

審査の結果の要旨

氏名 児嶋真千子

ヒストンメチル化調節の異常は発がんやがんの進展において重要な役割を果たすと考えられている。本研究では卵巣明細胞癌（OCCC）において発現が亢進しているヒストンメチル化酵素を同定し、その機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. OCCC の臨床検体 23 例と正常卵巣 3 例において、9 のヒストンメチル化酵素について RT-PCR で発現解析を行い、正常卵巣組織と比較して WHSC1 の発現が亢進していることを明らかにした。さらに、OCCC 組織における WHSC1 の免疫組織学的染色でも正常卵巣と比較して WHSC1 の発現が上昇していることを示した。WHSC1 の mRNA の発現量の中央値で 2 群に分け（<中央値， $\geq$ 中央値）、年齢や病期の分類との関連が見られるか検討したが、差はなかった。
2. OCCC 細胞株（OVTOKO,OVISE,RMG1）において WHSC1 特異的 siRNA を使用して、WHSC1 の発現をノックダウンし、細胞増殖にもたらす影響を調べたところ、WHSC1 ノックダウン後では *ARID1A* 変異 OCCC 細胞株（OVTOKO,OVISE）ではコントロール群と比較して有意な増殖抑制が認められた。一方、*ARID1A* 野生型 OCCC 細胞株（RMG1）では細胞増殖抑制効果は観察されなかった。
3. OCCC 細胞株（OVTOKO,OVISE）に 2 種類の WHSC1 特異的 siRNA およびコントロール siRNA（siNC）をトランスフェクションし、フローサイトメトリーで分析した。OVTOKO 株ではコントロール群で S 期の細胞割合が 5.36%であったのに対し、WHSC1 ノックダウン後には 12.96%(siWHSC1#1)、15.17%（siWHSC1#2）と増加を認めた。OVISE 株においてもコントロール群で 6.53%であった S 期の細胞割合が WHSC1 ノックダウン後には 11.27%(siWHSC1#1)、12.56%（siWHSC1#2）と増加を認めた。WHSC1 のノックダウンが細胞周期に何らかの影響を与え、WHSC1 抑制後の抗腫瘍効果に関与している可能性が考えられた。
4. OCCC 臨床検体における WHSC1 と EZH2 の mRNA 発現量の相関を調べたところ、相関係数は 0.4175 で、正の相関関係が示された。EZH2 と WHSC1 の機能的関係を調べるために、EZH2 特異的 siRNA（siEZH2 #1、#2）を使用して EZH2 をノックダウンし、OCCC 細胞株（OVTOKO,OVISE）の WHSC1 の発現レベルを確認した。OCCC 細胞株では EZH2 ノックダウンにより mRNA およびタンパク質レベルでの WHSC1 発現が有意に減少した。また、WHSC1 のヒストンマークである H3K36me2 と EZH2 のヒストンマークである H3K27me3 の発現が低下していることもウエスタ

ンブロットティング法で示した。一方で、WHSC1 をノックダウンしても EZH2 や H3K27me3 の発現レベルは変化しないことがウエスタンブロットティング法で示された。WHSC1 が EZH2 の下流遺伝子であることが示唆された。

5. 選択的 EZH2 阻害剤 GSK126 が WHSC1 や H3K36me2 の発現にもたらす効果を調べるため、24 時間培養後の OCCC 細胞株に DMSO および  $1\ \mu\text{M}$ ~ $20\ \mu\text{M}$  の濃度の GSK126 を添加後、72h~96h 培養し、total RNA やタンパクを回収した。GSK126 の添加濃度については事前に求めた 50% 阻害濃度 (IC50) 値を参考に決めた。RT-PCR やウエスタンブロットティング法で、WHSC1 および H3K36me2 の発現レベルは GSK126 の濃度依存的に低下することを示した。

以上、本論文は OCCC において発現が亢進しているヒストンメチル化酵素 WHSC1 を同定し、その機能解析から、WHSC1 が腫瘍増殖に関与していること、EZH2 の下流遺伝子であることを明らかにした。WHSC1 を直接的に、または間接的に標的とする治療の開発は OCCC の有望な治療戦略となると考えられる。

よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。