

論文の内容の要旨

論文題目 Characterization and functional analysis of two novel genes, *TIPUH1* and *SMYD3*, involved in human carcinogenesis

和訳 ヒト発がんに関与する遺伝子 *TIPUH1* および *SMYD3* の機能解析

指導教員 中村 祐輔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名ファビオ・ピッテラ・シルヴァ

肝細胞がんは予後の不良な悪性腫瘍であり、その死亡者数は世界全体で年間 50 万人を数える。近年の目覚ましい医学の進歩・発展にも関わらず、肝細胞がんの有効な診断および治療は未だ確立されておらず、早急に解決しなければならない問題である。

発がん分子メカニズムの解明やその関連分子を同定することは、新しい肝細胞がんの予防・治療法を開発する上で重要である。我々は以前に cDNA マイクロアレイを用いた肝細胞がんの遺伝子発現プロファイル解析を行い、肝細胞がん発現亢進を認める 165 個の遺伝子を同定した。そのうち、本学位論文では *TIPUH1* (Transcription Involved Protein Up-regulated in HCC 1) および *SMYD3* (SET and MYND-domain containing 3) についての機能解析を行い、発がんとの関連性について検討した。

TIPUH1 遺伝子は KRAB ドメインや 12 個のジンクフィンガードメインを含む推定 500 アミノ酸のタンパク質をコードする。マイクロアレイを用いた発現解析において、*TIPUH1* は肝細胞がん 14 症例中、11 例において発現亢進が認められた。半定量 RT-PCR においても、*TIPUH1* の発現上昇は 10 例中 7 例で認められた。またノーザンブロット解析の結果、正常組織での *TIPUH1* の発現は精巣および胎盤で認められたが、今回検討した他の 14 組織ではその発現は認められなかった。マウス線維芽細胞 NIH3T3 を用いたコロニーフォーメーションアッセイでは、*TIPUH1* はその増殖を促進した。一方、siRNA による *TIPUH1* 発現の抑制は、HepG2、Huh7、SNU449 および Alexander などの肝がん細胞株の増殖を低下させたことから、*TIPUH1* はがん細胞の増殖に関与していることが明らかとなった。さらに、*TIPUH1* の生物学的機能を詳細に検討するため、FLAG タグの付いた *TIPUH1* を発現する細胞を作製して、免疫沈降により *TIPUH1* と共沈するタンパクを抽出した後、質量分析計にてその結合タンパクの同定を試みた。その結果、TIF1 β 、hnRNPU、hnRNPF および nucleolin の 4 つの因子が *TIPUH1* と相

相互作用することが明らかとなった。これらは転写共役因子として働くことや、mRNA のスプライシングなどに係わることが知られていることから、これらの相互作用因子を介する遺伝子の転写制御が TIPUH1 の機能に重要な役割を演じていることが示唆された。

我々は以前に肝細胞がんおよび大腸がんが発現亢進を認める遺伝子 *SMYD3* を同定し、*SMYD3* がこれらのがん細胞の増殖に深く関わっていることを報告した。本研究では、この知見に加え、乳がんでも *SMYD3* の発現が亢進していることを見出した。siRNA の実験から、*SMYD3* は乳がん細胞の増殖も促進することが示された。また、*SMYD3* はがん遺伝子として知られる *WNT10B* の発現を直接的に制御していることが明らかとなった。これらの結果は、*SMYD3* が乳がん治療薬の標的分子となりうる可能性を示唆するものである。また我々は、*SMYD3* の機能に関する新知見として、がん細胞において分解された *SMYD3* の存在を示唆した。アミノ酸配列解析の結果、分解型 *SMYD3* ではその野生型と比して N 末端側の 34 個のアミノ酸が欠落していた。興味深いことに、その分解型 *SMYD3* や 15 と 17 番目のグリシンを他のアミノ酸に置換した変異型 *SMYD3* は野生型より高いメチルトランスフェラーゼ活性を示した。この N 末端部位を詳細に解析した結果、HSP90 α がこの N 末端部位と結合すること、ならびに *SMYD3* のメチルトランスフェラーゼ活性を調節していた。したがって、*SMYD3* の N 末端部位はそのメチルトランスフェラーゼ活性に重要な役割を演じ、分解型 *SMYD3* が示す高いメチルトランスフェラーゼ活性は、N 末端部位の欠失によるタンパク高次構造の変化または HSP90 α との結合阻害が関係しているものと推察された。以上の結果は、*SMYD3* のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性の調節機構を明らかにし、このメチルトランスフェラーゼ活性をターゲットとした新たながん治療薬の開発に寄与するものと考えられる。

TIPUH1 および *SMYD3* はがん細胞において発現亢進が認められ、これらの発現抑制はがん細胞の増殖を阻害したことから、これらの遺伝子機能を標的とした薬物は効果的ながん治療薬になるかも知れない。以上、本学位論文は新たな発がんメカニズムの解明、および肝細胞がん、大腸がん、乳がんを含むがんに対する新規の予防・治療法の開発に寄与するものと考えられる。