

審査の結果の要旨

氏名 藤本 舞

本論文は、細胞のがん化に対する防御機構の一つと考えられている早期細胞老化について、網羅的手法を用いてその重要因子を探索し同定したものである。

第1章では、本研究の背景の目的を述べている。正常細胞は細胞分裂を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が、がん遺伝子が活性化すると細胞は急速に細胞老化と同じ状態に至る。これは早期細胞老化と呼ばれ、アポトーシスと並び細胞のがん化に対する防御機構の一つと考えられている。通常増殖状態の細胞において *Ink4a* 遺伝子領域はヒストン H3K27me3 修飾を受け不活化されている。老化細胞ではこの領域の H3K27me3 修飾は取り除かれ、*p16/Ink4a*、*p15/Ink4b* の発現上昇が起こりサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ複合体を阻害するため、Rb 蛋白の低リン酸化が誘導される。低リン酸化 Rb が E2F と会合することで E2F 標的遺伝子は発現抑制され、細胞周期の進行は阻害される。このようにエピゲノム修飾で制御された *p16* 遺伝子の発現上昇が細胞老化で重要な役割を果たすことが知られるが、早期細胞老化の分子機構はいまだ十分に解明されていない。そこで本研究ではがん遺伝子 *Ras* および *Raf* の活性化が誘導する早期細胞老化の重要因子を同定することを目的に網羅的解析を行った。

第2章では、*Raf* 誘導性細胞老化のトランスクリプトーム解析および *Ras* 誘導性細胞老化との比較を行っている。*Raf* 誘導性細胞老化においても、*Ras* 誘導性細胞老化で報告されている *p16* 遺伝子や *Bmp2* 遺伝子の発現上昇、*Smad6* 遺伝子の発現低下を認めた。マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、*Ras* 誘導性細胞老化の発現アレイデータも用いて2方向性階層的クラスタリング解析を行うと、遺伝子方向では *Bmp2* を含め *Ras/Raf* 誘導性細胞老化に共通して発現上昇する群、*Smad6* を含め共通して発現低下する群、さらに *Ras* 活性化でのみ特異的に発現上昇する遺伝子群、*Raf* 活性化でのみ特異的に発現上昇する遺伝子群を認めた。*Bmp2* など分泌蛋白環境の変化は細胞老化の誘導に重要な役割を果たすことが知られるが、共通して発現変動する遺伝子群だけでなく、特異的に発現変動する遺伝子群でも、Extracellular space など分泌蛋白環境と関連する GO (Gene Ontology) term の有意な濃縮が認められた。*Ras/Raf* 誘導性細胞老化で共通する細胞老化機構以外に、*Ras* 誘導性、*Raf* 誘導性それぞれで特異的な細胞老化機構が存在する可能性が考えられた。

第3章では、*Raf* 誘導性細胞老化のエピゲノム解析を行い、*Ras* 誘導性細胞老化との比較を行っている。*Raf* 誘導性細胞老化における不活化マーク H3K27me3 の消失・獲得が起きる遺伝子群も、分泌蛋白環境と関連する遺伝子が有意に濃縮しており、*Ras* 誘導性細胞老化で H3K27me3 消失・H3K4me3 獲得を起こす *Bmp2* などは *Raf* 誘導性

細胞老化でも同様のエピゲノム変化を起こしていた。しかし Ras 誘導性細胞老化で H3K27me3 獲得し H3K4me3 消失することで強く発現抑制される *Smad6*などは、Raf 誘導性では H3K27me3 獲得が起こらず発現抑制も軽度であった。エピゲノム変化にも Ras 誘導性、Raf 誘導性それぞれで共通あるいは特異的な標的領域が存在した。

そこで第4章では、がん遺伝子活性化が誘導する早期細胞老化の重要因子を探索するため shRNA ライブラリーによる網羅的ノックダウンを行った。shRNA はマウス 16,000 遺伝子のそれぞれに対し5種類ずつ、計 80,000 種類の shRNA を発現させる shRNA レンチウィルスライブラリーを用いた。Ras 活性化、Raf 活性化、それぞれのモデルで shRNA を 8,000 種類ずつ、10 プールに分けて網羅的ノックダウンを施行した。細胞老化を回避した細胞のみ増殖を続けるため、回収した DNA に含まれる shRNA 配列を次世代シーケンサーにて大量シーケンスし、高率に濃縮してシーケンスされた shRNA 配列を抽出した。濃縮が認められた shRNA の標的遺伝子は52個あり、そのうち43遺伝子に対し shRNA レンチウィルス感染を行って検証した。43遺伝子中、Ras 誘導性細胞老化では3遺伝子 (*p16*, *Lamb1-1*, *Ndufb7*) で、Raf 誘導性細胞老化では4遺伝子 (*p16*, *Suv420h2*, *Zswim1*, *Kras*) で、老化の回避が確認された。回避が確認されなかった shRNA は、次世代シーケンサー解析の際の PCR 増幅で偏って増幅された可能性や、ライブラリー感染のときに複数の shRNA レンチウィルスが感染して老化を回避した可能性などが考えられた。これら老化回避が確認された shRNA のうち、*Kras* に対する shRNA では *Kras* 発現低下が確認されなかったことからオフターゲットによる老化の回避が考えられた。その他の shRNA では標的遺伝子のノックダウンが確認され、細胞老化の重要な因子と考えられた。

第5章ではあらためて全体の考察を記述している。

本研究では細胞老化に重要な因子でありその発現上昇がマーカーにも用いられる *p16* が、実際に Raf 誘導性、Raf 誘導性細胞老化のどちらも老化回避させる shRNA として同定された。*Lamb1-1*, *Ndufb7*は Ras 誘導性でのみ、*Suv420h2*, *Zswim1*は Raf 誘導性でのみ、それぞれ候補 shRNA として抽出され、そして抽出された細胞老化モデルでのみ老化回避が認められている。そして *Suv420h2* はヒストン H4K20 をメチル化してヘテロクロマチン化するエピゲノム修飾酵素として知られる。(i)これらの結果はまず、研究手法の確からしさを証明している。(ii)さらに第2章・第3章で提唱した、Ras/Raf 誘導性細胞老化に共通する機構と特異的な機構の存在を、実際にそれぞれの細胞老化機構を特異的に破綻させる shRNA を同定、すなわち細胞老化に重要な因子の同定に成功することで証明している。(iii)エピゲノム制御でも両方で異なる機構が存在することを、*Suv420h2* のノックダウンが Raf 誘導性細胞老化のみ特異的に老化回避させることを同定することで証明したものである。がん遺伝子が誘導する早期細胞老化を理解する上で非常に興味深い成果と考えられる。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。