

学位論文の要旨

氏名	上條 陽平
学位論文題目	<i>in vitro</i> および <i>in silico</i> 解析を組み合わせたp53経路を介するがん生存因子の単離技術の開発

長年がん遺伝子と考えられてきたp53遺伝子は、近年ではがん抑制遺伝子である証拠が示されてきている。本論文は、short hairpin RNA (shRNA) ライブラリーを用いた*in vitro*の遺伝子スクリーニングと、データベースに登録された遺伝子プロファイルデータの*in silico*解析を組み合わせてp53に関連したがん抑制経路を調査し、がん患者の生存因子を単離したものである。

第1章では、過去の研究の経緯と本研究の目的ならびに意義について述べた。

第2章では、次世代シーケンサーを用いてshRNAライブラリーを解析し、p53経路を亢進もしくは抑制する遺伝子の探索した結果について述べた。ヒト骨肉腫細胞株U2OSにshRNAライブラリーを導入して遺伝子の発現を抑制し、アクチノマイシンD (Actinomycin D, ActD) を用いてアポトーシスを誘導し、遺伝子抑制による細胞の生存性の変化を指標にActD感受性および耐性遺伝子をスクリーニングした結果、ActD感受性遺伝子としてTP53を含む161遺伝子、ActD耐性遺伝子として161遺伝子が選択された。これらの遺伝子には、p53経路の制御遺伝子やp53の標的遺伝子が含まれていた。

第3章では、第2章の検索で得られたp53経路を制御する可能性のある候補遺伝子についてデータベース解析を行い、大腸がん患者の生存予後との関連性を調べた。具体的には、まずGene Expression Omnibusから取得したp53野生型大腸がん患者の遺伝子発現プロファ

イルを解析し、遺伝子発現が大腸がん患者の生存予後に影響する5974遺伝子を見出した。これらの遺伝子と、スクリーニングで選択された遺伝子では、ActD感受性の161遺伝子のうち43遺伝子、ActD耐性の161遺伝子のうち47遺伝子が共通することが判明した。また、ActD感受性の43遺伝子のうち7遺伝子、ActD耐性の47遺伝子のうち33遺伝子が、p53変異型大腸がん患者では生存予後に影響を与えていなかった。このことから、これらの遺伝子群にはp53経路を介したがん患者の生存因子が含まれると考えられた。さらに、shRNAライブラリースクリーニングとバイオインフォマティクスを組み合わせで選択された40遺伝子には、p53の制御との関連するCCNB, ANKHD, NCOA, SIPA, IKBKB, LITAFが含まれていた。また、がん患者の生存因子であるNCOA, HOXA, FOLR, SOCS1およびPI4KAも含まれていた。特にNCOA3は、発現が抑制されるとp53が安定化し、高発現のがん患者では予後不良であることが報告されている。以上のことから、本手法はp53経路で機能して、予後と関連する新規遺伝子の効果的な探索に有効であると考えられた。

第4章では、これまで得られた結果を総括するとともに、本研究の今後の展望についても述べた。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation: Development of isolation method for cancer prognostic factors via the p53 pathway by a combination of *in vitro* and *in silico* analyses

Name: **Yohey Kamijo**

This thesis mainly comprises that evidence has been shown that the p53 gene, which has been thought of as a long-standing cancer gene, is a cancer suppressor gene in recent years. In this paper, I investigated the cancer suppression pathway related to p53 by combining *in vitro* gene screening using a short hairpin RNA (shRNA) library and *in silico* analysis of gene profile data registered in the database, and I searched the surveillance factors of patients.

In Chapter 1, the history of past study and the purpose and significance of this research were explained.

In Chapter 2, shRNA library was analyzed using the next generation sequencer and described the results of screening for the genes that promote or suppress p53 pathway. As a result of introducing shRNA library into human osteosarcoma cell strain U2OS, and restraining genetic expression, and deriving apoptosis using actinomycin D (Actinomycin D, ActD), and having screened ActD-sensitive or ActD-resistant genes as an index by a change of the viability of the cell by the gene restraint, 161 ActD-sensitive genes including TP53 and 161 ActD-resistant genes were obtained, respectively. The regulating genes of the p53 pathway and the target genes of p53 were included in these genes.

In Chapter 3, Database analyses were performed on 322 candidate genes that could control p53 pathway obtained in the search in Chapter 2 and the relevance to survival prognosis of colon cancer patients was examined. At first, the gene expression profile of the p53 wild type colon cancer patient acquired from Gene Expression Omnibus was analyzed, and the expression of 5974 genes which influenced the survival convalescence of the colon cancer patient were found. 43 genes among 161 ActD-sensitive genes and 47 genes among 161 ActD-resistant genes were common in the above 5974

genes and the genes from screening. 7 genes among 43 ActD-sensitive genes and 33 genes among 47 ActD-resistant genes did not affect the survival convalescence in the p53 pathway of colon cancer patients. Therefore, it was revealed that the survival factor of the cancer patient in the p53 pathway was included in these gene clusters. Furthermore, CCNB, ANKHD, NCOA, SIPA, IKBKB, LITAF related with the control of p53 were included in 40 genes chosen by combination of shRNA library screening and bioinformatics. In addition, NCOA, HOXA, FOLR, SOCS1, and PI4KA which are survival factor of the cancer patient was included. In particular, it was reported that p53 is stabilized and the cancer patients who are p53 high-expressed have poor prognosis when the expression of NCOA3 gene is restricted. Based upon the foregoing, it was thought that this technique functioned in p53 pathway, and that it was effective for searching novel genes concerned with prognosis.

In Chapter 4, the results of this study were summarized and the future prospects of this research were discussed.