

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |    |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 博士（薬科学）                            | 氏名 | 大野 裕司 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 新しいがん関連遺伝子ヒト C7orf24 の遺伝子発現制御機構の解明 |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                    |    |       |
| <p>C7orf24 遺伝子はヒト 7 番染色体上の推定 ORF として見出された遺伝子である。最近 C7orf24 が膀胱癌や前立腺癌、乳癌など様々ながん組織で高発現していることが明らかとなり、C7orf24 は新しい癌バイオマーカーや分子標的になりうると期待されている。また C7orf24 は、未同定であったグルタチオン代謝酵素の一つである <math>\gamma</math>-glutamyl cyclotransferase であることも最近報告された。申請者は、がん分子標的治療における C7orf24 の有用性の確立に向け、C7orf24 遺伝子発現の分子メカニズムの解明を行った。</p>                                                   |                                    |    |       |
| [第一章 ヒト C7orf24 遺伝子転写調節領域の同定]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                    |    |       |
| <p>ヒト正常二倍体およびがん由来の培養細胞株を用いた発現解析の結果、C7orf24 遺伝子のがん組織特異的な発現は転写レベルで制御されていることが明らかとなった。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                    |    |       |
| <p>ヒト C7orf24 遺伝子の転写制御機構の解明を目指し、まずレポーター遺伝子アッセイを用いて C7orf24 遺伝子の転写調節領域の同定を試みた。転写開始点から約 2,000bp までの 5' 上流領域のプロモーター活性を検討したところ、ヒト C7orf24 遺伝子の最少プロモーター領域は 58bp 上流域までに存在し、さらに最大プロモーター活性を示すには 371bp 上流までの領域で十分であることが分かった。配列予測解析の結果、371bp までの 5' 上流領域には CCAAT ボックスや GC ボックスなどが存在し、これらのモチーフに結合する転写因子によって C7orf24 遺伝子の発現が制御されている可能性が考えられた。</p>                              |                                    |    |       |
| [第二章 ヒト C7orf24 遺伝子転写促進因子の同定]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                    |    |       |
| <p>C7orf24 遺伝子プロモーター中に存在する 3 か所の CCAAT ボックスの意義を点変異体を用いた解析によって検討した結果、いずれの CCAAT ボックスも本遺伝子の転写に重要であることが明らかとなった。また、ゲルシフトアッセイ、特異抗体を用いたスーパーシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイ解析の結果、これらすべての CCAAT ボックスには、CCAAT ボックス結合因子の一つである NF-Y が結合することが明らかとなった。さらに siRNA による NF-Y 発現レベルの低下は、C7orf24 mRNA 発現量の減少を引き起こしたことから、転写開始点近傍での NF-Y の結合が C7orf24 遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。</p> |                                    |    |       |
| <p>また同様に、転写開始点から 195bp 上流に位置する GC ボックスについても、C7orf24 遺伝子転写における重要性が示唆され、本配列に転写因子 Sp1 が結合することが明らかとなった。</p>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                    |    |       |
| <p>転写開始点近傍で複数の NF-Y によって転写制御される遺伝子の多くは、細胞周期進行と関わるものが多い。そこで、C7orf24 遺伝子発現についても細胞周期進行との関わりを検討した結果、C7orf24 の mRNA レベルは S 期で最大、G2/M 期で最小となり、細胞周期制御因子 E2F1 と同様の遺伝子発現パターン示すことが明らかとなり、C7orf24 が細胞周期進行に関与している可能性が示唆された。</p>                                                                                                                                                |                                    |    |       |

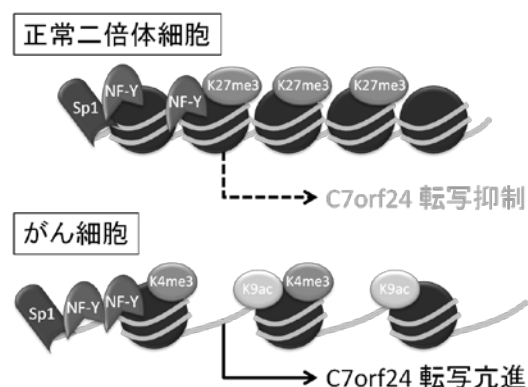
### [第三章 がん細胞内での C7orf24 遺伝子高発現の分子機構の解明]

前章までの解析の結果から明らかとなった C7orf24 遺伝子の転写活性化機構は、正常細胞とがん細胞の間では活性化の程度は大きく異なるものの、転写調節領域や転写活性化因子の結合などでは大きな差異は見いだされず、本遺伝子のがん細胞特異的な高発現を説明することができなかった。そこで、C7orf24 遺伝子発現のエピジェネティックな制御の可能性について検討した。

ChIP アッセイを用いて、正常ならびにがん細胞株それぞれの C7orf24 遺伝子周辺のヒストン修飾を解析した。その結果、正常細胞 IMR-90 の本遺伝子領域では、転写抑制と関連するヒストン修飾であるヒストン H3 の Lys27 残基側鎖のトリメチル化修飾が起こっていること、一方、がん細胞である HeLa 細胞の同領域では、転写活性化と関連するヒストン修飾であるヒストン H3 の Lys4 残基側鎖のトリメチル化ならびに Lys9 残基側鎖のアセチル化が認められた。以上のヒストン修飾の差異の結果は、細胞間における C7orf24 遺伝子周辺のクロマチン構造の差異を示唆するものであり、正常細胞では C7orf24 遺伝子周辺のクロマチン構造は高度に凝縮しているためにその転写が低レベルであるのに対して、がん細胞中の本遺伝子のクロマチンは脱凝縮しており、高レベルの転写が可能となっていることが示唆された。

本研究では、新規がん関連遺伝子であるヒト C7orf24 の遺伝子発現の分子基盤を解明することができた。得られた知見は、C7orf24 を様々ながんに対するバイオマーカーとして開発を進める上で重要な知見となり得るだけでなく、未だ詳細が明らかとなっていないがん細胞増殖における C7orf24 の機能解明ならびにその機能制御法の開発において大きな示唆を与える結果である。

C7orf24遺伝子高発現の分子機構



(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、膀胱癌や前立腺癌、乳癌など様々ながん組織で高発現しているヒト C7orf24 に着目し、がん分子標的治療における C7orf24 の有用性の確立に向け、C7orf24 遺伝子発現の分子メカニズムの解明を行った。すなわち、ヒト正常二倍体およびがん由来の培養細胞株を用いた発現解析の結果、C7orf24 遺伝子のがん組織特異的な発現は転写レベルで制御されていることを明らかにし、C7orf24 遺伝子の転写調節領域を解明するとともに C7orf24 遺伝子の転写活性化に重要な転写因子として、NF-Y ならびに SP1 を同定した。さらに、C7orf24 遺伝子発現のエピジェネティックな制御についても解析を行い、正常細胞では C7orf24 遺伝子周辺のクロマチン構造は高度に凝縮しているためにその転写が低レベルであるのに対して、がん細胞中の C7orf24 遺伝子のクロマチンは脱凝縮しており、高レベルの転写が可能となっている可能性を示した。これらの知見は、C7orf24 が新しいがんバイオマーカーやがん化学療法のための新しい分子標的になりうる可能性を示したものである。

よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 24 年 2 月 27 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 25 年 3 月 31 日以降