

論文内容の要旨

論文提出者氏名 齋藤 友充子

論文題目

Identification of c-Met as a novel target of γ -glutamylcyclotransferase.

論文内容の要旨

γ -glutamylcyclotransferase (GGCT) は正常組織と比較して膀胱がん組織で高発現するタンパク質として発見され、後に様々ながん組織で高発現していることが確認された。GGCTの高発現は、乳がんや卵巣がん、甲状腺がんなどの予後不良と関連していることが報告されている。様々なヒトがん細胞株、およびそのマウス異種移植モデルにおけるGGCTの発現抑制は、がんの生長を抑制することが報告されているが、その詳細な分子機構は未だ解明されていない。本研究は、GGCT発現抑制によりがん細胞増殖抑制および細胞周期停止が引き起こされる分子機構を解明することを目的とした。

前立腺がん細胞PC3、肺がん細胞A549、膀胱がん細胞J82、腎がん細胞A498を使用し、siRNAを用いてGGCTノックダウンを行ったところ、いずれの細胞株でも著明な増殖抑制を認めた。またWestern blot法を用いて細胞増殖関連シグナル伝達系を調べたところ、MEK-ERK経路の不活化とがん抑制遺伝子RBタンパク質の活性化を認めた。

次に、DNAマイクロアレイ解析を用いて、MEK-ERK経路の不活化を引き起こしうるGGCTの下流因子を探索したところ、PC3細胞でGGCT発現抑制時に低下し、マウス線維芽細胞NIH3T3でGGCT強制発現時に上昇する共通の遺伝子としてc-Metを見出した。この結果を受け、GGCTノックダウン時のPC3、A549、J82、A498細胞におけるc-Metの発現をWestern blot法およびRT-qPCR法で解析し、タンパク質およびmRNAレベルでc-Metの発現が抑制されることを確認した。

また、PC3およびA549細胞において、c-Metの強制発現がGGCTノックダウンによるRBの活性化を減弱することを見出した。さらに、A549細胞におけるBrdU取り込み検査では、c-Met強制発現がGGCTノックダウンにより低下したS期細胞割合を有意に回復したことから、GGCTノックダウンによる細胞周期停止効果は、部分的にc-Metの発現抑制に依存することが判明した。

STAT3はc-Metのプロモーター領域に結合し、その発現を促進することが報告されている。STAT3阻

害剤であるstatticの投与により、PC3、A549細胞におけるc-Met発現がタンパク質およびmRNAレベルで抑制されることを確認した。さらに、PC3およびA549細胞において、GGCTノックダウンによりSTAT3のリン酸化と核内移行が抑制されたことから、GGCTノックダウンによるc-Metの発現抑制は、STAT3の不活化を介すると考えられる。

GGCTノックダウンはAMPK活性化を介してmTORC1を不活化し、mTORC1はSer727のリン酸化を介してSTAT3を活性化することが報告されている。PC3細胞においてGGCTと同時にAMPKをノックダウンすると、GGCTノックダウンによるc-Met発現低下、STAT3とMEK-ERK-RB経路の脱リン酸化、および細胞周期の停止が減弱した。したがって、GGCTノックダウンによるSTAT3-c-Met-MEK-ERK-RB経路を介した細胞周期の停止は、AMPKの活性化に依存することが示された。

PC3細胞のマウス異種移植モデルに対し、GGCT阻害剤であるPro-GAの腹腔内投与を行うと、腫瘍の生長が抑制されることが報告されている。このPro-GAを投与したPC3マウス異種移植モデルの腫瘍組織において、c-Met発現抑制およびRBの脱リン酸化を認めた。

以上の結果より、GGCTノックダウンはAMPKの活性化を経て、STAT3-c-Met-MEK-ERK経路を介し、RBをタンパク質レベルで活性化することにより抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。本研究は、様々ながんにおいてGGCTの高発現が悪性化を引き起こす分子機構の一つを明らかにし、がんの治療や予防における標的分子としてGGCTの有用性を明らかにした。