

氏名(本籍)	ルマニ シング (インド)			
学位の種類	博士(環境学)			
学位記番号	博甲第6542号			
学位授与年月日	平成25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	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Mechanism of Regulation of Cellular Senescence and Cancer Cell Growth by CARF (CARFタンパク質による細胞老化とがん細胞の増殖制御機構)			
主査	筑波大学教授	薬学博士	熊谷 嘉人	
副査	筑波大学准教授	博士(工学)	野村 暢彦	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	小池 英子	
副査	筑波大学助教	博士(医学)	新開 泰弘	

論文の内容の要旨

(目的)

Collaborator of ARF (CARF) タンパク質は、酵母ツーハイブリッドスクリーニングで ADP Ribosylation Factors (ARF) のパートナーとして同定された。ARF は、細胞の増殖、老化およびアポトーシスを調節する因子であるが、主に p53 を介したシグナル伝達系の調節に関与している。CARF をノックダウンすることによって細胞のアポトーシスが引き起こされる一方、CARF の過剰発現はヒト癌細胞の増殖停止と正常細胞の早期老化を誘導する事が最近報告された。そこで本研究では、細胞において CARF が制御するアポトーシスや増殖停止の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(方法)

細胞：ヒト大腸癌細胞 HCT116、不死化ヒト繊維芽細胞 FT/pEBS7 および FT/pEBS7-YZ5、ヒト骨肉腫細胞 U2OS、正常ヒト繊維芽細胞 TIG-1 を用いた。mRNA の定量：RT-PCR 法にて行った。タンパク質の発現：ウェスタンブロットおよび免疫染色を用いた。遺伝子導入：リポフェクション法を用いた。アポトーシスの検出：TUNEL 染色を用いた。細胞生存率：トリパンブルーを用いて死細胞をカウントした。細胞周期の分析：フローサイトメーターにて決定した。

(結果)

siRNA の導入による CARF の発現抑制により、細胞の生存やアポトーシスに重要な役割を果たす Ras-MAPK、Retinoblastoma、ATM-ATR らのシグナル伝達経路すべてに変動が見られた。また、CARF の発現抑制により DNA 損傷応答経路が活性化され、ATM-CHK1 経路を介してアポトーシスが生じることが明らかとなった。このことから、CARF はゲノム防御機構およびがん抑制機構において重要な役割を担っていることが示された。

また、正常ヒト繊維芽細胞の細胞老化の過程において、CARF の発現誘導が観察されることを明らかにした。これと一致して、アドリアマイシンやニコダゾール等の化学物質の曝露によって引き起こされる細胞老化の惹起によっても、CARF が発現誘導されることを明らかにした。このとき、p53、p21 および H2AX などの

細胞周期に関わる因子の発現も亢進していた。また、テロメア結合タンパク質である Telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2) の発現抑制によって惹起される細胞老化状態においても、CARF は p53、p21 および H2AX の発現増加に伴って誘導されていた。

(考察)

本研究により、CARF が細胞内における多機能な調節因子であることが示された。まず、CARF は細胞の成長阻害やアポトーシスを決定する際に重要な役割を担っている因子であることが示唆された。CARF の発現抑制は ATM-CHK1 経路の活性化を介してアポトーシスを惹起することから、CARF siRNA は効果的な新しいがん治療薬として応用できるかもしれない。

また、細胞老化の過程において、p53 や p21 の活性化に伴い CARF が発現誘導されていることを明らかにした。このことは、CARF が細胞老化状態の新規バイオマーカーになり得ることを示唆している。したがって、CARF の発現は細胞老化を惹起する抗がん剤のスクリーニングを行う際に有用かもしれない。

審 査 の 結 果 の 要 旨

Arf は低分子量 G 蛋白質スーパーファミリーのサブファミリーの一つであり、細胞の増殖、老化、アポトーシス、細胞内小胞輸送などの現象において重要な役割を果たしていることが知られている。Rumani SINGH 氏は、この ARF タンパク質のパートナーとして同定された CARF タンパク質の機能解析を行い、CARF が細胞の増殖や老化、アポトーシス等の調節において重要な役割を担っていることを本論文にてはじめて明らかにした。すなわち、CARF の発現抑制により DNA 損傷応答経路が活性化され、ATM-CHK1 経路を介してアポトーシスが生じる一方、CARF の発現誘導は細胞老化の過程において観察される現象であることを証明した。本研究は、癌細胞における新しい分子標的としての CARF の可能性、および細胞老化状態の新規バイオマーカーとしての CARF の有用性を提示しており、更なる応用研究への展開に繋がる重要な知見であると言える。得られた成果は当該分野の学術雑誌にも掲載されており、高く評価できる。

平成 25 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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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