解析では、免疫組織化学染色法により遺伝子の蛋白質発現を評価し、同じ検体からRNAを抽出してmiRNAの発現解析を行った。

結 果

TargetScan6.2による解析の結果、*PITXI*を標的にする候補miRNAとしてmiR-19aおよびmiR-19bを見出した。293T細胞において、miR-19a/bの過剰発現解析の結果、miR-19bにおいて*PITXI*発現量の低下が認められた。次に、miR-19bが*PITXI*の標的遺伝子であるかを確認するために、レポーター解析を行った結果、miR-19bが*PITXI*の3'UTRを直接の標的とすることを見出した。miR-19b安定発現293T細胞株を用いた解析では、コントロール群に比べ、*hTERT*の発現上昇が認められた。さらに、それはテロメラーゼの活性化と増殖能の亢進を伴うものであった。加えて、メラノーマの細胞株・組織検体におけるmiR-19bと*PITXI*の発現動態解析を行った結果、正常細胞および正常組織に対してメラノーマ細胞では、miR-19bの発現亢進と*PITXI*の発現低下が認められた。また、メラノーマ細胞株A2058におけるmiR-19bのノックダウン解析では、*PITXI*の発現上昇に伴った*hTERT*の発現抑制とテロメラーゼ活性および増殖能の低下が認められた。

考 察

本研究で著者らが発見したmiR-19b/*PITXI*/*hTERT*経路がメラノーマの発生および進展のどの過程に寄与しているかが重要な焦点であると考えられる。興味あることに、正常な甲状腺細胞株に対する変異型v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B 遺伝子 (*BRAF*)の強制発現実験で、顕著なmiR-19bの発現上昇が確認されている。一方、メラノーマで、その50%以上においての*BRAF*遺伝子の変異が確認されており、*BRAF*変異に起因したRAS経路の恒常的な活性化がメラノーマの発生と増悪に関わる主要な鍵因子として知られている。本研究の実験に用いたメラノーマ細胞株も変異型の*BRAF*をコードしていることから、メラノーマにおけるmiR-19bの発現亢進の原因の一つとして*BRAF*遺伝子の変異が上流の因子である可能性が考えられるので、miR-19b/*PITXI*/*hTERT*経路は*BRAF*変異に起因したRAS経路の恒常的な活性化と関連してメラノーマの発生と進展に寄与していることが示唆される。

結 論

miR-19bは*PITXI*の上流因子として機能し*PITXI*を負に制御する新規のmiRNAであり、*PITXI*の発現抑制を通して*hTERT*の発現およびテロメラーゼ活性を亢進してメラノーマの進展に寄与することが示唆された。