

氏 名	伊藤 佐知子		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8270 号		
学位授与年月	平成 29 年 3 月 24 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	p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis (p62 は UVB 刺激によるアポトーシスの内因性シグナル伝達を調節する)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副 査	筑波大学准教授	博士（医学）	古川 宏
副 査	筑波大学准教授	博士（医学）	鈴木 英雄
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	大坂 佳子

論文の内容の要旨

伊藤佐知子氏の博士学位論文は、発がんとの関わりが報告されているものの未だその機能的意義が十分に明らかにされていない p62 が、紫外線 B 波 (UVB) 暴露によって誘導されるアポトーシスを正に制御することで、特に皮膚癌発症を抑制する可能性を示唆したものである。その要旨は以下の通りである。

(背景と目的)

紫外線 B 波 (UVB) 照射は、日焼けや皮膚癌の発症の主因として知られる。UVB 暴露による DNA 損傷は、表皮細胞の細胞周期を停止する一方、ゲノム異常を誘発する。表皮細胞が過剰な紫外線暴露によって回復不能な損傷を受けると、アポトーシスによってその損傷が排除され悪性形質転換が回避されるため、アポトーシスは UVB によって誘発される皮膚癌の発生予防に重要である。UVB 刺激によるアポトーシスのうち、内因性アポトーシス経路は Bcl-2 ファミリータンパク質によって抑制されており、Bcl-2 は皮膚癌の発症促進に関与することが知られている。

一方、p62 は酸化ストレスタンパク質として同定されたが、その後オートファジーに関連する多機能タンパク質としての機能も明らかにされつつある。特に、LC3 と結合してオートファゴソームを形成することがよく知られている。他方、近年、p62 の蓄積が発がんを促進すると報告されている。具体的には、肺腺癌や肝細胞癌では機能解析により腫瘍促進性の作用が示され、皮膚扁平上皮癌や悪性黒色腫で p62 の過剰発現が見られたという報告がある。

しかし、p62 が表皮細胞で腫瘍発生に実際に寄与するかについては、なお不明である。p62 ノックアウトマウスは過食により肥満を呈するが、その機序として中枢神経系細胞における STAT3 のシ

グナル亢進が寄与すると報告されている。また、p62 欠損マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) は、増殖能が亢進している。

以上の背景に基づいて、著者は、p62 遺伝子欠失細胞を用いて UVB 刺激後の内因性アポトーシスシグナルを解析することにより、UVB 暴露による皮膚癌発症に対して p62 がいかなる役割を果たすかを検討している。

(対象と方法)

著者は、野生型マウス (p62 (+/+)) 及び p62 ノックアウトマウス (p62 (-/-)) の MEF に対して、300、600 mJ/cm² で UVB を照射後、Annexin V および PI 染色によるフローサイトメトリーでアポトーシス割合の定量を試みている。さらに、p62 (+/+) 及び siRNA を用いたノックダウン HaCAT 細胞でも同様の方法でアポトーシス割合を定量している。

次に UVB 照射後の p62 (+/+) 及び p62 (-/-) MEF での Bcl-2、Bcl-xL、Bax の発現を、ウェスタンブロット法で調べている。さらに UVB 照射前の p62 (+/+) 及び p62 (-/-) MEF の Bcl-2、Bcl-xL、Bax、さらに、ATM、PUMA、NOXA、Survivin の mRNA 発現を RT-PCR 法で定量している。

一方、先行研究において p62 (-/-) マウスで STAT3 のシグナルの異常が報告されていることから、p62 (+/+) 及び p62 (-/-) MEF に UVB 照射後、Src および STAT3 のリン酸化をウェスタンブロット法で解析している。また Src キナーゼの阻害剤である PP2 を添加後の p62 (+/+) 及び p62 (-/-) MEF の STAT3 リン酸化およびアポトーシスを検討している。

(結果)

著者はまず、UVB 照射後のアポトーシス割合が、p62 (-/-) MEF で有意に減少することを観察している。また表皮細胞である HaCAT 細胞において siRNA を用いて p62 をノックダウンし、同様に UVB 照射後のアポトーシス割合が減少することも確認している。

次に著者は、UVB 照射後の p62 (+/+) 及び p62 (-/-) MEF で Bcl-2 および Bax の発現量を検討し、p62 (-/-) MEF で有意に Bcl-2 の発現量が増加する一方、Bax の発現量は有意に減少することを明らかにしている。そこで著者は、照射前の Bcl-2 および Bcl-xL の発現量を RT-PCR で定量し、p62 (-/-) MEF では照射前の状態ですでに Bcl-2 および Bcl-xL とともに p62 (+/+) MEF より増加していることを明らかにしている。

著者はさらに、p62 (-/-) MEF では、p62 (+/+) MEF と比較し、定常状態で Src、STAT3 のリン酸化反応が増大していることを見出している。また PP2 投与によって、UVB 照射後の p62 (+/+) 及び p62 (-/-) MEF のアポトーシスが回復することを確認している。

(考察)

著者による本研究によって、MEF においては p62 欠損によりアポトーシス抵抗性が増大することが明らかになった。HaCAT 細胞でも同様の結果が得られていることから、この現象は p62 の欠損によるものであることが支持される。このことは、UVB 刺激によるアポトーシスシグナル伝達を p62 が正に制御することを示唆している。

p62 (-/-) MEF においては Src 及び STAT3 のリン酸化が亢進しており、またこれらのリン酸化阻害によりアポトーシスが回復することから、p62 が Src の上流で何らかの形で作用して STAT3 のリン酸化を抑制することにより Bcl-2 ファミリータンパク質に対して抑制的に作用し、結果的にアポト

ーシスを促進していることが示唆された、と言える。

著者は、UVB 刺激によるアポトーシスを p62 が促進する機序については、今回示した機序以外にも存在している可能性があり、さらなる検討が必要である、と考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、多機能タンパク質である p62 が、UVB 暴露後に生ずるアポトーシス反応に促進的に働く可能性を p62 ノックアウト細胞を用いて示した。また、その機序として、STAT3 および Src のリン酸化を抑制することにより BCL2 ファミリータンパク質の発現を抑制する、という可能性をも示した。本研究は、p62 が生理的に皮膚癌発症を抑制する機能を果たしている可能性を示したもので、将来的に皮膚癌の発症予防法開発にも寄与するものである。

平成 29 年 1 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。