

氏 名（本籍）	おか はら ふみ あき 岡 原 史 明（香 川 県）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 5121 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	新規癌抑制因子の細胞内動態変化に基づく発癌制御メカニズムの解明		
主 査	筑波大学教授	博士（医学）	土 屋 尚 之
副 査	筑波大学教授	医学博士	野 口 雅 之
副 査	筑波大学准教授	薬学博士	伊 東 進
副 査	筑波大学助教	博士（医学）	福 田 綾

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

細胞増殖に対して抑制的な機能を果たす癌抑制因子の存在は、癌発症の limiting factor として重要な意義を有する。*p53* に次いで多くの癌細胞で変異が見出されている癌抑制遺伝子 *PTEN* は、細胞増殖性シグナル伝達分子であるホスファチジルイノシトール 3,4,5- トリリン酸 (PIP_3) を特異的に分解することにより、癌抑制因子としての役割を担うことが知られている。しかしながら、*PTEN* に対する制御機構に関しては不明な点が多く、その制御経路における責任因子を同定することは、発癌メカニズム解明のために早急に解決されるべき課題である。申請者の所属する研究グループは *PTEN* と結合する因子 *PICT-1* を単離することに成功した。本研究で、申請者は、癌抑制因子 *PTEN* および *PICT-1* の制御異常に起因する発癌メカニズムの解明を試みた。

（対象と方法）

癌細胞（ヒト子宮癌由来 HeLa 細胞, ヒトグリオブラストーマ由来 U87MG 細胞, ヒト乳癌由来 MCF7 細胞, ヒト前立腺癌由来 PC3 細胞, マウス線維芽細胞由来 NIH3T3 細胞, マウス FM3A 由来温度感受性 EI 欠損型変異株 ts85 細胞）および腫瘍組織（ヒト神経芽腫生検標本）を解析対象とした。細胞内タンパク質の発現抑制には RNA 干渉 (RNAi) 法を用いた。細胞内への遺伝子導入にはリポフェクション法またはエレクトロポレーション法を用いた。細胞内の mRNA およびタンパク質は、RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより検出した。抗 *PICT-1* 抗体は DNA ワクチン法を用いて作製した。細胞数の変化は細胞増殖アッセイ (XTT assay) により評価した。細胞の足場非依存性増殖能は軟寒天中でのコロニー形成 (Soft Agar assay) を指標に評価した。細胞死の比率はアポトーシスアッセイ (TUNEL assay) または細胞死アッセイ (PI 染色) により評価した。細胞内におけるタンパク質間の結合は免疫沈降により解析した。*PICT-1* の細胞内局在は免疫細胞染色により解析した。

（結果）

PTEN 制御因子としての *PICT-1* の生理機能を検討するために、RNAi 法により内在性 *PICT-1* をノックダウンした結果、*PTEN* のリン酸化量減少に伴い *PTEN* タンパク質の分解速度が促進された。また、*PICT-1* のノックダウンに伴い、 PIP_3 を介する細胞増殖シグナル (Akt, S6K など) の恒常的活性化、足場非依存性増

殖能の獲得、および抗アポトーシス活性の亢進が観察された。また、ヒト神経芽腫における PICT-1 および PTEN タンパク質の発現量の間に、正の相関性が観察された。

さらに、抗癌剤をはじめとした様々なストレス因子に応答して、細胞内の PICT-1 タンパク質がプロテアソーム依存性の選択的分解を受けることが明らかとなった。上記 PICT-1 分解過程においてユビキチン化された PICT-1 の蓄積は観察されなかった。プロテアソームを介した PICT-1 分解に対するユビキチン依存性を検証すべく、RNAi 法によるユビキチン活性化酵素 (E1) のノックダウンおよび温度感受性 E1 欠損型変異株 ts85 細胞を用いて解析した結果、ストレス刺激に応答して E1 非依存性の分解が引き起こされることが明らかとなった。

また、癌細胞において主に核小体に存在する PICT-1 は、上記ストレス刺激に応答して核質 (核膜を含む) へと局在を変化させることが明らかとなった。さらにこの状況下における PTEN との関与を検討した結果、PTEN を強制発現させた細胞では、PICT-1 の分解速度が著しく低下するとの結果が得られた。

(考察)

細胞内 PICT-1 の発現抑制によるリン酸化量減少を伴う PTEN 分解促進は、PICT-1 が PTEN のリン酸化過程に必須であり、PTEN の安定性を決定する因子であることを示唆している。さらに、PICT-1 の発現抑制により足場非依存性増殖能およびアポトーシス抵抗性の獲得が引き起こされたことは、PICT-1 が癌抑制因子として機能している可能性を示している。また、ヒト神経芽腫における PICT-1 および PTEN タンパク質の発現量の正の相関は、実際のヒト腫瘍においても、PICT-1 を介した PTEN タンパク質の量的変動が腫瘍の原因となっている可能性を示唆している。

一方、抗癌剤をはじめとした様々なストレスに応答して PICT-1 が局在を変化させ、ユビキチン非依存性かつプロテアソーム依存性の分解を受ける現象は、従来のユビキチン・プロテアソーム系を介した分解経路とは異なるものである。また、PTEN 強制発現細胞ではストレス応答性 PICT-1 分解が緩和されたことから、両分子間に、「PTEN 安定化因子 PICT-1」という関係のみならず、ストレス環境下においては「PICT-1 安定化因子 PTEN」という関係が成り立つ可能性が示唆された。すなわち、PICT-1 は細胞内で PTEN と相互に安定化因子として機能する反面、ある種のストレス環境下においては発現量や機能が抑制されている可能性を示す。これらの知見は、抗癌剤治療が PICT-1 分解を誘起する可能性を示唆し、申請者は、抗癌剤治療と併用して PICT-1 の分解を抑制することが、癌の再発を予防する上で重要である可能性を提唱している。

(結論)

本研究により、(1) PICT-1 がイノシトールリン脂質を介した細胞増殖シグナル抑制に関与する因子であり、(2) PICT-1 発現抑制が悪性形質転換を誘導すること、(3) ヒト神経芽腫において PICT-1 および PTEN タンパク質の発現量の間に正の相関があること、が明らかになった。これらは PICT-1 が腫瘍の責任因子の一つである可能性を示唆する。さらに、抗癌剤を含むある種のストレス環境下において、細胞内の PICT-1 が (4) ダイナミックな局在変化を受け、(5) ユビキチン非依存的なプロテアソーム系の分解を受けること、さらに (6) この分解を PTEN の過剰発現で緩和できること、が明らかになった。これらの結果は、PICT-1 の制御メカニズムの解明上重要な知見と考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、申請者が所属する研究室において同定された新たな腫瘍抑制遺伝子産物である PICT-1 の意義を、洗練された細胞生物学・分子生物学的手法を駆使して追求した、きわめて独創性が高い研究である。解決すべき課題をしっかりと意識して個々の実験がデザインされ、その結果も深く考察されている。実験量も豊富である。

学位論文は、十分な背景を含め、読みやすく書かれている。図が非常にわかりやすく提示されていることも特筆すべきであり、優れた学位論文とすることができる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。