

## 審査の結果の要旨

氏名 吳 羽 拓

本研究は、難治性乳癌である basal-like type 乳癌において新たなる治療標的分子候補を探索するため、転写因子 NF- $\kappa$ B が basal-like type 乳癌において恒常的に活性化していることに着目し、癌悪性化に関与する新規 NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1、 basal-like type 乳癌細胞を用いたマイクロアレイ解析および遺伝子スクリーニングより、NF- $\kappa$ B 活性を抑制後、遺伝子発現が二倍以上減少し、未知 NF- $\kappa$ B 標的遺伝子である 26 個の遺伝子群を得た。さらに、RT-PCR 法により発現変動が確認された遺伝子の中から機能が明らかでない遺伝子を選択した。その結果、新規 NF- $\kappa$ B 標的遺伝子候補として 4 つの遺伝子に絞ることが出来た。
- 2、 4 つの候補遺伝子それぞれを basal-like type 乳癌細胞株である MDA-MB-231 に過剰発現し、ヌードマウスの fat pad に注射したところ、1 つの遺伝子 Tropomodulin 1(Tmod1)の過剰発現により造腫瘍能が亢進した。
- 3、 2 つの basal-like type 乳癌細胞株に I $\kappa$ B $\alpha$ -SR を発現させ NF- $\kappa$ B 活性を抑制すると内因性 Tmod1 の発現量が低下した。また、TNF $\alpha$ 刺激により NF- $\kappa$ B 活性を増加させたところ Tmod1 の mRNA 発現は時間経過とともに増加した。さらに、NF- $\kappa$ B components の 1 つである RelA の抗体を用いて ChIP アッセイを行ったところ、Tmod1 プロモーター領域の増幅が確認された。
- 4、 35 種のヒト乳癌細胞株を luminal type および basal-like type に分類し、Tmod1 の mRNA 発現量を比較した。その結果、basal-like type において Tmod1 の mRNA 発現が増加していることが明らかとなった。また、ヒト乳癌腫瘍検体における Tmod1 発現レベルを検討するため、公共に公開されているヒト乳癌腫瘍検体の遺伝子発現データを使用した。その遺伝子発現に基づいて 94 の乳癌腫瘍検体をそれぞれの subtype に分類し、Tmod1 発現量を比較したところ、basal-like type 乳癌において特異的に Tmod1 mRNA 発現が増加していた。
- 5、 空ベクター導入細胞および Tmod1 過剰発現細胞を通常の培養条件下において培養し増殖能を比較したところ増殖能に顕著な差は認められなかった。しかし、タイプ 1 コラーゲンを用いた 3D 培養を行うと、Tmod1 過剰発現細胞の増殖は亢進した。また、MMI270 をコラーゲン中に添加し培養すると、両者の増殖は抑制され、Tmod1 過剰発現による増殖促進も抑制された。

- 6、 リコンビナントタンパク TIMP1 および TIMP2 をコラーゲン中に添加し増殖能を比較すると、Tmod1 による増殖能促進は両者の阻害剤により抑制された。従って、MT1-MMP および MT1-MMP により活性化される分泌型 MMP2、MMP9、および MMP13 が 3D 増殖促進に関与すると考えられた。
- 7、 コントロール Luciferase shRNA および Tmod1 shRNA をレトロウイルスベクターに組み込み、MDA-MB-231 細胞に感染させ shRNA 安定発現細胞を作製した。これらの細胞を用いて 2D および 3D 増殖を比較したところ、2D 培養条件下においてはそれぞれの増殖能に変化は認められなかったが、タイプ 1 コラーゲン中で培養すると Tmod1 ノックダウンにより細胞増殖能の低下が認められた。さらに、MMP13 の mRNA 発現が Tmod1 ノックダウン細胞において減少しているが明らかとなった。一方、MMP13 の発現は Tmod1 の過剰発現により増加した。
- 8、 Tmod1 による MMP13 発現制御に関して検討を行ったところ、pERK、pJNK、p-p38 の発現に関しては顕著な変化は認められなかったが、Tmod1 ノックダウンにより  $\beta$ -catenin の発現量が減少した。また、核内に局在する  $\beta$ -catenin 発現量が減少していることが明らかとなった。一方、Tmod1 過剰発現細胞において核内の  $\beta$ -catenin 発現量は増加していた。さらに、 $\beta$ -catenin/TCF-Lef 複合体の転写活性化能に関しても、Tmod1 ノックダウンにより減少した。
- 9、 Tmod1 ノックダウンによる  $\beta$ -catenin 発現制御を解析したところ、 $\beta$ -catenin の mRNA 発現の低下は認められなかった。そこで、プロテアソーム阻害剤 MG13 を培地中に添加し、 $\beta$ -catenin のタンパク質安定化に関して検討を行ったところ、 $\beta$ -catenin のタンパク質発現量は MG132 添加により蓄積し、Tmod1 ノックダウン細胞において認められた  $\beta$ -catenin の発現低下が抑制された。以上のことより、Tmod1 は  $\beta$ -catenin のプロテアソーム分解を抑制し、安定化を促進していると考えられた。

以上、本論文はヒト乳癌細胞において、癌悪性化に関与する新規 NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 Tmod1 の機能を明らかにした。basal-like type 乳癌に対する効果的な治療薬は未だ報告されておらず、新規治療薬の開発が期待されていることから、Tmod1 が basal-like type 乳癌の新たな治療薬候補としてなり得ることが期待される。また、本研究は basal-like type 乳癌の悪性化促進機構の解明に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。