

論文の内容の要旨

論文題目 RNA sequence を用いた骨における p53 標的遺伝子の同定

氏名 津田 祐輔

癌抑制遺伝子 *p53* の変異は多くの癌種に見られ頻度が高い。*p53* は転写因子として機能し、その下流遺伝子の発現誘導を介してがん化を抑制する。*p53* に発現誘導される遺伝子はアポトーシスや細胞周期の停止などを誘導し、がん化を抑制している。さらに、近年では代謝、幹細胞の維持、転移、免疫反応を制御し、癌抑制的に働くことが明らかとなっている。これは *p53* が制御している癌抑制機能を明らかにすることにより、癌の早期発見や転移の抑制、癌の治療において新しい可能性が開かれることを示唆している。骨肉腫は最も発生頻度が高い骨原発悪性腫瘍である。骨肉腫のゲノム解析において、最も頻度が高い変異は *p53* 遺伝子変異であり、多いものでは 80% もの症例に何らかの *p53* の変異が見つかっている。また、生殖細胞系列に *p53* 変異をもつ Li-Fraumeni 症候群の患者において、骨肉腫の発生頻度が高いことや間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化過程のいずれかで *p53* に変異を導入したマウスに骨肉腫の発生頻度が高いことは骨肉腫発生における *p53* 変異の重要性を示す所見である。しかし、骨肉腫発生における *p53* 変異の役割については不明な点が多い。近年の報告において *p53* の結合部位や転写活性は細胞特異性があると報告されている。さらに、Li-Fraumeni 症候群の患者や *p53* 欠損マウスにおいて、様々な臓器に悪性腫瘍が発生し、その腫瘍の発生頻度が異なっている。これらの結果は *p53* の腫瘍抑制効果は臓器や細胞特異性を持つ可能性を示唆している。このような点を考慮すると、骨肉腫発生における意義を知る上で骨や骨芽細胞における *p53* の機能を明らかにすることは重要であると考えられる。そこで我々は、骨や骨芽細胞における *p53* 標的遺伝子を網羅的に探索し、新規 *p53* 標的遺伝子を発見することを目的として RNA sequence 解析を行った。また、本研究の目的は骨肉腫発生における *p53* 変異の意義を明らかにし、新規治療標的を同定することである。

野生型及び *p53* 欠損マウスに 10Gy の全身放射線照射を行い、各群 3 サンプル計 12 サンプル (*p53*^{+/+}、*p53*^{-/-}、照射有、照射無) について RNA sequence を施行した。RNA sequence 解析から 23813 遺伝子の発現情報が得られた。*p53*^{+/+}、放射線照射有群において、その他の群と比較して発現が 2 倍より大きく上昇する遺伝子として、69 遺伝子が抽出された。2 倍に上昇する遺伝子セットを用いて DAVID でパスウェイ解析を行ったところ、*p53* signaling pathway が最も上位であり cytokine-cytokine receptor interaction (*CD137L* を含む)、TGF-beta signaling pathway (*FST* を含む) が次に関連するパスウェイとして挙げられた。さらに骨において発現誘導される新規遺伝子群について骨肉腫細胞株を用いてスクリーニングを行い、*p53* 依存的に誘導される遺伝子として *CD137L*、*CDC42BPG*、*FST* を同定した。これらの 3 遺伝子はレポーターアッセイと CHIP アッセイの結果から、*p53* により直接転写誘導される遺伝子であることが分かった。また、コロニー形成アッセイを行い、これらの 3 遺伝子は細胞増殖を負に制御することが分かった。骨でのみ誘導される *CD137L* に着目し機能解析を行った。融合タンパクを作成して解析を行い、*CD137L* は両方向性のシグナルに関与しており、逆方向シグナルは細胞増殖能の低下、正方向シグナルは免疫応答を増強する作用を持つことを明らかにした。また、*CD137L* 融合タンパクはマウスモデルにおいて増殖能を低下させ、新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

今回、我々は RNA sequence 解析を用いて骨において *p53* が制御する遺伝子やパスウェイの全体像を明らかにした。さらに、*CD137L* の骨肉腫発生における意義と治療標的としての可能性を示した。本研究は骨肉腫発生における *p53* の関与と *p53* による免疫制御に関して新しい視点を与えるものである。