

【21】

氏 名	はせがわ まりこ 長谷川 真理子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第786号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (先端外科学)
学位論文題目	RING1A regulates RING1B expression and the collapse of its expression impairs neuroblastoma cell proliferation (RING1AはRING1Bの発現を制御し、RING1A発現量の変化は神経芽腫の増殖を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉原重美 (副査) 教授 野崎美和子 教授 伴 慎一

論文内容の要旨

【背景】

神経芽腫は小児の腹部固形悪性腫瘍で最も頻度の高い腫瘍であり、ハイリスク群では未だ有効な治療がなく、長期予後50%と予後不良である。ポリコーム抑制複合体1（PRC1）はRING1A、RING1B、BMI-1など複数のタンパクからなる複合体で、E3ユビキチンリガーゼ活性によりヒストンH2Aの119番目のリジンモノユビキチン化する。これにより遺伝子発現抑制を引き起こし、いくつかの悪性腫瘍で癌細胞の発生や進行に寄与しているとの報告がある。BMI-1は癌化との関連が初めて報告された遺伝子であり、B、T細胞リンパ腫の発生に寄与している他、大腸がん、直腸がん、肝細胞がんなど多種の悪性腫瘍で高発現していることが分かっている。神経芽腫においては、MYCNがBMI-1を直接的に誘導し*TSLC1*、*KIF1B*βといったがん抑制遺伝子の発現を抑制することで、神経芽腫の悪性化に関与することが報告されている。またRING1Bも*ELOVL2*の転写を抑制し、ドコサヘキサエン酸の発現抑制を導くことで神経芽腫の増殖を引き起こすとの報告がある。本研究ではPRC1の主要構成要素であるRING1A（遺伝子名：*RING1*）に着目して神経芽腫の生存や悪性化への関与を明らかにするため、神経芽腫細胞株を用いてRING1A発現量を操作し、その表現型の変化を確認した。

【目的】

神経芽腫におけるRING1Aの重要性を明らかにし、エピゲノムの理解を深めるとともに、分子標的薬のターゲットとしての可能性を探ることが本研究の目的である。

【対象と方法】

本研究は埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所にて、生命倫理委員会の承認を得て実施した。まず、公開されている神経芽腫臨床検体のRNAシーケンスデータを2種類入手し、それぞれRING1発現量を中央値で高発現量と低発現量に分けてKaplan-Meier曲線を作成した。Long-rank検定によりRING1の発現量と予後の関連を評価した。その後、神経芽腫細胞株を用いてRING1A過剰発現およびノックダウンを行い、神経芽腫の増殖能の変化を確認した。神経芽腫細胞株はNGPを用い、過剰発現はマウスのRing1プラスミドを形質転換にて導入することで行った。ノックダウンはRING1Aを標的としたshort-hairpin RNA (shRNA) を設計しpLKO-Tet-On vectorを用いてNGP株に導入し、ドキシサイクリン依存性にshRNAを誘導することで行った。RING1Aおよび、RING1Bの発現量はWestern blot法にて確認した。細胞増殖能の変化はコロニーアッセイおよび細胞数計測により行った。2群間の比較はStudent T検定、多群間の比較はTukey検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとして評価した。

【結 果】

臨床検体におけるKaplan-Meier曲線では、異なる2つのデータセットいずれもRING1発現量の低い群で予後不良であった。この結果から、神経芽腫ではRING1Aががん抑制遺伝子としての機能を持つという仮説を立て、NGP株へのRING1A過剰発現を行った。その結果、過剰発現を行った群で細胞増殖が有意に抑制された。またRING1Aの過剰発現によって、PRC1のもう一つの主要構成要素であるRING1Bの発現低下が確認された。続いて、逆の表現型を確認するため、RING1Aのノックダウンを行った。ドキシサイクリンによりshRNA発現を誘導し、経時的変化を確認した。RING1A発現量はドキシサイクリン添加により経時的に低下し、それに伴いRING1B発現量が増加した。予想外なことに、RING1Aノックダウンによっても細胞増殖は有意に抑制された。

