

氏名 (生年月日) まつむら けんご (1984年4月23日)
松村 健吾

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博第165号

学位授与の日付 2017年3月18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) 欠乏によるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現上昇に依存したがん細胞老化の誘導

論文審査委員 (主査) 教授 吉貴 達寛

(副査) 教授 中田 徹男

(副査) 教授 中山 祐治

論文内容の要旨

序章

Chromosome 7 open reading frame 24 (C7orf24) は、膀胱癌に高発現する機能不明のタンパク質として2007年に影山らによって見出された。その後、C7orf24はグルタミル回路において γ -グルタミルアミノ酸を5-オキソプロリンに変換する γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 活性をもつことが2008年にOakleyらによって報告された。また、尿路系癌のみならず、乳癌や肺癌や子宮頸癌等の様々な癌種において、正常組織に比べ癌組織でGGCTが高発現していること、腫瘍組織における高いGGCT発現レベルは予後不良因子であることが示されている。一方、GGCTの発現抑制は、*in vitro*において肺癌や前立腺癌や乳癌を含む様々な癌細胞の増殖抑制とそれに引き続く癌細胞死を誘導することが明らかとなっている。また、*in vivo*においてもGGCT-siRNAによる腫瘍縮小効果が報告されている。これらの背景からGGCTは有望ながん治療標的分子であると考えられる。しかしながら、GGCT欠乏による癌細胞の増殖抑制の機序は未だ不明である。そこで本研究では、癌細胞培養系においてGGCTを人為的に欠乏させた場合に発揮される細胞増殖抑制効果に伴う細胞生物学的現象とその分子メカニズムを解析し、細胞老化の誘導が重要な役割を果たすことを明らかにした。

第1章 GGCT欠乏による増殖抑制作用の定量的評価

ヒト乳癌細胞株のMCF7細胞、MDA-MB-231細胞に、GGCTに対するsiRNAをリポフェクション法で導入した。GGCTの発現低下はウエスタンブロッティング法で確認した。細胞増殖をトリパンブルー染色法によって解析した。その結果、GGCT-siRNA導入後4日の時点で細胞播種からの生細胞数の相対値は、コントロール群のそれと比較して低かった (MCF7細胞: control群 2.47 ± 0.34 , GGCT-siRNA群 0.84 ± 0.17 , Student's t-test, $P = 0.01$; MDA-MB-231細胞: control群 5.61 ± 0.40 , GGCT-siRNA群 2.20 ± 0.74 , Student's t-test, $P < 0.01$)。GGCT-siRNA導入後5日以降に細胞死が増加し、7日の時点での死細胞の割合は顕著に増加していた (MCF7細胞: control群 $4.89 \pm 0.8\%$, GGCT-siRNA群 $27.50 \pm 5.3\%$, Student's t-test, $P < 0.01$; MDA-MB-231細胞: control群 $11.03 \pm 1.5\%$, GGCT-siRNA群 $46.79 \pm 4.9\%$, Student's t-test, $P < 0.01$)。MCF7細胞において、カスパーゼの活性化、形態学的な核の断片化、細胞周期解析におけるsub-G1期細胞の増加など、アポトーシス細胞死を示す特徴はいずれも認められなかった。GGCT-siRNA導入後4日以降で生存している細胞は、平坦で大型の細胞に形態が変

化していることが観察された。

第2章 GGCT 欠乏によるがん細胞の細胞老化誘導

GGCT-siRNA 導入後4日以降に観察された細胞形態変化が、細胞老化に特徴的な形態であると考えられたため、細胞老化マーカーである Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) 染色法を用いて細胞老化を評価した。その結果、MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞をはじめとして PC3 細胞、LNCaP 細胞 (前立腺癌)、A172 細胞 (神経膠芽細胞腫)、Hela 細胞 (子宮頸癌)において、SA- β -Gal 染色陽性の細胞の割合は GGCT-siRNA 導入群において増加していた。また、細胞老化誘導因子の発現量をウエスタンブロッティング法で検討した結果、GGCT 発現低下によって、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKI)である、p21^{WAF/CIP1} もしくは p16^{INK4A} 遺伝子産物の発現量が顕著に増加することを見いだした。これらの結果から GGCT の人為的欠乏は種々の癌細胞に細胞老化を誘導することが明らかとなった。

