



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	長鎖非コードRNA RP11-278A23.1は大腸癌の進展に寄与する
Author(s) 著者	小泉, 昌代
Degree number 学位記番号	第76号
Degree name 学位の種別	修士(医科学)
Issue Date 学位取得年月日	2022-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

「修士論文内容要旨」

報告番号 第 76 号 氏名 小泉 昌代

修士論文題名 長鎖非コード RNA RP11-278A23.1 は大腸癌の進展に寄与する

背景・目的

近年、非コード RNA が機能を持つことが明らかとなり、中でも 200 塩基以上の長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) は ガイド、足場、デコイ、miRNA スポンジなどの様々な機能により、発生、分化、幹細胞性、発癌などの生物学的・病理学的プロセスに関与することがわかっている。しかし lncRNA は無数に存在しており、機能が明らかにされているものは少ない。

そこで、罹患・死亡ともに多い大腸癌における発現量と生存解析により lncRNA を絞り込み機能解析を行うことで、大腸癌の進展に寄与する lncRNA を見出したい。

方法

- 1) 大腸癌で高発現し、かつ高発現群で予後不良な lncRNA を絞り込み、ノックダウンにより細胞増殖を測定
- 2) lncRNA ノックダウン時にアポトーシス指標である Caspase-3 活性と Annexin V の測定
- 3) lncRNA 過剰発現によるコロニー形成能
- 4) 核/細胞質分画の RNA を抽出し、lncRNA の細胞内局在を確認
- 5) lncRNA ノックダウンによる発現変動遺伝子を RNA シーケンスで網羅的に解析
- 6) 大腸癌以外の癌種における lncRNA の発現量解析と生存解析

結果

大腸癌で高発現し、高発現群で予後不良となっている lncRNA が 10 個抽出され、これらをノックダウンすると、RP11-278A23.1 が最も細胞増殖を抑制し、アポトーシスを増強した。また、RP11-278A23.1 の高発現は複数の癌種における予後不良因子であった。

データベース上には RP11-278A23.1 とエクソンが重複した転写産物 KLHDC4 Transcript variant X7 (以下、KLHDC4-X7)が存在していた。しかし KLHDC4-X7 はほとんど蛋白を発現しておらず非コード RNA として機能していると考えられ、細胞内局在は RP11-278A23.1 と KLHDC4-X7 の両者とも核分画に多く含まれていた。

si-RP11-278A23.1 と si-KLHDC4 はともに細胞増殖を抑制し、アポトーシスを増強した。si-KLHDC4 により内因性の KLHDC4 と KLHDC4-X7 の両方をノックダウンしつつ KLHDC4 を過剰発現した場合もアポトーシス活性が増強されたことから、このアポトーシス増強は KLHDC4-X7 ノックダウンによるものと考えられた。また、KLHDC4-X7、RP11-278A23.1 いずれの過剰発現でもコロニー形成が促進された。以上より RP11-278A23.1 配列を持つ転写産物が大腸癌において細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制していると考えられた。

p53 正常の大腸癌細胞 HCT116 において RNA シーケンスにより網羅的発現解析を行ったところ、RP11-278A23.1 ノックダウンで p53 標的遺伝子 p21 の発現上昇とアポトーシス関連遺伝子の発現変動を認め、p53 標的選択性への影響が考えられた。一方、p53 変異型の DLD1 や p53 をノックアウトした HCT116 細胞でもノックダウンによりアポトーシス関連遺伝子の発現変動を認めたことから p53 非依存性の経路の存在が示唆された。

結論

RP11-278A23.1 及びその配列を持つ転写産物が大腸癌の細胞増殖を促進、アポトーシスを抑制する事によって大腸癌の進展に寄与していることが示唆され、治療標的として有望であると考えられた。

論文審査の要旨及び担当者

令和 4 年 2 月 16 日提出

(令和 4 年 3 月 31 日授与)

報告番号	第 76 号	氏名	小泉 昌代	
論文審査 担当者	主査	ゲノム医科学部門 教授 時野 隆至	副査	分子生物学講座 教授 鈴木 拓
	副査	医療人育成センター 生物学 教授 佐々木 泰史		

論文題名	長鎖非コード RNA RP11-278A23.1 は大腸癌の進展に寄与する
<p>長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) は ガイド、足場、デコイ、miRNA スポンジなどの様々な機能により、発生、分化、幹細胞性、発癌などの様々な生物学的・病理学的プロセスに関与することがわかっている。本研究では大腸癌の進展に寄与している lncRNA を見出すことを目的とし、大腸癌における lncRNA の発現量・生存解析、細胞増殖アッセイスクリーニングにより、RP11-278A23.1 に焦点を当てた。</p> <p>データベース上には RP11-278A23.1 とエクソンが重複した転写産物 KLHDC4 Transcript variant X7 (以下、KLHDC4-X7) が存在していることが判明したが、KLHDC4-X7 はほとんど蛋白を発現せず、非コード RNA として機能していると考えられた。si-RP11-278A23.1 と si-KLHDC4 はともに細胞増殖を抑制しアポトーシスを促進、KLHDC4-X7 単独のノックダウンもアポトーシスを促進した。また、KLHDC4-X7 と RP11-278A23.1 の過剰発現は共にコロニー形成を促進した。</p> <p>以上より、RP11-278A23.1 配列を持つ転写産物が大腸癌において細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制していると考えられた。</p> <p>RNA シーケンスや qPCR の結果より、RP11-278A23.1 のノックダウンは、p53 正常の HCT116 細胞において p21 の発現上昇やアポトーシス関連遺伝子の発現変動を認め、p53 標的選択性に影響を与えていると考えられた。一方で、p53 変異型の DLD1 細胞や p53 をノックアウトした HCT116 (p53^{-/-}) 細胞においてもアポトーシス関連遺伝子の発現変動を認めたことから、p53 非依存的経路の存在も示唆された。</p> <p>以上の研究は、大腸癌の進展に寄与し治療標的として有望である新規の lncRNA を同定しており、修士論文として適切であるとの評価を得た。</p>	