【考 察】

Kaplan-Meier曲線ではRING1高発現群で予後が良く、がん抑制遺伝子として機能する可能性が示唆されたが、RING1高発現群と低発現群の中央値の差は1.5倍未満であり、これはRING1Aが広範に発現していることを示唆している。RING1Aの過剰発現、ノックダウンではともに神経芽腫細胞の増殖抑制が見られ、神経芽腫の生存にはRING1Aの至適発現量が必要であると考えられた。今回過剰発現に用いたプラスミドはマウス由来のものであったが、ヒトとマウスの間では一部アミノ酸配列の不一致があり、ヒトRING1Aの過剰発現では異なる表現型が見られる可能性は否定できない。またRING1A過剰発現およびノックダウンでRING1Bの発現抑制および増加が見られたことに関しては、以前RING1B欠損マウスの胚性幹細胞でRING1Aの発現増加が見られたとする報告があり、今回の実験でもこれと似た相互作用が起こったと見ている。しかし今回の実験結果から両者には細胞増殖能を補完する働きはないことが明らかになった。これまで、RING1Aは他のPRC複合体のE3ユビキチンリガーゼ活性の補助的な役割を担うとされており、RING1A自体の働きについては未知な部分が多い。今回神経芽腫においてRING1A発現量もたらす表現型の変化、そしてRING1Bの発現量への影響が明らかになった。今後ゲノムワイド関連解析を行うことで、RING1Aの標的遺伝子を同定し、他の

PRC複合体との相互関係を明らかにすることで、臨床的意義を見出したいと考えている。

【結 論】

RING1Aの発現量を操作すると神経芽腫の増殖は抑制される。RING1AはRING1Bの発現を負の方向に調節しているが、増殖能においてその機能は補完されていない。分子標的薬のターゲットとしての臨床的意義は未だ不明であるが、神経芽腫の生存にはRING1Aの至適発現量が必要であるという重要な知見が得られた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

小児悪性腫瘍の一つである神経芽腫の高リスク群は、5年生存率が50%未満と未だに予後不良であり有効な治療法の確立が急がれている。近年、遺伝子変異を伴わない修飾（エピゲノム）による遺伝子発現の制御（エピジェネティクス）の異常が、がんの発生や悪性化に関係することが明らかになってきており、神経芽腫においてもその重要性に注目が集まっている。当該論文では、ヒストン修飾を担うポリコム抑制複合体1（PRC1）のRING1Aに着目して、その発現量と神経芽腫細胞の増殖能の変化について検討している。過去に公開された神経芽腫臨床検体のシーケンスデータをもとに作成したKaplan-Meier曲線で、RING1A高発現群で予後が良いことが推測され、その仮説をもとにヒト神経芽腫細胞株を用いてRING1Aの過剰発現およびノックダウンを行って細胞増殖能の変化を確認した。神経芽腫細胞株はNGP株を用い、RING1Aの過剰発現はマウスの*Ring1*プラスミドを形質転換にて導入することで行った。ノックダウンはRING1Aを標的としたshort-hairpin RNA（shRNA）を設計しpLKO-Tet-On vectorを用いてNGP株に導入し、ドキシサイクリン依存性にshRNAを誘導することで行った。結果、1）RING1A過剰発現でもノックダウンでも細胞増殖能が低下したこと、2）RING1Aの発現量増加に伴いRING1Bの発現量は低下し、RING1Aの発現量減少に伴いRING1Bの発現量は上昇したことを明らかにした。このことから、RING1AはRING1Bの発現量を制御しており、神経芽腫の生存にはRING1Aの至適発現量が必要と結論づけている。

【研究方法の妥当性】

神経芽腫臨床検体のmRNAシーケンスデータの入手方法および解析方法は妥当である。その結果に基づき仮説を立てて研究を実行しており、研究の道筋が明解である。RING1A過剰発現、ノックダウンは遺伝子組み換えにより行い、発現量の変化はWestern blot法、細胞増殖能の変化はコロニーアッセイおよび細胞数計測により行っており、いずれも妥当である。

【研究結果の新奇性・独創性】

神経芽腫細胞株を対象としたRING1Aの重要性に言及した初めての研究である。神経芽腫におけるエピゲノムの理解を深めるとともに臨床応用への期待が持てる新しい知見を提供しており、新奇性・独創性に優れた研究内容である。

【結論の妥当性】

RING1Aの発現量を操作した遺伝子組み換え実験により、神経芽腫にはRING1Aの至適発現量が必

要であるという結論、そしてWestern blotによるタンパクレベルでの発現量の評価により、RING1AはRING1Bの発現量を制御しているという結論を得ている。いずれも適切な実験計画に基づいて見出された結果であり、結論は理論的かつ妥当である。

【当該分野における位置付け】

集学的治療の進んだ現代においても依然として予後不良の高リスク神経芽腫に対して、エピゲノムをターゲットとした新たな治療戦略の可能性を秘めており、得られた新知見は臨床への貢献度が高いと評価した。

【申請者の研究能力】

明確な目的をもって、細やかな研究計画を立て実行している。本研究結果をもとに、探求心をもってすでに更なる研究を進行させている。遺伝子組み換え技術を習得し、臨床腫瘍学、遺伝子工学の知識を備えており、申請者の研究能力は高いと評価した。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(47 : 115-123, 2020)