

審査の結果の要旨

氏名 岸川 孝弘

本研究はマウス膀胱癌において特異的に高発現するノンコーディング RNA であるメジャーサテライト RNA に着目し、その発現様式及び、分子生物学的意義についての解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. メジャーサテライト RNA の発現をマウス膀胱癌モデル、及び前癌病変である PanIN モデルの腫瘍組織を用いて示した。Northern blotting 及び RNA *in situ* hybridization 法により、メジャーサテライト RNA は前癌病変の段階から発現していることが示された。
2. メジャーサテライト RNA の発現はコンセンサス配列方向優位に発現しており、細胞株化して *in vitro* で培養するとその発現が抑制された。
3. PanIN 細胞株(K512)にメジャーサテライト RNA を ectopic に発現する vector を導入して表現型の変化を評価したところ、分裂期において、有糸分裂異常が惹起された。また非分裂期の異常染色体像を示す細胞数も増加していた。さらに長期にメジャーサテライト RNA を発現させると足場非依存性増殖能を有する細胞の割合が増加していた。
4. メジャーサテライト RNA の細胞内での局在を調べるために、核及び細胞質分画に分けて抽出した RNA を用いた Northern Blotting、RNA-FISH 法、 λ N-GFP システムを用いたメジャーサテライト RNA の GFP 標識による蛍光細胞染色をそれぞれ行った。いずれもメジャーサテライト RNA は細胞質に主として局在するという結果であった。
5. メジャーサテライト RNA と結合するタンパク質を同定するために、RNA immunoprecipitation 法を用いて *in vitro* での結合タンパク質を抽出し、LC-MS/MS 法による質量分析を行った。その結果 DNA 修復タンパク質である YBX-1 が同定された。
6. YBX-1 タンパク質は DNA 損傷時に細胞質から核内へ局在が変化するため、メジャーサテライト RNA 導入による局在の変化を蛍光免疫染色法にて観察した。UV 刺激及びエトポシド投与にて DNA 損傷を与えたところ、非導入細胞と比較してメジャーサテライト RNA 導入細胞では YBX-1 の核内移行が阻害されていた。
7. YBX-1 は DNA 修復因子を制御すると言われていたため、UV による DNA 損傷誘発後の DNA 修復関連遺伝子の発現変化を PCRarray で検討したところ、メジャーサテライト RNA 導入細胞において複数の遺伝子の発現が相対的に低下していた。
8. メジャーサテライト RNA 導入細胞の DNA 損傷について評価するために、DNA 二重鎖切断の指標である γ H2AX、酸化ストレスによる損傷の指標である 8-OHdG、UV による損

傷の指標である 6-4pp についてそれぞれ蛍光染色、ELISA 法を用いて検討したところ、メジャーサテライト RNA 導入細胞において優位に DNA 損傷が増加していた。

9. 上記の γ H2AX 陽性細胞は YBX-1 ノックダウン細胞でも増加しており、同様の表現型が示された。

以上、本論文はメジャーサテライト RNA が前癌病変から高発現しており、それが染色体分裂異常、DNA 損傷の増加を惹起することを示した。本研究は発癌過程における遺伝子変異の蓄積という、癌の自然史に深く関わるメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。