

論文の内容の要旨

氏名：吉澤 信輔

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：腎芽腫における *KCNQ1OT1* を標的とした転写因子結合阻害薬 pyrrole-imidazole polyamide による抗腫瘍効果の検討

【はじめに】 Genomic Imprinting とは、父母の配偶子形成過程で epigenetic な情報が genome に刷り込まれ、受精後から生涯を通して父母由来対立遺伝子の発現に差が出る現象である。Imprinting 異常の代表的疾患である Beckwith-Wiedemann 症候群（以下、BWS）は、11p15.5 に原因遺伝子座をもつ先天性疾患であり、高率に腎芽腫などの胎児性腫瘍を合併する。11p15.5 内の 2 つの differentially methylated region (KvDMR, H19DMR) には *KCNQ1OT1/p57^{KIP2}*, *IGF2/H19* という imprinting control region がそれぞれ存在し、それらの遺伝子の欠失、メチル化異常、uniparent disomy によって imprinting 異常が生じ、その結果 BWS が発症すると考えられている。KvDMR では、long non-coding RNA である *KCNQ1OT1* によって腫瘍抑制遺伝子である *p57^{KIP2}*（以下、*KIP2*）を含む周辺遺伝子が *cis* に発現抑制されている。*KCNQ1OT1* promoter 領域の脱メチル化および *KIP2* の低発現は様々な腫瘍で認められており、*KCNQ1OT1* の過剰発現による *KIP2* の発現低下は腫瘍発生に関わっていることが推測される。一方、pyrrole-imidazole polyamides（以下、PIP）は DNA 配列を特異的に認識・結合することが可能であり、目的遺伝子の転写因子結合領域に競合的に結合することで目的遺伝子の発現を抑制することができる新規化合物である。

【目的】 *KCNQ1OT1* の発現を抑制する PIP の開発および *KCNQ1OT1* の過剰発現と *KIP2* の発現低下が腫瘍発生に関連していると考えられる腎芽腫細胞株（G401）に対して、PIP を用いて抗腫瘍効果を検討する研究を計画した。

【方法】 *KCNQ1OT1* promoter 領域で最も活性が高い CCAAT box に結合するように PIP を設計・合成した。それらの DNA 配列特異的結合能の確認を行い、同 PIP を用いて *KCNQ1OT1* の発現抑制をヒト BWS 線維芽細胞株（以下、BWS6, 7, 8, 9）とヒト腎芽腫細胞株（以下、G401）で検討した。また、*KCNQ1OT1* の発現抑制による抗腫瘍効果を G401 で検討した。

【結果】 *KCNQ1OT1* promoter 領域の CCAAT box を認識・結合するように設計・合成した 2 種類の PIP が、それぞれ配列特異的に結合することと生細胞核内に取り込まれることを確認した。BWS6, 7, 8, 9 のうち KvDMR promoter 領域が低メチル化であった BWS6, 9 と、同様に低メチル化であった G401 に対して 2 種類の PIP の同時投与により *KCNQ1OT1* の有意な発現抑制を認めた。G401 では PIP 投与によって、*KIP2* の発現増加は確認されなかったが、*KIP2* 蛋白の発現増加を認めた。さらに、PIP 投与によって非投与群と比較して有意に細胞増殖抑制効果と早期・後期 apoptosis 誘導の有意な増加を認めた。

【結語】 BWS6, 9 と G401 とを用いた in vitro の系において、PIP 投与により *KCNQ1OT1* の有意な発現抑制が確認された。PIP により G401 で生じた細胞増殖抑制効果は、*KCNQ1OT1* の発現抑制により *KIP2* の発現抑制が解除され、*KIP2* 蛋白の発現が上昇し apoptosis 誘導が増加したことによるものと考えられた。以上より、この PIP は腎芽腫および *KCNQ1OT1* が発現増加している腫瘍に対する新規分子標的治療薬となる可能性が示唆された。