

学位授与番号：乙 3 0 6 6 号

氏 名：柳田 聡

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 9 月 11 日

学位論文名：

卵巣癌の造腫瘍能に関与する ANA/BTG3 antisense 転写産物 ASBEL の同定
と機能解析

主論文名：

ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of
ovarian carcinoma（卵巣癌の造腫瘍能に関与する ANA/BTG3 antisense 転写
産物 ASBEL の同定と機能解析）

学位審査委員長：大橋十也教授

学位審査委員：吉田清嗣教授、横尾隆教授

論文要旨

論文提出者名	柳田 聡	指導教授名	岡本 愛光
主論文題名	ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma (卵巣癌の造腫瘍能に関与するANA/BTG3 antisense 転写産物 ASBELの同定と機能解析) Scientific Reports, 3, 1305, 2013		
<p>本研究においては、卵巣癌の性質維持に関与する新規ncRNAの同定と機能解析を目的として癌抑制遺伝子ANA/BTG3のantisense転写産物に注目し、これをASBEL (antisense ncRNA in the ANA/BTG3(three) locus)と名付け以下の解析を行った。</p> <ol style="list-style-type: none">1) ASBELがANA/BTG3に対し逆向きに転写されるncRNAである事を示すために、directional RT-PCR、northern blotting、分画実験を行った。2) ASBELが卵巣癌の造腫瘍能に関与する事を示すために、shRNAによってASBELの発現を抑制した卵巣癌細胞株を用いて、MTT assay、Annexin V assay、Cell Titer-Glo assay、マウスへの移植実験を行った。3) ASBELによるANA/BTG3の制御を示すために、ASBELの発現を抑制もしくは強制発現した後、qRT-PCR、immunoblottingを行った。さらにASBEL、ANA/BTG3両方の発現を抑制してレスキュー実験を行った。4) ASBELによるANA/BTG3の制御メカニズムの解析をするためにRNA免疫沈降を行った。 <p>これらの結果より、以下の事が明らかとなった。</p> <ol style="list-style-type: none">1) ASBELはANA/BTG3と逆向きに転写される2.3KBの核内antisense ncRNAである。2) ASBELは核内でANA/BTG3 mRNAと複合体を形成する事によりANA/BTG3 mRNAの核から細胞質への移動を阻害する。3) ASBELはmRNA ではなくタンパクレベルでANA/BTG3を抑制する事により卵巣癌の造腫瘍能に関与する。 <p>これらのANA/BTG3の制御メカニズムについてはこれが初の報告となる。 ANA/BTG3は前立腺癌や肺癌でも発現が低下している事から、これらの癌においてもASBELがANA/BTG3の制御に関与している可能性が示唆された。実際、我々の予備実験では大腸癌の造腫瘍能に関与する事を示唆する結果が得られている。その事からも、ASBELは様々な癌腫における造腫瘍能に関与している可能性があると思われる。 本研究により、ASBELが卵巣癌のみならず多種の癌における新たなマーカーもしくは治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。</p>			

論文審査の結果の要旨

柳田聡氏の学位申請論文は主論文1編、参考論文2編よりなり、主論文のタイトルは「ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma」、日本語では「卵巣癌の造腫瘍能に関与する ANA/BTG3 antisense 転写産物 ASBEL の同定と機能解析」と題され、2013年に Scientific Reports 誌に発表された。同誌のインパクトファクターは2012年で2.927である。以下、学位申請論文の要旨と審査委員会における審査結果を記載する。

本研究においては、卵巣癌の性質維持に関与する新規 ncRNA の同定と機能解析を目的として癌抑制遺伝子 ANA/BTG3 の antisense 転写産物に注目し、これを ASBEL (antisense ncRNA in the ANA/BTG3(three) locus) と名付け、以下の解析を行った。

- 1) ASBEL が ANA/BTG3 に対し逆向きに転写される ncRNA である事を示すために、directional RT-PCR、northern blotting、分画実験を行った。
- 2) ASBEL が卵巣癌の造腫瘍能に関与する事を示すために、shRNA によって ASBEL の発現を抑制した卵巣癌細胞株を用いて、MTT assay、Annexin V assay、cell Titer-Glo assay、マウスへの移植実験を行った。
- 3) ASBEL による ANA/BTG3 の制御を示すために、ASBEL の発現を抑制もしくは強制発現した後、qRT-PCR、immunoblotting を行った。さらに ASBEL、ANA/BTG3 両方の発現を抑制してレスキュー実験を行った。
- 4) ASBEL による ANA/BTG3 の制御メカニズムの解析をするために RNA 免疫沈降を行った。

これらの結果より、以下の事が明らかとなった。

- 1) ASBEL は、ANA/BTG3 と逆向きに転写される 2.3-kb の核内 antisense ncRNA である。
- 2) ASBEL は、核内で ANA/BTG3 mRNA と複合体を形成する事により ANA/BTG3 mRNA の核から細胞質への移動を阻害する。
- 3) ASBEL は、mRNA ではなくタンパク質レベルで ANA/BTG3 を抑制する事により卵巣癌の造腫瘍能に関与する。

これらの ANA/BTG3 の発現制御メカニズムについてはこれが初の報告となる。ANA/BTG3 は前立腺癌や肺癌でも発現が低下している事から、これらの癌においても ASBEL が ANA/BTG3 の制御に関与している可能性が示唆された。実際、我々の予備実験では大腸癌の造腫瘍能に関与する事を示唆する結果が得られている。これらの事実から、ASBEL は様々な癌種における造腫瘍能に関与している可能性があると思われる。本研究により、ASBEL が卵巣癌のみならず多種の癌における新たなマーカーもしくは治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。

平成 25 年 7 月 29 日、吉田清嗣教授、横尾隆教授両審査委員出席のもとに公開学位審査会を開催し、柳田氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を実施した。試験では以下のよう質問があった。

- (1) 癌における ANA/BTG の遺伝子変異などの報告はないのか？
- (2) ANA/BTG, ASBEL の発現制御機構は？
- (3) ASBEL の発現量と臨床症状の関係は分かっているのか？
- (4) 癌組織での ASBEL の発現を比較している正常組織は採取に困難はなかったか？
- (5) ASBEL をノックアウトした時のアポトーシスのメカニズムは何か？
- (6) 遺伝子発現を抑制する場合、Sh でなく Si にした理由は何か？
- (7) ASBEL のターゲットが ANA/BTG 以外もある可能性はないのか？
- (8) RNA 免疫沈降の実験では mRNA でなくてプレカーサーを見る意味でも totalRNA にすべきではないか？
- (9) ASBEL と ANA/BTG の RNA が複合体を形成した時 ANA/BTG のスプライシングはどうなるのか？
- (10) 卵巣癌の発癌ステップはどうなっているのか？

(1 1) ASBEL が明細胞癌で高発現していないが、当初の目的である明細胞癌の予後を改善するという目的と異なるのではないか？ (1 2) 大腸癌で見つかった ASBEL の高発現という現象ではなくて、卵巣がんで高発現している non-coding RNA を見つけるべきではないか？ (1 3) ANA/BTG の上流にある p53 をターゲットにするような治療法を検討した方が良いのではないか？ (1 4) ASBEL を Si で抑制する遺伝子治療は可能か？

これらの質問に対して、柳田氏は適切に回答し、有用な議論がなされた。

その後、吉田、横尾両教授と慎重に審議した結果、卵巣癌の新規バイオマーカーや新規治療法の開発にも結び付く可能性のある価値ある論文であり、学位を授与するに十分な価値があると認めた次第である。