

平成31年 2月

網崎正孝 学位論文審査要旨

主 査 久 郷 裕 之

副主査 藤 原 義 之

同 汐 田 剛 史

主論文

Identification of genes involved in the regulation of telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌におけるテロメラーゼ逆転写酵素の制御に關与する遺伝子の同定)

(著者：網崎正孝、土谷博之、坂部友彦、藤原義之、汐田剛史)

平成31年 Cancer Science 掲載予定

参考論文

1. Comparison of single-stapling and hemi-double-stapling methods for intracorporeal esophagojejunostomy using a circular stapler after totally laparoscopic total gastrectomy

(腹腔鏡下胃全摘術後のサーキュラーステープラーを用いた体腔内食道空腸吻合術におけるシングルステーブル法とヘミダブルステーブル法の比較)

(著者：網崎正孝、木原恭一、遠藤財範、鈴木和則、中村誠一、澤田隆、清水哲)

平成28年 Surgical Endoscopy 30巻 2994頁～3000頁

2. Prognostic value of postoperative complication for early recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌摘出治療後の早期再発における術後合併症の予後的価値)

(著者：網崎正孝、齊藤博昭、徳安成郎、坂本照尚、本城総一郎、藤原義之)

平成30年 Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International 17巻
323頁～329頁

学位論文要旨

Identification of genes involved in the regulation of telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌におけるテロメラーゼ逆転写酵素の制御に関与する遺伝子の同定)

ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) は正常肝細胞ではほとんど発現していないが、肝細胞癌 (HCC) 及び前癌病変において高発現していることが知られており、さらにTERTプロモーター領域には高頻度に遺伝子変異が起きていることが報告されている。従って、TERTは、HCCの発生及び進展に関与していると考えられる。TERT及びその発現制御機構は有望な癌治療標的の一つとなるが、未だ確立した治療薬はない。本研究ではプロモーターを介したTERT発現制御メカニズムを解析し、新たな治療標的となりうる遺伝子の同定を目的とした。

方 法

肝癌細胞株HepG2に対しTERTプロモーター制御下にEGFPを発現するプラスミドを安定導入した。この細胞に約2万種類のshRNAレンチウイルスライブラリーを感染させ、EGFP発現が低下した細胞に組み込まれたshRNAよりTERT発現に関与する遺伝子を同定した。これらの遺伝子の過剰発現によりTERT mRNA発現及びテロメラーゼ活性が上昇する事を確認した。さらにプロモーターアッセイでこれらの遺伝子の応答領域を同定し、TERTプロモーターを活性化するメカニズムを解析した。また、臨床検体を用いてHCCでの遺伝子発現を定量的RT-PCRにより測定し、これらの遺伝子とTERT発現との関連を検討した。また、TCGAデータベースを用い、これらの遺伝子とHCC患者の予後との関連を検討した。

結 果

スクリーニングにより、TERTプロモーターの活性化に寄与すると考えられる6つの候補遺伝子を同定した。これらの遺伝子のうち、C15orf55とC7orf43とに対するshRNAはTERT mRNA発現を低下させた。また、C15orf55及びC7orf43の過剰発現によりTERT mRNA発現が上昇し、さらにこれらの遺伝子の安定発現株は細胞倍加時間が短縮していた。C15orf55及びC7orf43のTERTプロモーターの応答領域が、-58から+36塩基対、-169から-59塩基対の間にあることが明らかとなった。C15orf55は、SP1結合領域として知られるGCモチーフが応答領

域であり、C15orf55の一過性過剰発現によりTERTプロモーターに結合するSP1量が増加した。C7orf43はGABPAおよびEGR1の結合領域が応答領域であり、GABPAとEGR1との両方に関与するHippoシグナル経路のエフェクターYAP1を介してTERTプロモーターを制御していると考えられた。また、C7orf43によるプロモーター活性の上昇はYAP1遺伝子のノックダウンにより打ち消された。HCC患者の肝癌組織においてC15orf55及びC7orf43とTERTの遺伝子発現は相関していた。さらに、C15orf55及びC7orf43は、良性肝疾患患者から採取した正常組織に比較し、HCC患者の癌部、非癌部いずれにおいても高発現していた。TCGAデータベースを用いた377名のHCC患者の解析では、C15orf55とC7orf43の両方あるいはどちらかを高発現した患者は全生存期間が短く、再発率も高くなる傾向であった。

考 察

C15orf55は、BRD4と共にヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) を活性化することが報告されているが、本研究では、C15orf55は新たな経路としてSP1を介してTERTプロモーターを制御していることが明らかとなった。一方、C7orf43はAMOLT2と相互作用することが報告されており、AMOLT2はYAP1により転写が促進されるが、YAP1を抑制する作用も有するネガティブフィードバック因子である。本研究では、C7orf43によりYAP1が活性化し、AMOLT2の発現も上昇していた。以上により、C7orf43はYAP1の活性化因子であり、AMOLT2のYAP1阻害作用を減弱していると考えられた。

TERT及びテロメラーゼ高発現HCC患者は予後不良であることが知られている。よってC15orf55およびC7orf43はTERT発現を介してHCC患者の予後に密接に関連していることが示唆された。しかし、C15orf55はSP1を、C7orf43はYAP1を活性化すること、SP1とYAP1いずれも腫瘍細胞の増殖や悪性度に関わることが知られているので、C15orf55及びC7orf43にはTERT非依存的にHCC患者の予後に影響を与える可能性も考えられた。以上より、C15orf55とC7orf43を治療標的とする、TERTのみならずSP1やYAP1を介する抗HCC治療法の開発につながると考えられた。

結 論

ゲノムの網羅的解析によりプロモーターを介したhTERT発現制御に関わる2つの遺伝子を同定した。