

## 論文概要

【目的】1981年以降、日本人の死因第一位はがんであり、その罹患率、死亡率は漸増傾向にある。がんの発生、進展について理解し、治療法、予防法を確立することは、医学において世界共通の最も大きな研究課題の一つである。本研究では、がんの発生母地である前がん病変部からがんの進行過程を通じて発現が亢進している TGF- $\beta$  に着目し、化学発がん物質等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（第二章）。さらにこの研究の過程で小 Maf 群転写因子である MafK の腫瘍形成能、転移促進能を見出し、乳がんの腫瘍形成、浸潤、転移に関わる新規メカニズムの解析を目的に研究を進めた。（第三章、第四章）。

【対象・方法】第二章では、TGF- $\beta$  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 細胞に親電子性試薬である tBHQ を処理すると Nrf2 標的遺伝子の発現が誘導される。しかし TGF- $\beta$  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などを用いて検討した。さらに第三章、第四章では、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・転移能について検討した。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に加えて、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を行い検討した。

【結果】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- $\beta$  に着目し、化学発がん物質等の解毒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検討した。その結果マウス乳腺上皮 NMuMG 細胞において、TGF- $\beta$  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 の発現を誘導することにより、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（第二章）。さらに MafK は乳がん細胞において発現が亢進しており、MafK を発現する乳がんは予後不良であることが示唆された。そこで乳がんに関心を当て、腫瘍形成、浸潤、転移に関わる MafK の役割について解析を行った。マウス乳がん 4T1 細胞で MafK の発現を抑制すると、腫瘍形成、肺転移が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 細胞に MafK を発現させることで、細胞は形質転換しマウスで腫瘍を形成するようになった。さらに NMuMG-MafK 発現細胞由来の腫瘍では、顕著な浸潤像が認められた。そこで浸潤、転移に係る上皮間葉転換 (EMT) について NMuMG-MafK 発現細胞を用いて検討した。MafK 発現細胞では、E-cadherin、Occludin 等の上皮マーカーの発現低下、N-cadherin、Fibronectin 等の間葉系マーカーの発現亢進が認められた。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が明らかになり、MafK は新規 EMT 誘導因子であることが示された (第三章)。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。NMuMG-MafK 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が明らかになった。また、NMuMG-Gpnmb 発現細胞でも MafK 発現細胞と同様に、腫瘍形成および EMT 誘導が認められた。また 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が示された (第四章)。

【考察】 前がん病変部で発現が亢進している TGF- $\beta$  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た。TGF- $\beta$  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- $\beta$ 、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- $\beta$  によって発現が誘導される MafK は乳がん細胞において恒常的発現が認められ、予後との関連も示された。実際に MafK の発現を乳がん細胞で抑制することにより、腫瘍形成、転移を抑制することを見出した。反対に 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 を新規同定し、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が明らかになった。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。また Gpnmb は最も悪性度の高い Triple negative 型乳がんにおいて発現が亢進していることが報告されており、乳がんの組織型と MafK の発現、予後との関連についても今後検討する必要がある。Triple negative 型乳がんは、ホルモン受容体や HER2 が陰性であり、現在有望な分子標的治療薬が存在しない。今後 MafK-Gpnmb 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。

【結論】 TGF- $\beta$  は前がん病変部において、HO-1 の発現を抑制することにより、発がんが起りやすい環境をつくりだしている可能性が示された。また TGF- $\beta$  によって発現誘導される MafK は、EMT を誘導して乳がんの発生や進展に関与することが明らかになった。これには MafK によって誘導される Gpnmb が重要であることが示された。