

Title	がんにおけるexonic lncRNAの機能およびがん遺伝子治療の標的
Author(s)	莫, 峻凌
Citation	
Issue Date	2023-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18437
Rights	
Description	Supervisor: 塚原 俊文, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	MO, Junling		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 561 号		
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 24 日		
論文題目	The role of exonic lncRNAs in cancer and targets for cancer gene therapy		
論文審査委員	塚原 俊文	北陸先端科学技術大学院大学	特任教授
	芳坂 貴弘	同	教授
	藤本 健造	同	教授
	山口 拓実	同	准教授
	松本 邦夫	金沢大学がん進展制御研究所	教授

論文の内容の要旨

In recent years, more and more attention has been paid to gene therapy. To provide targets and methods for gene therapy, we introduced the screening method of exonic lncRNA, the mechanism of lncRNA *PRKDC-210* and the feasibility of Double duplex invasion DNA for gene therapy in this paper.

In recent years, long noncoding RNAs (lncRNAs) have received increasing attention and have been reported to be associated with various genetic abnormalities. However, the functions of many lncRNAs, including those of long exonic noncoding RNAs (lencRNAs), have not yet been elucidated. Here, we used a novel tethering luciferase assay to analyze the transcriptional regulatory functions of five lencRNAs that are upregulated in cancer. We found that the lencRNA *PRKDC-210* interacts with MED12, a component of the CDK8 complex, to regulate the transcription of several genes. The transcriptional activation ability of *PRKDC-210* was abolished in siRNA-treated CDK8-depleted cells. We also confirmed the enrichment of *PRKDC-210* on RNA polymerase II. RNA-seq analysis of cells in which *PRKDC-210* or *PRKDC* mRNA was knocked down using antisense oligonucleotides revealed that *PRKDC-210* can affect the expression levels of genes related to fatty acid metabolism. Finally, we used a ChIRP assay to examine *PRKDC-210*-enriched sites in the genome. Overall, our findings demonstrate that the lencRNA *PRKDC-210* promotes transcription through the CDK8 complex pathway at the transcription initiation site. We propose that *PRKDC-210* can affect the transcription of adjacent genes after its transcription and splicing.

Cancer is the deadliest disease now. Although there is a lot of research on cancer treatment, cancer is still difficult to cure. Here, we show a new anti gene that could be used for cancer treatment. Anti gene (double duplex invasion DNA) was developed by Fujimoto Lab in JAIST. This is a photo-cross-linking oligonucleotide toward the target gene by induction at 385 nm UV irradiation. To assess its potential in cancer treatment, we investigated the effect of this anti gene on cells. The EGFP gene was used as a target gene to evaluate the effect of the anti gene in cells. Because it's easier to observe. We used an EGFP stable expressing HeLa cell line in this study. The viability of cells after anti gene activation was confirmed by MTT assay. To assess apoptosis, the contents of caspase-3 and cleaved caspase-3 were detected by western blotting. We detected a large amount of caspase-3 and cleaved caspase-3 in the cells treated with anti gene. This proves that anti gene triggered apoptosis. Collectively, double duplex invasion DNA must be activated

by 385nm UV radiation to photo-cross-linking with the target gene and trigger apoptosis. I think we can use this anti gene to target cancer-specific genes and use UV to control its activation. In this way, we can kill cancer cells and cause less damage to normal cells.

Keyword: lncRNA, transcriptional regulation, gene therapy, anti gene

論文審査の結果の要旨

遺伝子は発現するが、タンパク質には翻訳されない長鎖非コード RNA (lncRNA) は様々な遺伝子異常との関連が報告されているが、多くの lncRNA の機能はまだ解明されていない。Mo 氏はこれまで解析が困難であった lncRNA の機能を転写レベルで検出する方法として、RNA 断片を GAL4 結合部位に係留することによって基本転写プロモーターである TATA box がより活性化されるか否かを調べる tethering luciferase assay 法を新規に開発し、それを用いて癌で発現が上昇する lncRNA の転写調節機能を解析した。その結果、exon を含む lncRNA である lencRNA、PRKDC-210 が、転写因子と基本転写装置の仲介をする CDK8 複合体の構成要素である MED12 と相互作用し、複数の遺伝子の転写を制御していることを明らかにした。SiRNA によって CDK8 をノックダウンした細胞では、PRKDC-210 の転写活性化能が消失し、さらに PRKDC-210 は RNA polIII と強く結合した。PRKDC-210 または PRKDC mRNA を antisense oligo nucleotide でノックダウンした細胞の RNA-seq 解析から、PRKDC-210 が脂肪酸代謝関連遺伝子の発現レベルに影響を与えることが示唆された。標的 RNA を pull-down し、その RNA に結合するクロマチン断片を解析する ChIRP assay を用いて、ゲノム中の PRKDC-210 に富む部位を調べたところ、PRKDC-210 は自身である PRKDC 遺伝子の転写開始点に凝縮しており、さらに同じ 8 番染色体上に位置する遺伝子の転写開始点に多く存在していた。以上のことから、lencRNA である PRKDC-210 は、転写開始部位において CDK8 複合体経路を介した転写を促進することが明らかとなった。PRKDC-210 は、その転写とスプライシングの後、隣接する遺伝子の転写に影響を与えることができると考えられた。

LencRNA は exon と intron を含む ncRNA であるため、pre-mRNA と混同されやすく、これまで検出や機能解析が困難であったが、Mo 氏の開発した tethering luciferase assay 法によって特定の転写因子や機能性 ncRNA の影響を解析することが可能となった。また、lencRNA は遺伝子変異の産物である可能性があるため、このような変異遺伝子を標的とすることによって癌のような遺伝子変異に起因する疾患細胞への標的医薬開発の可能性が示唆される。そのため、本学の藤本研で開発された double duplex invasion DNA による標的遺伝子への光架橋が細胞に与える影響を調べた。標的遺伝子として EGFP 遺伝子を用い、細胞におけるこの anti gene の効果を評価した。Anti gene で処理によって緑色蛍光の減少が観られたが、これは EGFP の発現抑制だけでなく細胞活性も大きく減少しており、多くの細胞死が示唆された。また、細胞では多量の caspase-3 および cleaved caspase-3 が検出され、apoptosis の誘発が確認された。従って、double duplex invasion DNA は光照射によって標的遺伝子と架橋することで apoptosis を誘発すると考えられた。

以上の様に本論文は、遺伝子治療の標的となる lncRNA のスクリーニング方法を提供し、これまで機能解析が困難であった lencRNA である PRKDC-210 の機能を明らかにすると共に、double duplex invasion DNA の遺伝子治療への適用可能性を示したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士 (マテリアルサイエンス) の学位論文として十分価値あるものと認めた。