

審査の結果の要旨

氏名 早河 翼

本研究は、胃癌および*H.pylori*感染胃炎において、MAPK経路を構成するMAP3Kの一つであるASK1の役割を明らかにするため、臨床検体、ASK1ノックアウトマウス、胃癌細胞株を用いた解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 臨床検体を用いた解析の結果、健常者と比較して*H.pylori*感染胃粘膜、および胃癌組織ではASK1の蛋白発現量、および、下流に存在する活性化JNKの発現が増加していた。
2. MNUマウス胃腫瘍モデルを用いた解析の結果、ASK1ノックアウトマウスでは腫瘍の減少が認められた。また、ヒトと同様に野生型マウスの腫瘍部ではASK1の増加が認められ、下流のリン酸化JNK、c-Junの発現も亢進していた。
3. 4種の胃癌細胞株を用いた検討では、ASK1特異的なsiRNAによるノックダウンにより、細胞増殖が抑制され、細胞周期が遅延した。ASK1ノックダウン細胞のcDNAをReal-time PCRアレイで解析した結果、サイクリンD1の発現が減少していることが示され、蛋白レベルでも減少が確認された。一方、ウイルスおよびプラスミドベクターによりASK1を強制発現すると、逆にサイクリンD1の発現が増加し、これはASK1のリン酸化能依存的であった。サイクリンD1のプロモーター領域に変異を生じさせたプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより、サイクリンD1の発現がAP-1サイトを介して行われていることがわかった。
4. 胃癌におけるASK1の発現増加機序として、サイクリンD1の標的転写因子の一つであるE2FのターゲットとしてASK1が存在している可能性を考えた。サイクリンD1を誘導するEGFで細胞を刺激すると、ASK1-JNKの活性化を通じサイクリンD1の増加が認められるだけでなく、サイクリンD1を介してASK1自体の発現も増加した。活性型ASK1をトランスフェクションすることにより、JNK、サイクリンD1の活性化を経て、内因性ASK1が誘導されることを確認した。ChIP法により、サイクリンD1およびASK1の強制発現によって、E2F1とASK1プロモーター領域との結合が増強されることを示した。これらより、胃癌においてASK1→サイクリンD1→E2F1→ASK1という正のフィードバック機構が存在し、癌細胞の増殖に寄与している可能性が考えられた。
5. 大腸癌、膵癌細胞を用いた検討では、ASK1によるサイクリンD1の発現制御は限定的であり、細胞増殖への影響は認められなかった。ヒトおよびマウス大腸癌組織においては、胃癌でみられたようなASK1発現量の増加は認められなかった。マウス胃上皮細胞、ラット胃正常上皮細胞株においても、ASK1の細胞周期や細胞増殖への関与は認め

られなかった。これらより、ASK1の細胞増殖調節能は、胃癌で特に顕著であることが示された。

6. 胃癌細胞株に*H.pylori*を感染させることにより、ASK1のリン酸化が認められるだけでなく、サイクリンD1の誘導を介しASK1蛋白が増加した。同様に、マウス*H.pylori*感染モデルにおいても、ASK1およびサイクリンD1の発現増加が認められた。ASK1は*H.pylori*によるJNKの活性化に関与し、アポトーシスを誘導することを*in vitro*の検討で明らかにした。

以上、本論文は、これまで詳細な分子メカニズムの明らかでなかった胃癌においてASK1の発現が増加しており、細胞増殖に働くシグナル経路の一つとして、ASK1・サイクリンD1の正のフィードバック機構の存在を明らかにした。また、ASK1は、胃癌の代表的な原因因子である*H.pylori*による細胞死にも関与していることを示した。本研究はこれまで発見されていなかったASK1の新たな機能を発見しただけでなく、分子標的治療の確立されていない胃癌における新たな治療標的薬の開発にも重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。