第3章 GGCT 欠乏による CDKI 誘導依存的な細胞老化と細胞死

GGCT 発現低下によって誘導される CDKI は細胞種によって異なっていた。細胞老化の誘導に対する発現誘導された CDKI の寄与を検討するために、GGCT と同時に p21^{WAF/CIP1} もしくは p16^{INK4A} に対する siRNA を導入することにより、GGCT が欠乏しても p21^{WAF/CIP1} もしくは p16^{INK4A} が誘導されなくなった細胞を作成し、細胞老化誘導を評価した。その結果、MCF7 細胞では p21^{WAF/CIP1} の発現を同時に低下させると細胞老化の誘導が抑制されたが、p16^{INK4A} を低下させても抑制されなかった。また、Propidium Iodide (PI) 染色法を用いて細胞周期解析を行ったところ、前述の結果と合致して MCF7 細胞では GGCT 欠乏によって G0/G1 期での細胞周期停止が誘導されたが、p21^{WAF/CIP1} を同時に発現低下させることにより G0/G1 期の細胞集団の増加が顕著に抑制された。トリパンブルー染色法による細胞増殖と細胞死の割合についても検討したところ、p21^{WAF/CIP1}-siRNA 導入細胞では細胞死誘導が抑制され、細胞増殖も回復することが明らかとなった。一方、MDA-MB-231 細胞では p16^{INK4A} に対する siRNA を同時に導入することにより、GGCT 欠乏によって誘導される細胞老化と引き続いて生じる細胞死が抑制され細胞増殖が回復した。以上の実験結果から GGCT 欠乏による細胞老化と引き続く細胞死の誘導を伴う増殖抑制効果は、MCF7 細胞では p21^{WAF/CIP1}、MDA-MB-231 細胞では p16^{INK4A} の発現レベルの増加に依存していることが示唆された。

総括

以上の結果から、癌細胞における GGCT の欠乏は、CDKI の発現量増加による細胞周期の停止が遷延することで細胞老化が誘導され、非アポトーシス細胞死を介して細胞増殖抑制効果を発揮すると考えられた。本研究の成果は、GGCT を治療標的とした抗腫瘍効果の機序の一端を明らかにし、今後の GGCT 標的治療薬の開発に寄与するものと期待される。

審査の結果の要旨

申請者は本学位論文において、現在まで不明であった、 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)の発現を低下させた際にみられる、顕著ながん細胞の増殖抑制のメカニズムを解明するために、がん細胞培養系と RNA 干渉法を中心とした実験手法を用いて分子生物学的解析を行い、以下の成績を得た。

第一章においては、代表的な乳癌細胞株 MCF7 細胞および MDA-MB-231 細胞を用い、GGCT の発

現抑制が顕著な増殖抑制を起こすことを検証した。また、発現抑制7日後に解析した場合、最終的には細胞死の割合が顕著に増加していることと、その細胞死は、PARP切断、カスパーゼ3切断、カスパーゼ8切断、DNA断片化、などのアポトーシス細胞死の特徴はみられないことを明らかにした。

第二章においては、乳癌細胞株に加え、前立腺癌細胞株 PC3 細胞および LNCaP 細胞、膠芽腫細胞株 A172 細胞、子宮頸癌細胞株 Hela 細胞、といった解析した全ての細胞において、GGCT 発現抑制4日後の時点において細胞老化マーカーである Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) 染色法を用いて標識される細胞老化が顕著に誘導されることを世界で初めて明らかにした。また、その際には、p21^{WAF/CIP1}、もしくは、p16^{INK4A} のいずれかもしくは両方の発現が誘導されていることを世界で初めてみいだした。さらに、これらの反応が、がん抑制遺伝子 p53 に非依存的であり、また活性酸素種の増減には関与しないことを明らかにした。

第三章においては、MCF7 乳癌細胞株で GGCT を欠乏させると顕著に誘導することをみいだした p21^{WAF/CIP1} が、細胞老化の誘導に対し必須の役割を担っていることを実験的に証明した。すなわち、RNA 干渉法を組み合わせることで、GGCT と p21^{WAF/CIP1} を同時にノックダウンさせることで、細胞老化の誘導という現象が極めて効率よく阻害されることを証明した。また、細胞老化の誘導に先立ち、顕著な細胞周期の停止が伴っていること、この現象にも p21^{WAF/CIP1} の誘導が中心的な役割を担っていることを確かめた。これらの結果は、GGCT 欠乏時にみられるがん細胞の細胞老化という現象が、これらのサイクリン依存性キナーゼ阻害因子のうち一因子に強く依存することを示している。この結果とは対照的に、MDA-MB-231 細胞においては、p21^{WAF/CIP1} ではなく、p16^{INK4A} が GGCT 欠乏によって引き起こされる細胞老化の誘導と非アポトーシス細胞死という現象に重要な役割を果たすことを、実験的に証明した。すなわち、RNA 干渉法を組み合わせることで、GGCT と p16^{INK4A} を同時にノックダウンさせることで、細胞老化誘導の現象が極めて効率よく阻害されることを証明した。

以上の成績は、さまざまながん組織で正常組織に比べ高い発現がみられる γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)の、がん細胞の増殖における重要性を改めて証明し、このアミノ酸代謝の一端を担う分子の機能不全を惹起することでがん細胞の増殖を抑制するという新規治療戦略を提唱するうえで基盤的な基礎情報を提供するものである。

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