

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 山賀 亮之介

本研究は乳がんの増殖や進展において重要な役割を演じていると考えられている転写因子であるエストロゲン受容体のネットワークを明らかにするため、ヒト乳がん細胞株 (MCF-7) に 17β エストラジオールを添加して時系列の RNA サンプルを採取し、次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドなエストロゲン応答遺伝子の探索を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)-Seq の手法を用いて転写産物の転写開始点を反映する Tag Cluster (TC) を定量的に解析した結果、1550 個のエストロゲン応答性 TC を同定した。その中で、既報データベースのエストロゲン受容体結合部位 (ERBS; Estrogen Receptor Binding Site) の近傍 10 kb 以内に存在し、既知遺伝子 (RefSeq 遺伝子) の転写開始点にマッピングされる、高発現・高エストロゲン応答性の TC を 26 個同定した。この 26 個の TC に相当する 26 遺伝子に対して、定量的 RT-PCR による発現解析を行い、15 遺伝子のエストロゲン応答性が検証された。

2. RNA-Seq の手法を用いて転写産物全長を定量的に解析した結果、2291 個のエストロゲン応答性遺伝子を同定した。その中で、既報データベースの ERBS 近傍 10 kb 以内に存在する、高発現・高エストロゲン応答性の RefSeq 遺伝子を 37 個同定した。この 37 遺伝子に対して定量的 RT-PCR による発現解析を行い、29 遺伝子のエストロゲン応答性が検証された。

3 CAGE-Seq 及び RNA-Seq によって同定され、定量的 RT-PCR によって検証されたエストロゲン応答遺伝子に関して、それぞれの遺伝子に対する siRNA を用いて各遺伝子をノックダウンし、MCF-7 細胞における増殖、遊走、エストロゲン受容体活性に対する影響を検討した。その結果、10 遺伝子のノックダウンによって増殖もしくは遊走が有意に影響を受けた。これらのうち、7 つの遺伝子は新規のエストロゲン応答遺伝子であり、乳がんの増殖や進展に関わり得る新たなエストロゲンシグナルの存在が示された。

4. CAGE-Seq 及び RNA-Seq の結果より、今まで遺伝子の存在が報告されていない領域に、CAGE-Seq 及び RNA-Seq の両方でエストロゲンによって発現が亢進される新たな転写産物を同

定した。定量的 RT-PCR によってもエストロゲンによる転写亢進が検証された。この転写産物は長鎖 non-coding RNA であることが想定されたが、今までエストロゲン応答性の長鎖 non-coding RNA の報告はなく、今回の報告によって新たなエストロゲンシグナルが存在する可能性が示唆された。

以上、本論文は次世代シーケンサーを用いてヒト乳がん細胞株 MCF-7 における 17β エストラジオール負荷後の時系列 RNA を解析することにより、新たなエストロゲン応答遺伝子を同定し、さらに乳がん細胞の増殖や遊走に影響を与える遺伝子を同定した。又、今までエストロゲン応答性の報告されていない長鎖 non-coding RNA に関しても、新規のエストロゲン応答性転写産物を同定した。これらの結果は、乳がんの増殖や進展に関わるエストロゲン応答経路の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。