

氏名 (生年月日) 谷口 恵香 (1991年11月6日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第188号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 発現抑制によるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現上昇を介したがん細胞増殖抑制機構の解明

論文審査委員 (主査) 准教授 中田 晋
(副査) 教授 中田 徹男
(副査) 教授 田中 智之

論文内容の要旨

序章

γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) は膀胱がん組織のプロテオーム解析によって見出されたがん組織に高発現するタンパク質である。GGCTは膀胱がんをはじめとして、乳がん、肺がん、子宮頸がん、大腸がん等の様々ながん種において高発現がみられ、乳がんや卵巣がん等においては腫瘍組織における高い GGCT タンパク質発現レベルは予後不良因子であることが報告されている。一方、siRNA を用いた GGCT のノックダウンおよび特異的阻害剤による酵素活性の阻害は、*in vitro* および担がんマウスを用いた *in vivo* の実験系において腫瘍増殖抑制効果を発揮することが報告されている。さらに、乳がん細胞株を用いた以前の研究で、GGCT ノックダウンによって引き起こされるがん細胞増殖抑制の誘導は、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) の発現上昇に依存することが示された。しかしながら、GGCT ノックダウンによる CDKI の発現上昇機構の詳細は未だ不明のままであった。

本研究では、GGCT の新規相互作用タンパク質として prohibitin 2 (PHB2) を見出し、乳がん細胞株 MCF7 において GGCT は PHB2 を介して p21^{WAF1/CIP1} (p21) の発現を調節していることを明らかにした。また、MCF7 細胞および前立腺がん細胞株 PC3 において GGCT をノックダウンした場合に誘導される CDKI の発現上昇および細胞増殖抑制効果は、オートファジーの誘導を伴うことを示した。さらに、GGCT ノックダウンは PC3 細胞および神経膠芽腫細胞株 A172 において腫瘍抑制転写因子 FOXO3a の発現上昇および AMPK を介したリン酸化による活性化を引き起こし、p21 の発現上昇をその上流で制御することを示した。

第1章 GGCT と結合する新規相互作用タンパク質 PHB2 の機能解析

本章ではまず、酵母ツーハイブリッド法を用いた網羅的解析により、GGCT と相互作用する新規のタンパク質分子として PHB2 を見出した。続いて MCF7 細胞において共免疫沈降法を行い、内因性 GGCT と PHB2 タンパク質間の相互作用を示した。PHB2 は細胞内局在に依存してそれぞれ異なる機能を発揮するタンパク質であり、核に局在する PHB2 は転写抑制因子として働くことが報告されている。そこで、PHB2 の細胞内局在をウェスタンブロット法で解析したところ、GGCT ノックダウンに

より核内局在 PHB2 が減少することを明らかにした。さらに、PHB2 をノックダウンおよび強制発現させた MCF7 細胞を用い p21 発現解析および細胞周期解析を行ったところ、GGCT ノックダウン時の p21 の発現上昇が PHB2 によって制御されていることを証明した。また、抗 PHB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合することを明らかにした。さらに、PHB2 と p21 の単独または同時ノックダウンを行い、PHB2 が p21 発現抑制を介しがん細胞の増殖を促進する因子であることを明らかにした。

第2章 GGCT ノックダウンによるオートファジーの誘導を介して CDKI の発現が上昇する機構

GGCT のノックダウンは非アポトーシス性細胞死を引き起こすことが以前の研究により示されている。また、GGCT はアミノ酸の代謝に関わる酵素であるため、そのノックダウンは細胞に代謝性ストレスを引き起こすのではないかと考えられた。そこで、GGCT のノックダウンがオートファジー関連細胞死を引き起こすという仮説を立てた。本章では、オートファジーマーカー LC3-II の検出、オートファゴソーム形成能の評価を行い、MCF7 細胞および PC3 細胞における GGCT のノックダウンが、オートファジーを誘導することを明らかにした。また、血清欠乏培養条件下でマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 にオートファジーが誘導される系を用い、安定的 GGCT 強制発現がオートファジーを抑制し、細胞増殖を促進することを明らかにした。さらに、オートファジー進行に必須の因子 autophagy related 5 を GGCT と同時にノックダウンすることによってオートファジーを阻害すると、細胞周期停止および細胞老化といった GGCT ノックダウン細胞で観察される表現型が抑制されたことから、オートファジー自体が制御性の役割を果たしていることを示した。最後に、このオートファジーの誘導に AMPK シグナル伝達系および mTOR シグナル伝達系の変動が伴っていることを明らかにした。

第3章 GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a-p21 経路の活性化を介したがん細胞増殖抑制機構

