

氏名	中山 裕介		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9 4 6 1 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Transcriptomic Perturbation in Cancer Cells by Genome Wide Profiling (ゲノムワイドプロファイリングを活用した癌細胞における転写産物摂動に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	原田 隆平
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹

論 文 の 要 旨

遺伝子情報は、ゲノムから転写産物を経てタンパク質へと情報を伝播することで、生命現象を発現・維持している。その中間分子である転写産物は、タンパク質の多様性、ならびに、生命活動の制御に重要な役割を果たしている。このため、細胞内の転写摂動を分析・把握することは、生命活動の理解を深める上で重要な研究戦略となる。近年、遺伝子配列解析技術の飛躍的な進歩により、網羅的な転写産物情報の取得が可能となり、そこから得られた新たな知見が、生物学の進展に大きく貢献している。しかしながら、刺激応答時の細胞内において、転写産物は量的及び質的に複雑な摂動状態を示しており、その膨大な情報の中から生物学的に意義のある情報を抽出することは極めて困難である。そのため、網羅的な転写産物摂動の研究においては、多様な生物情報処理アプローチを駆使することが求められている。特にがん細胞においては、多種多様な遺伝変異の蓄積とそれに伴う転写調節機構の制御異常により、転写産物の複雑性及び転写活性が高まっているため、がん細胞の生物学的理解を深めるには、ゲノムワイドに転写産物摂動を把握することが必要不可欠である。そこで著者は、がん細胞内の網羅的転写産物情報を取得し、多様なプロファイリング技術を活用することで、がん細胞内の転写産物摂動状態を理解し、最終的に抗がん制御に関する新たな生物学的な仮説の導出に至った。

第1部において著者は、CENP-E発現抑制時におけるがん細胞内の転写産物摂動を量的な分析により考察し、がん細胞増殖抑制機構の解明を目指した研究について論じている。CENP-E及びEg5遺伝子は細胞分裂期における染色体整列および染色体分割を制御する分子群である。CENP-Eの機能阻害は染色体整列の異常を引き起こし、がん細胞株において細胞増殖を抑制し、細胞死が誘導される。この細胞死誘導は染色体整列に関連するEg5でも観察されるが、染色体不安定性を有するがん細胞においては、その細胞死誘導はCENP-Eを阻害したときのみ観察される。染色体不安定性のがん細胞は特定の化学療法剤や免疫チェックポイント阻害剤が治療有効性を示さないことが知られているため、CENP-E阻害による細胞死誘導の分子機構を解明することは、新たながん治療法の開発に繋がると考えられる。そこで著者は、CENP-EおよびEg5の発現抑制時の網羅的遺伝子発現情報を取得し、量的な遺伝子発現プロファイリングを実施することで、細胞死誘導の分子機構の解明を試みた。HeLa細胞にBubR1遺伝子の発現抑制を誘導し、がん細胞に染色体不安定性状態を誘導した。この細胞にCENP-EおよびEg5の遺伝子発現抑制をsiRNAで誘導し、マイクロアレイにより網羅的転写産物情報を取得した。変動遺伝子解析およびパスウェイ解析によるプ

ロファイリングを実施することで、著者はp53パスウェイおよびDNA損傷反応が発現亢進していることを見出し、CENP-E阻害による増殖阻害はp53を介した細胞死誘導に起因するという仮説を導き出した。

第2部において著者は、選択的ポリアデニル化（APA）調節剤を同定し、がん細胞内におけるAPA調節剤処置時の転写産物摂動をもとに、APA調節の分子機構の解明を目指した研究について論じている。APAは遺伝子発現制御機構において重要な役割を担っており、細胞分化および細胞増殖など、多くの生物機能に関わっている。また、多く腫瘍組織においてAPAの発現変化が観察されており、APAはがんとの関連性が強く示唆されている。したがって、APAを選択的に調節する薬剤は、APA制御機構に関する基礎研究への活用にとどまらず、がん治療薬としての応用も期待されている。しかし、選択性の高いAPA調節剤は未だ同定されていない。そこで著者は、選択的APA調節剤を新たに見出し、細胞内における薬剤処理時の転写産物摂動を質的にプロファイリングすることで、APA調節剤のがん細胞における転写物制御機能を検証した。APA変化を検出する化合物スクリーニング系を構築し、新規の選択的APA調節剤であるT4とT5を見出した。次に、がん細胞に対するT4とT5の転写摂動への影響を分析するために、T4及びT5を処置したU2OS細胞における網羅的mRNA発現情報(mRNAseq)及び3'末端情報(3'seq)を次世代シーケンサーにより取得した。mRNAseqデータに対して、網羅的なスプライシング状態をプロファイリングすることにより、T4とT5がコーディング領域を変化させるCR-APAを特異的に誘導していることが判明した。3'seqデータからpolyAサイトの遷移状態をプロファイリングしたところ、T4とT5がpolyAサイトのDtp遷移を優勢的に誘導することが分かった。次に著者はAPA変化と転写反応の関係を分析するため、APA変化のパターンプロファイリングを実施した。その結果、濃度依存的にDtp遷移を示すクラスターを同定し、そのクラスター内に属するAPA変化はイントロン領域に特異的にpolyAサイトが遷移していることが判明した。また、そのクラスター内の遺伝子群は細胞増殖とmRNAプロセッシングに関連する遺伝子が有意に多く含まれていることが分かった。APA変化を制御する因子を解明するため、濃度依存的にDtp遷移を示すpolyAサイトの周辺塩基配列を分析した結果、RNA結合タンパクであるPABPファミリーおよびKHDRBSファミリーが認識するA-richモチーフが有意に存在することが判明した。それらのRNA結合タンパクの中から、T4とT5が影響を与える分子を特定するため、siRNAによる発現制御時のAPA変化を比較した結果、PABPN1の発現抑制をしたAPAプロファイルがT4とT5のプロファイルと類似していたことから、T4とT5がPABPN1を介してAPA変化を誘導しているという仮説を導き出した。この仮説を検証するために著者は、PABPN1のタンパク発現を確認し、T4とT5処理後にPABPN1のタンパク量が濃度依存的に減少していること、さらに、T4とT5で観察された一連の作用はPABPN1の発現抑制した際に見られるAPA変化と類似していることを見出した。これらの結果から著者は、新規に同定したT4とT5がPABPN1を介してAPA変化を誘導させていると結論した。腎がんおよび肝がん患者における先行研究において、PABPN1の高発現と予後の悪化との関連とPABPN1の発現抑制によるがん細胞の増殖抑制が報告されている。これらのことから著者は、選択的APA調節剤であるT4とT5はAPAの基礎研究への活用だけでなく、新たながん治療候補薬としての活用を提案するに至った。

審 査 の 要 旨

本研究において著者は、大規模、かつ、繊細な転写産物摂動を把握できる多面的なゲノムワイドプロファイリング系を構築して、細胞分裂期における染色体整列および染色体分割を制御する CENP-E の阻害が染色体不安定がんの細胞死を誘導する可能性を提案した。さらに、この多面的なゲノムワイドプロファイリング系を活用して、細胞分化や増殖を制御するポリアデニル化の選択的な調整ががん細胞の増殖を抑制することを見出した。著者が用いた生物情報処理アプローチは多様な細胞種における転写産物摂動の差異を詳細に把握できるため、生命現象の理解の深化はもとより、多種多様な性状を呈するがん細胞種の独自性の理解に大きく貢献することが十分に期待できる。これらのことから本研究は、生物学領域において独創性に秀でており、学術的な価値が高いと評価された。

令和2年1月29日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。