

氏名(本籍)	高 蔭 (中国)
学位の種類	博士(環境学)
学位記番号	博甲第6153号
学位授与年月日	平成24年3月23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	<b>Regulation of Cancer through Mortalin- and p53-related Signaling Pathways</b> (モータリンと p53 が関連するシグナル伝達系を介するガンの制御)
主査	筑波大学教授 理学博士 石井哲郎
副査	筑波大学教授 理学博士 野本信也
副査	筑波大学教授 博士(医学) 土屋尚之
副査	筑波大学講師 博士(農学) 藤栄治
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)

ガン細胞の持つ正常細胞とは異なる特性の研究はガンの治療に結びつく可能性がある。本研究では、ガン細胞で特徴的な発現様式が変化する熱ショックタンパク質 HSP70 ファミリーのモータリンと細胞死に関連した p53 タンパク質に注目し、ヒト細胞ガン化に伴うモータリンの細胞内局在の変化、p53 の不活性化などに関連する新規因子を3つのアプローチでスクリーニングし、それらの機能を解析することを目的とした。

### (対象と方法)

1. モータリンと類似の機能を持つショウジョウバエ由来の HSP22 熱ショックタンパク質を細胞内に発現させ、p53 への影響を調べた。2. ヒトの正常及び不死化細胞の遺伝子発現の違いを示す遺伝子産物を miRNA-microarray で解析した。3. モータリンの細胞内局在変化をレポーターとしてガン抑制性 siRNAs を検索した。

### (結果)

1. ヒト正常細胞にショウジョウバエ由来の小さな熱ショックタンパク質 (dHSP22) を発現させ、細胞特性の変化を調べた。dHSP22 は mtHSP70/mortalin と同様に、p53 を不活性化させ、正常細胞の寿命を延長し、ガン細胞の悪性を低減した。2. ヒト細胞内 p53 の発現調節に関与する miRNAs を検索するため、正常と不死化ヒト細胞の miRNA array 解析を行った。miR-296 は不死化細胞に高発現し、テロメラーゼ活性を正に調節し、p53 機能を抑制することを見いだした。p53 または p21<sup>WAF1</sup> の非翻訳領域を導入したルシフェラーゼリポータープラスミドを作成して、miR-296 を細胞に過剰発現した。その結果、miR-296 がガン細胞において、p53-p21<sup>WAF1</sup> の発現を減少させ、p53 の発現を減少させる可能性を示した。3. ガン細胞に老化誘導を行うと、モータリンの細胞内局在が核周囲から細胞質に変化する。そこで、このモータリン細胞内局在変化を指標とし、そのような作用を持つ shRNAs のスクリーニングを4回繰り返し実施した。その結果、768種類のヒト shRNAs から効果に再現性のある5種類の shRNA を選別した。shRNA についてバイオインフォマティクス

とパスウェイ解析を行い、いずれも DNA 障害シグナル伝達系に関連していることを確認した。

#### (考察)

本研究は、モータリンの細胞内局在の変化と p53 の発現調節の変化を指標として新しいが異なるアプローチを行い、ガン細胞の特性を抑制し正常細胞の特性を持たせる手技について興味ある結果を得た。マイクロ RNAs (miRNAs) はタンパク質をコードしない小分子 RNA であり、mRNA と相互作用してその機能を抑制する。本研究は二つの miRNA、miR-296 と miR-298 が多くのガン細胞において増幅されており、ガン細胞の特性発現に関わっていると思われる。ショウジョウバエ HSP22 はモータリンと同様ガン抑制因子である p53 に結合し、核への移行を阻害すると思われる。本研究で、DNA 障害のシグナル伝達を亢進し、ガン抑制遺伝子 p16<sup>INK4A</sup> の誘導を引き起こす 5 種類の shRNA を分離したが、これらの遺伝子はガン治療のターゲットになりうることを示唆した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、モータリンと p53 を中心として異なる手法を用いてガン細胞と正常細胞の特性の違いを明らかにし、今後のガン治療研究への発展が楽しみな興味深い実験成果を得ており、研究成果の一部は、国際誌に発表し高い評価を得ている。miR-296 が p21-3' UTR と相互作用することにより p53-p21<sup>WAF1</sup> シグナルを抑制していることを示唆した成果は評価できる。miR-296 の作用を抑制するアンタゴニスト AmiR-296 の活用は有用である。また、これとは異なるアプローチで、合成した small/short hairpin RNA (shRNA) を細胞に導入して、特定の RNA の働きを抑制し、ガン細胞で亢進している遺伝子の発現を抑制する方法も興味深い手法である。これらの研究成果は、ガン細胞の特性を遺伝子操作で正常細胞に近づけることができることを示しており、より実効性のある臨床応用可能な手技の開発に結びつく可能性がある。

平成 24 年 1 月 16 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。