

## 論文内容の要旨

論文題目 *Ras/Raf* 誘導性細胞老化における重要因子のゲノム探索

氏名 藤本 舞

正常細胞は細胞分裂をある程度繰り返したのちに細胞老化と呼ばれる不可逆な増殖停止状態に至ることが、1961年にヘイフリックによって報告されている。さらにヒトの正常な体細胞は、テロメアの短縮によって、細胞分裂の回数に限界があることがわかった。この、やがて分裂できなくなることは分裂寿命と呼ばれ、分裂寿命によって生じた細胞老化は複製老化とも呼ばれている。最近の研究では、細胞老化は加齢に伴う疾患にも深く関与していることが明らかになってきた。しかし、早期細胞老化では、がん遺伝子の活性化や酸化ストレス、DNA損傷などのストレスにより急速に細胞の増殖が停止し、通常の状態と同じ状態に至る。これらはストレス性細胞老化、早期細胞老化、などと呼ばれている。細胞老化の重要な特徴は不可逆な細胞の増殖停止であり、がん遺伝子誘導性細胞老化はがん化への抵抗反応であると考えられている。がん遺伝子*Ras*およびそのシグナル下流のがん遺伝子*Raf*の活性化によって、がん遺伝子誘導性細胞老化が引き起こされることがこれまでに報告されている。がん遺伝子が活性化すると、細胞は癌化を防ぐために細胞増殖を不可逆的に停止することが知られ、これを早期細胞老化という。本研究では、*Ras*または*Raf*遺伝子活性化によりマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) に早期細胞老化を誘導し、発現アレイにより遺

伝子発現変化を、ChIP-seq解析によりエピゲノム変化を解析し、*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化での結果と比較するとともに、shRNAライブラリーによるスクリーニングを行った。

*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化は非常に類似していると考えられたが、遺伝子発現情報を用いて階層的クラスタリングを行うと、*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化で共通して変化する遺伝子、*Ras*誘導性細胞老化特異的に変化している遺伝子、*Raf*誘導性細胞老化特異的に変化している遺伝子のそれぞれのクラスターが同定された。

また、ChIP-seq解析によりエピゲノム変化を解析したところ、*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化において、不活化マークであるH3K27me3と活性化マークであるH3K4me3の変化が共通している遺伝子も見られるが、異なる変化が見られる遺伝子も存在した。これらの遺伝子発現情報やエピゲノム変化の結果から、*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化の間には、異なるメカニズムの存在が考えられる。

shRNAライブラリーによるスクリーニングでは、がん遺伝子活性化による細胞老化とともにshRNAライブラリーレンチウイルスを感染させ、細胞老化を回避させるshRNAウイルスを含む細胞のみ選択的に増殖させた。*Ras*誘導性細胞老化では感染7日後、25日後、*Raf*誘導性細胞老化では感染14日後、25日後にDNA回収し、次世代シーケンサーで塩基配列を大量シーケンスすることで濃縮したshRNA配列から有力な候補を得た。また、shRNAライブラリーによるスクリーニングでも、*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化で共通して老化を回避する遺伝子、*Ras*誘導性細胞老化特異的に老化を回避する遺伝子、*Raf*誘導性細胞老

化特異的に老化を回避する遺伝子がそれぞれ同定された。候補の中にはヒストンメチル化酵素をコードする遺伝子も存在し、エピジェネティックな変化が早期細胞老化に重要な役割を果たしているのではないかと示唆される。また、*Ras*誘導性細胞老化および*Raf*誘導性細胞老化両方から特異的な重要候補遺伝子が同定されたことから、*Ras*誘導性細胞老化と*Raf*誘導性細胞老化の間に異なるメカニズムがあるのではないかと示唆される。

本研究の目的は、がん遺伝子*Ras/Raf*誘導性細胞老化における重要な因子を見つけることであり、発現アレイ解析やChIP-seq解析、shRNAライブラリーによるスクリーニングを用いて、がん遺伝子*Ras/Raf*誘導性細胞老化における重要な因子を同定した。