

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 高山賢一

本研究は前立腺癌において重要な機能を持つステロイドホルモンであるアンドロゲンによる機能を探索するためクロマチン免疫沈降とゲノムタイリングアレイを用いた ChIP-chip 法によりアンドロゲン受容体(AR)のヒトゲノムにおける結合部位を系統的に探索し AR の直接的な応答遺伝子の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒトゲノム中の ENCODE 領域を並べた DNA タイリングアレイを用いて AR 結合部位(ARBS)の同定を試みた。クロマチン免疫沈降法によって得られた DNA を *in vitro* transcription(IVT)法を用いてバイアスのかからない状態にて増幅し得られた DNA を断片化、ビオチン化しタイリングアレイにハイブリダイゼーションした。コントロールに比較して有意に増加( $P$  値 $<10^{-5}$ )している領域を 10 箇所同定した。
2. 得られた ARBS は intron 領域及び転写開始点より 10 kb 以上離れた intergenic 領域に存在しているものがほとんどであった。得られた AR 結合領域の例として UGT1A 遺伝子近傍および CDH2 遺伝子内に AR 結合部位を認めた。
3. 得られた AR 結合部位の Sequence を用いて ARE motif の同定を試みた。matrix として TRANSFAC, Jasper を用いたところ何らかの ARE 様の motif が見出された。これらの ARE motif に対してプライマーを設計し LNCaP 細胞において ChIP assay を施行し 10 箇所すべてにおいて 10 倍以上の濃縮が認められ ChIP-chip 法により求められた AR 結合領域が偽陽性を含まないものであることが確認された。
4. アセチル化ヒストン H3、ヒストン H4、RNA Polymerase II (Pol II) に対する特異抗体を用いて ChIP Assay を行い定量的 RT-PCR を用いて 10 箇所の AR 結合部位のアセチル化、Pol II の結合を解析した。UGT1A1、CDH2 の AR 結合部位においてヒストンのアセチル化の亢進、RNA Pol II の結合が強く観察された。またその他の ARBS すべてにおいてヒストン H4 のアセチル化が確認された。今回同定した ARBS10 箇所(#1-10)のうち ARBS#1、4、5、10 においてリガンド依存性のヒストン H3 アセチル化の亢進、RNA Pol II の集積が確認され、AR 結合領域において転写活性化を促す変化が起きている可能性が示唆された。
5. ARBS 近傍の遺伝子のアンドロゲン処理における mRNA 発現の変化を検証しアンドロゲン応答遺伝子の同定を試みた。10 箇所の遺伝子のうち 8 箇所は 2 倍以上の発現上昇を認め、特に UGT1A1、Pepsinogen C は強い発現誘導が確認された。また MET、SCAP2 の 2 箇所については処理により発現の抑制が観察された。これらのことより AR 結合領域の近傍の遺伝子の発現がアンドロゲンにより制御を受けていることが示唆され

6. SRC ファミリーの特異抗体を用いて ChIP Assay を行った。10 個の AR 結合領域においては特に UGT1A、CDH2 の AR 結合領域において SRC ファミリー全ての結合が強く確認された。また ARBS#4、#5 においては SRC1 の集積が上昇しているのが確認された。全ての AR 結合部位に SRC ファミリーが関与しているとは言えないもののいくつかの AR 結合部位については SRC ファミリーによる転写活性化の機構が働いていることが示唆された。
7. AR 結合領域がエンハンサーとしてアンドロゲンによる転写活性化に寄与している可能性を考えるシフエラーゼアッセイを用いて検証した。UGT1A の ARBS を挿入したルシフェラーゼベクターではアンドロゲン添加時に活性の上昇が認められ、その一方で ARE motif に変異を入れると活性の上昇は消失し、UGT1A の ARE motif がアンドロゲンによる転写活性化に寄与しておりエンハンサーとして働くことが考えられた。また CDH2 の ARBS を挿入したルシフェラーゼベクターにおいてもアンドロゲン添加時に活性の上昇が確認された。AR 結合領域がエンハンサーとして働きアンドロゲンによる転写活性化に関わっている可能性が示唆された。
8. 本研究により新たに見出した標的遺伝子はカドヘリン、プロテアーゼ、代謝酵素、シグナル伝達、成長因子受容体、イオンチャンネル、転写因子など様々な機能にわたる遺伝子が同定された。個々の遺伝子と前立腺癌とのかかわりは未知なものがほとんどであり今後の機能解析により前立腺癌への影響が明らかになるものと期待された。

以上、本論文は前立腺癌細胞において ChIP-chip 法を応用することで新規のアンドロゲン受容体の結合部位ならびに AR の直接の応答遺伝子を同定することに成功し、ChIP-chip 法がホルモン依存性癌におけるステロイドホルモンの転写ネットワーク網の解明に重要な貢献をなすことを可能とした。本研究はアンドロゲンの前立腺癌における作用機構の解明に貢献するものと期待され学位の授与に値するものと考えられる。