

氏名（本籍）	沖田 結花里（愛媛県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7016 号
学位授与年月	平成 26 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	がんの発生・進展における転写因子 MafK の役割

主査	筑波大学教授	薬学博士	金保 安則
副査	筑波大学教授	医学博士	久武 幸司
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	宮崎 淳
副査	筑波大学准教授	医学博士	内田 和彦

論文の内容の要旨

(目的)

沖田結花里氏は、がんの発生母地である前がん病変部で発現が亢進している TGF- β に着目し、TGF- β が、化学発がん物質などの生体異物の代謝に中心的な役割を果たす転写因子 Nrf2 の活性に与える影響について明らかにすることを目的に研究を開始した。この研究の過程で小 Maf 群転写因子である MafK が腫瘍形成能、転移促進能を有することを発見し、その分子メカニズムを明らかにすることを次の目的とした。最後に、乳がんにおける腫瘍形成、浸潤、転移に関わる新規メカニズムの解析を行った。

(対象と方法)

TGF- β が Nrf2 活性に与える影響について、マウス乳腺上皮 NMuMG 細胞を用いて検討した。NMuMG 細胞を親電子性試薬である tBHQ で処理すると、Nrf2 標的遺伝子の発現が誘導された。一方、TGF- β 存在下ではその発現誘導が抑制されることを見出し、その抑制メカニズムについて、RT-PCR、ウェスタンブロット法、ルシフェラーゼアッセイ、クロマチン免疫沈降法、RNAi による遺伝子ノックダウン法を用いて検討した。さらに、マウスを用いた細胞移植実験を行い、乳がん細胞の腫瘍形成とその浸潤・転移能について、また浸潤・転移に関わる上皮間葉転換 (EMT) の誘導について、上記の方法およびトランスウェルアッセイ、マトリゲル浸潤アッセイ、DNA マイクロアレイ解析などの手法を用いて解析した。

(結果)

マウス乳腺上皮 NMuMG 細胞株において、TGF- β が Nrf2 の二量体パートナーである小 Maf 群転

写因子のうち MafK の発現を誘導し、その結果、Nrf2 と小 Maf 群転写因子の量的バランスを崩し、Nrf2 標的遺伝子である HO-1 の転写を抑制することを見出した。また、MafK は乳がん細胞において発現が亢進しており、さらに MafK を発現している乳がん患者においては予後不良であることが示唆されたため、乳がんに関与する MafK の役割についての解析へと進めた。その結果、マウス乳がん 4T1 細胞株では MafK の発現が抑制されると、腫瘍形成や肺転移も抑制されることが明らかになった。一方で、MafK の発現が認められない NMuMG 細胞株に MafK を強制発現させると、細胞株は形質転換してマウスで腫瘍形成することを見出している。さらに、NMuMG-MafK 発現細胞由来の腫瘍では、顕著な浸潤像を認めていた。そこで、浸潤、転移に関係する EMT について NMuMG-MafK 発現細胞を用いて検討した。MafK を強制発現させると、上皮マーカーである E-cadherin、Occludin の発現が低下し、間葉系マーカーである N-cadherin、Fibronectin の発現は亢進することを見出している。さらにトランスウェルを用いた実験により、細胞の運動、浸潤能が亢進していることを明らかにしており、MafK は新規 EMT 誘導因子であることを示している。次に MafK がどのように腫瘍形成、EMT 誘導を引き起こすのかについて検討するために、MafK によって発現が変動する遺伝子の網羅的解析を行い、MafK によって発現が誘導される膜タンパク質 Gpnmb に着目し研究を進めた。その結果、NMuMG-MafK 強制発現細胞において Gpnmb の発現をノックダウンすると、MafK によって誘導された Sphere 形成および細胞の運動、浸潤が抑制されることを明らかにした。また、NMuMG-Gpnmb 強制発現細胞でも MafK 発現細胞と同様に、腫瘍形成および EMT 誘導を認めた。さらに Gpnmb によって誘導される Sphere 形成、E-cadherin 抑制には Gpnmb の 529 番目のチロシンが重要であることを明らかにしている。

(考察)

前がん病変部で発現が亢進している TGF- β が Nrf2 とその二量体化パートナーである MafK との量的バランスを崩すことで、抗酸化タンパク質である HO-1 の転写を抑制することを見出している。この知見より、TGF- β による HO-1 抑制を解除することができれば、活性酸素などによる組織傷害を軽減し、がん発生の抑制に役立つと考えられるが、前がん病変部における TGF- β 、HO-1 の役割については不明な点が多く、今後のさらなる検討が必要である。

TGF- β によって発現が誘導される MafK は乳がん細胞株において恒常的発現が認められ、予後との関連も示唆された。実際に MafK の発現を乳がん細胞株で抑制することにより、腫瘍形成および転移を抑制することを見出した。一方、MafK の発現によって、非腫瘍性の乳腺上皮細胞に腫瘍形成能を獲得させ、さらに上皮間葉転換 (EMT) を誘導することを明らかにした。さらに MafK によって発現が誘導される膜タンパク質 Gpnmb を同定し、Gpnmb が MafK による Sphere 形成や EMT 誘導に関与することを示した。Gpnmb も非腫瘍性の乳腺上皮細胞を形質転換させる能力を有していたが、それには 529 番目のチロシンが重要であることを明らかにした。MafK による腫瘍形成、EMT 誘導には Gpnmb が関与していることが示唆されたが、MafK がどのように Gpnmb の発現を制御しているのか、また Gpnmb がどのようなシグナルを介して腫瘍形成、EMT を制御しているのかについては、今後の検討課題である。

審査の結果の要旨

(批評)

TGF- β による Nrf2 活性制御についての報告はほとんどなく、前がん病変部で発現が亢進している TGF- β が発がんのイニシエーションに関わる可能性について言及した独創性の高い研究である。また、その研究過程で MafK の恒常発現による細胞形態変化に着目した点が興味深く、MafK の新規機能として、EMT 誘導および腫瘍形成促進制御を発見し、研究を大きく発展させた点が評価できる。今後さらに MafK-Gpmb 経路による乳がん発生、進展機序を明らかにすることで、新規治療法の開発につながるものと期待できる。

平成 25 年 12 月 25 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。