前章において、MCF7 細胞および PC3 細胞のいずれにおいても GGCT ノックダウンによる p21 の発現上昇が観察されたが、MCF7 細胞ではオートファジーの阻害によって p21 発現上昇が抑制されたにもかかわらず、PC3 細胞では抑制されなかった。さらに PC3 細胞においても PHB2 の単独ノックダウンを行ったが、p21 は誘導されなかったため、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇には未知の機構が存在すると考えられた。本章では、PC3 細胞と A172 細胞において、GGCT ノックダウンが FOXO3a の発現誘導を引き起こすことを示した。また、FOXO3a の発現誘導は GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇とそれに続く細胞増殖抑制、細胞死誘導を制御することを示した。さらに、FOXO3a をリン酸化する AMPK が、FOXO3a-p21 経路の活性化をその上流で制御することを明らかにした。

総括

本研究では、GGCT ノックダウンによって引き起こされる CDKI 発現上昇のメカニズムとして、次の三つの機構を提示した。1. GGCT との新規相互作用タンパク質であり、p21 発現抑制機能を持つ PHB2 を介した調節。2. AMPK-ULK1 経路または mTOR 経路の変動を伴うオートファジーの誘導を介した調節。3. 腫瘍抑制転写因子 FOXO3a の発現誘導および AMPK を介した活性化による p21 発現上昇。これらの結果は、GGCT ノックダウンによる CDKI 発現上昇およびがん細胞増殖抑制の細胞種依存的なメカニズムの一端を明らかにし、今後の GGCT を標的とした治療薬の開発に寄与するものと考えられる。

審査の結果の要旨

《緒言》

正常組織と比較して様々ながん組織に高発現する GGCT の発現を抑制すると、*in vitro* および担癌マウスモデルにおいて腫瘍の成長が阻害されるため、GGCT は有望ながんの治療標的であると考えられている。以前の研究で、GGCT の発現抑制がサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) の発現上昇を介してがん細胞の増殖を抑制し細胞老化を誘導することを報告したが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、GGCT の発現抑制が CDKI の発現を上昇させ、がん細胞増殖抑制を引き起こすメカニズムについて、以下の3つの新規機構を明らかにした。

《審査結果の要旨》

(1) GGCT と結合する新規相互作用タンパク質 PHB2 の機能解析

GGCT と結合する新規タンパク質 PHB2 を酵母ツーハイブリッド法によって見出し、乳がん細胞株 MCF7 において内因性 GGCT と PHB2 が相互作用することを確認した。また、GGCT は PHB2 の核内局在を促進的に制御することを明らかにした。さらに、GGCT ノックダウン時の p21 の発現上昇が PHB2 に依存することを示し、クロマチン免疫沈降法により PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合することを明らかにした。すなわち、PHB2 は新規の p21 抑制性転写調節因子であり、がん細胞の無秩序な増殖を促進する因子であることを示した。

(2) GGCT ノックダウンに伴うオートファジーの誘導を介した CDKI の発現上昇機構

GGCT 発現抑制が MCF7 細胞および前立腺がん細胞株 PC3 にオートファジーを引き起こすことを初めて明らかにした。また、血清欠乏条件によりマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 にオートファジーを誘導させる明確なモデルにおいて、GGCT の強制発現がオートファジー誘導を抑制し、細胞増殖を促進することを示した。また、オートファジーに必須の因子 ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすると細胞増殖抑制が回復したことから、GGCT 発現抑制による増殖抑制はオートファジーによって促進的に制御されることを示した。さらに、このオートファジーの誘導は AMPK-ULK1 シグナル伝達経路に依存すること、mTOR シグナル伝達経路の抑制が伴うことを明らかにした。

(3) GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a-p21 経路の活性化を介したがん細胞増殖抑制機構

前章までの知見で、GGCT ノックダウン PC3 細胞における p21 発現上昇機構は PHB2 およびオートファジーに依存しないことが判明した。そこで本章では、PC3 細胞と膠芽腫細胞株 A172 において、GGCT ノックダウンが腫瘍抑制性転写因子 FOXO3a の発現誘導を引き起こすことを示した。また、FOXO3a の発現誘導は GGCT 発現抑制による p21 発現上昇とそれに続く細胞増殖抑制、細胞死誘導を制御することを示した。さらに、FOXO3a をリン酸化する AMPK が、FOXO3a-p21 経路の活性化をその上流で制御することを明らかにした。

《結論》

本研究により、がん細胞の増殖が GGCT に依存するメカニズムについて、以下の新規機構を解明した。まず、GGCT との新規結合タンパク質 PHB2 を介した p21 転写調節による細胞周期停止機構を明らかにした。次に、AMPK-ULK1 経路活性化と mTOR 経路抑制を伴うオートファジー誘導が細胞周期停止の上流で制御性に寄与することを明らかにした。最後に AMPK を介した FOXO3a の活性増強による p21 発現上昇が、がん細胞の増殖を抑制するうえで重要な役割を果たすことを明らかにした。こ

これらの知見は、今後のGGCTを標的とした新しいがん治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。