

平成28年3月

砂村直洋 学位論文審査要旨

主 査 汐 田 剛 史

副主査 岡 田 太

同 久 郷 裕 之

主論文

Regulation of functional *KCNQ10T1* lncRNA by β -catenin

(β -cateninによる機能的*KCNQ10T1* lncRNAの制御)

(著者：砂村直洋、大平崇人、片岡美喜、稲岡大悟、田辺秀之、中山祐二、押村光雄、
久郷裕之)

平成28年 SCIENTIFIC REPORTS DOI:10.1038/srep20690

参考論文

1. 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

2. Repression of *hTERT* transcription by the introduction of chromosome 3 into human oral squamous cell carcinoma

(ヒト口腔扁平上皮がんへの3番染色体導入による*hTERT* 転写抑制)

(著者：西尾幸与、大平崇人、砂村直洋、押村光雄、領家和男、久郷裕之)

平成27年 Biochemical and Biophysical Research Communications 466巻

755頁～759頁

学 位 論 文 要 旨

Regulation of functional *KCNQ10T1* lncRNA by β -catenin

(β -cateninによる機能的*KCNQ10T1* lncRNAの制御)

著者らは、親起源の明らかな単一ヒト染色体ライブラリーを利用した発現解析により、父性発現を呈する新規インプリント遺伝子としてKCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1 (*KCNQ10T1*)を同定した。*KCNQ10T1*は*KCNQ1*遺伝子内の10番目イントロンからアンチセンスに転写され、その全長が60 kb以上にもおよび長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)である。この*KCNQ10T1* lncRNAは、*KCNQ1*クラスター上にコードされるインプリント遺伝子座に集積(コーティング)し、エピジェネティックに発現抑制する機能を有する。したがって、*KCNQ10T1*は*KCNQ1*クラスターにおいて周辺インプリント遺伝子を制御するインプリントセンターとして機能する。また、*KCNQ10T1* lncRNAのコーティングは細胞周期を通して安定的に認められ、周辺インプリント遺伝子座のみに制限されることから、*KCNQ10T1* lncRNAはRNAの縄張り (RNAテリトリー)を有する。

大部分の大腸がん細胞では、Wnt/ β -cateninシグナル経路の異常が報告されている。 β -cateninは、Wntシグナル依存的に細胞質より核内に移行することで細胞増殖に関わる遺伝子発現を促進することが知られている。著者らは、これまで*KCNQ10T1*遺伝子座のエピジェネティックな修飾および*KCNQ10T1*発現異常が大腸がん細胞および組織において高頻度で認められることを報告してきた。しかし、*KCNQ10T1*の発現異常を引き起こす上流因子を含め、その分子機構は明らかとなっていない。本研究では、大腸がん細胞において*KCNQ10T1*の発現異常が β -cateninにより引き起こされている可能性を検討した。

方 法

著者らは、大腸がん細胞株HCT116、DLD-1、HCT15、SW480を用いて*KCNQ10T1* lncRNA発現量を定量性RT-PCR解析し、それぞれの細胞における核内 β -cateninの蛍光免疫染色解析を行った。続いて、HCT116細胞に β -cateninを過剰発現し、*KCNQ10T1* lncRNAテリトリーの動態をRNA-Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)解析により定量化した。さらに、HCT15細胞において β -cateninのノックダウンを行い、*KCNQ10T1* lncRNAテリトリーの動態をRNA-FISH解析および*KCNQ10T1*制御遺伝子の発現動態を定量性RT-PCR解析した。最後に、核内 β -cateninが直接的に*KCNQ10T1*発現制御に寄与しているかをレポーター解析およびクロ

マチン免疫沈降解析により評価した。

結 果

大腸がん細胞株を用いた*KCNQ10T1*発現解析においてHCT15細胞およびSW480細胞では、HCT116細胞およびDLD-1細胞と比較し、*KCNQ10T1*の有意な発現亢進が認められた。さらに、免疫蛍光染色解析よりHCT15細胞およびSW480細胞では β -cateninの核内蓄積量の増加が認められた。また、 β -cateninの過剰発現実験では、*KCNQ10T1* lncRNAのテリトリー拡大が認められた。加えて、 β -cateninのノックダウン実験では*KCNQ10T1* lncRNAテリトリーの縮小が認められ、*KCNQ10T1*制御遺伝子の脱抑制が認められた。加えて、レポーター解析では β -catenin結合エレメントを有する*KCNQ10T1*プロモーターと比較し、 β -cateninが結合エレメントを欠失させた*KCNQ10T1*プロモーターでは有意にプロモーター活性の低下が認められた。さらに、クロマチン免疫沈降解析ではHCT15細胞およびSW480細胞において β -catenin結合エレメント有するDNA断片の濃縮が認められた。

考 察

本研究で認められた β -catenin依存的な*KCNQ10T1* lncRNAテリトリーの変動は、大腸がん細胞内において*KCNQ10T1* lncRNAテリトリーが変動しうる可能性が考えられ、*KCNQ10T1* lncRNA異所性コーティングにより遺伝子の発現異常を引き起こしている可能性が示唆される。また、大腸がん細胞において、Wnt/ β -cateninシグナル経路の異常に起因する多段階発がんモデルが提唱されている。したがって、本研究で認められたWnt/ β -cateninシグナル経路の異常に起因する β -catenin核内蓄積依存的な*KCNQ10T1* lncRNAの発現上昇は多段階発がんの1つの経路である可能性が示唆される。

結 論

大腸がん細胞において核内 β -cateninは直接的に*KCNQ10T1* lncRNAの転写およびlncRNAテリトリーを制御している。