

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 山本 信三

本研究ではヒストン H3 の 9 番目のリシン残基を脱メチル化する酵素である GASC1 (Gene Amplified in squamous cell carcinoma1, 別名 JMJD2C, JHDM3C, KDM4C) に着目した。GASC1 は元来食道癌細胞での増幅から同定された遺伝子であり、この遺伝子によってコードされる分子がヒストン脱メチル化活性をもち、その抑制が食道癌細胞の増殖を抑制するという知見が報告されている。一方で大腸癌における報告がないことより大腸癌における GASC1 の発現異常およびその意義の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸癌手術検体 20 例の癌部・非癌部組織より RNA を抽出し GASC1 発現レベルを解析したところ、癌部において GASC1 発現の高い症例が約半数の 11 症例 (55%) で存在しそのほとんどの症例で非癌部における GASC1 発現を認めなかった。
2. 以前に当研究室で行われた大腸癌細胞株を用いた SNP アレイによる LOH 解析の結果を参照すると大腸癌においては GASC1 遺伝子が存在する 9p23-24 に Gene amplification を認めず、大腸癌癌部における GASC1 高発現のメカニズムとして GASC1 発現を促進する上流シグナルが存在する可能性を検討した。大腸癌細胞株を用いて  $\beta$ -catenin をノックダウンすることで大腸癌で重要な Wnt シグナルを抑制すると GASC1 発現が抑制されたため、大腸癌において GASC1 発現は Wnt シグナルに制御される可能性が示唆された。
3. 比較的 GASC1 発現の高い大腸癌細胞株 WiDr においてレンチウイルスを用いて GASC1 の安定ノックダウン細胞株を樹立し、その表現型を解析した。食道癌細胞と異なり GASC1 発現抑制による増殖能への影響は認めず、同時に遊走能・浸潤能にも変化を示さなかったが、*In vitro* における腫瘍形成能を評価するため sphere formation assay を施行したところ GASC1 ノックダウン細胞株では sphere 形成が抑制された。ノックダウン細胞に Gasc1 を発現させることでこの表現型が回復すること、また膀胱癌細胞株で GASC1 をノックダウンすることでも同様の表現型がみられたことから、この表現型は GASC1 に特異的な現象であると考えられた。
4. WiDr コントロール細胞株・GASC1 ノックダウン細胞株を用いて sphere を作成し RNA を抽出後、cDNA アレイを用いて GASC1 により発現が制御される遺伝子群の網羅的探索を施行した。大腸癌の腫瘍形成に Wnt シグナル・Notch シグナルが関与している報告があることより、cDNA アレイの結果をもとに Wnt シグナル・Notch シグナルの遺伝子群を用いて GSEA 解析を行った。GASC1 ノックダウンにより Wnt シグナル・Notch シグナルの遺伝子群全体としては有意な変

動は認めなかったが、その中でWntシグナルの下流に位置しNotchシグナルの一つであるJAG1の発現が低下していることに着目した。JAG1がGASC1の標的遺伝子であることを確認するためにクロマチン免疫沈降法を施行したところGASC1はH3K9me3メチル化レベルとは独立してWntシグナルのkey moleculeである $\beta$ -cateninのJAG1プロモーター領域へのリクルートを制御することでJAG1発現を制御することが示された。

5. 大腸癌細胞でJAG1の安定ノックダウン細胞株を樹立しsphere assayを施行したところsphere形成は抑制され、Wntシグナル下流遺伝子JAG1は腫瘍形成能低下の責任遺伝子のひとつであることが示唆された。

以上、本論文ではヒストンH3の9番目のリシン残基を脱メチル化する酵素GASC1が大腸癌細胞の腫瘍形成能を制御することを見出した。その過程でWntシグナルの下流で発現するNotchリガンドJAG1をGASC1の標的遺伝子として同定し、同時に $\beta$ -cateninによるJAG1の発現にGASC1を介した転写制御が必須であることを見出した。このことはヒストン修飾因子GASC1が大腸癌におけるWntとNotchシグナルのクロストークを媒介し、腫瘍形成能獲得に寄与している可能性を示唆した。実際に大腸癌手術検体においてGASC1発現とJAG1発現との間に有意な相関があることが確認できた。本研究結果は大腸癌においてもエピジェネティック修飾機構の異常ががんの性質の変化をもたらしその進展に寄与する可能性を示唆するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。