

氏名（本籍）	VO NGUYEN THANH THAO
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7429 号
学位授与年月	平成 27 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	Tumorigenic function of TMEPAI in cancer (腫瘍における TMEPAI の機能解析)

主査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之
副査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 幸夫
副査	筑波大学講師	博士（理学）	小林 麻己人
副査	筑波大学助教	博士（薬学）	船越 祐司

論文の内容の要旨

(目的)

TMEPAI は TGF- β /Smad シグナルにおける直接的な標的遺伝子であり、TGF- β /Smad シグナルの持続や強度をネガティブフィードバックにすることによってコントロールしている。本研究では腫瘍細胞での TMEPAI の発現亢進の機構を検討し、TGF- β と EGF シグナルの共同作用について解析した。さらに、肺癌腫瘍細胞株における TMEPAI の腫瘍形成能についても検討を加えた。

(対象と方法)

タンパクの発現やリン酸化、あるいはタンパク間の相互作用の解析には RT-PCR, western blotting, 免疫沈降(IP)、あるいはクロマチン免疫沈降(ChIP)を用いた。標的遺伝子の転写能の解析にはルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた。肺癌細胞株における TMEPAI の発現遮断にはヘアピン RNA を使い、これらの細胞の増腫瘍能の解析には sphere 形成アッセイを用いた。さらに in vivo の腫瘍形成能の解析には皮下移植あるいは尾静脈からの移入法を用いた。

(結果)

肺癌細胞株である Calu-3, NCI-H23, RERF-LC-KJ は TMEPAI を恒常的に発現しており、この発現は TGF- β 受容体キナーゼの阻害薬である SB208 で有意に抑制された。この結果は腫瘍細胞における TMEPAI の恒常的な発現は腫瘍細胞の発現する TGF- β 刺激に依存していることを示している。さらに腫瘍細胞における TMEPAI の発現は MEK 阻害剤である U026 によっても有意に抑制された。TGF- β と EGF シグナルは共同して TMEPAI の転写を促進した。このことは EGFR/Ras/MAPK 経路も腫瘍細

胞における TMEPAI の制御に関与していることを示している。TMEPAI 遺伝子の第一イントロンには ELK-1 結合部位がある。EGF は正常 ELK-1 を活性化し、TGF- β が促進する TMEPAI 遺伝子の転写を増強したが、リン酸化部位を欠失した ELK-1S383A 変異体は活性化しなかった。さらに、EGF シグナルに反応して ELK-1 は TMEPAI 遺伝子の第 1 イントロンに結合していることが ChIP によって明らかになった。

Calu-3 細胞の発現する TMEPAI を抑制すると Smad2 のリン酸化が促進され、TGF- β 存在下の細胞増殖が有意に抑制される。さらに、Calu-3 細胞や NCI-H23 細胞の TMEPAI を抑制すると *in vitro* における sphere 形成能も NOD-SCID マウスにおける皮下腫瘍形成能も抑制された。これらの結果は TMEPAI が肺癌細胞株の腫瘍形成能を促進していること示している。

さらに TMEPAI 発現を抑制した肺癌細胞株では AktSer473 のリン酸化が抑制され、これらの TMEPAI 抑制細胞では Akt フォスファターゼ PHLPP1 の活性が亢進していた。

(考察)

癌細胞にはしばしば EGF/Ras/MAPK シグナルや TGF- β シグナルが異常に亢進している。この 2 つのシグナルの異常は癌の増悪に関与していることが報告されている。この研究で EGF/Ras/MEK と TGF- β シグナルが共同して TMEPAI の発現を制御していることが示された。一方で、肺癌細胞株において TMEPAI の発現を抑制すると TGF- β によって誘導される Smad のリン酸化や TGF- β による増殖の抑制が促進される。結果的に、sphere 形成や皮下腫瘍の形成、あるいは肺への転移が抑制される。さらに TMEPAI 抑制肺癌細胞株では AktSer473 のリン酸化が抑制される。これらの細胞では Akt フォスファターゼ PHLPP1 の産生が亢進する。これらの結果は Smad の制御機能とは独立した TMEPAI の新しい機能の可能性を示し、TMEPAI が増腫瘍能機能に寄与していることが考えられる。

この研究において TMEPAI の発現は TGF- β /Smad と EGF/Ras/MARK シグナルによって促進されることを示した。TMEPAI は肺癌細胞株において増腫瘍能を持っており、これは TGF- β /Smad シグナルの抑制、AKT シグナルの活性化によってなされると考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文は特に肺癌の増腫瘍能における TMEPAI 遺伝子の関与を TGF- β シグナルばかりでなく EGF シグナルとの共同作用によって増強されることを示した初めての研究である。TMEPAI 遺伝子の活性化が真に癌遺伝子としての機能を有しているか、高発現系を用いたさらなる研究が期待されるが、新しい発癌機構を提唱した点において評価される論文であると評価される。

平成 26 年 12 月 19 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。