

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	前谷 有香
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
細胞周期を制御する PRIP 機能の解析研究			
論文審査担当者			
主 査	教授 杉山 勝	印	
審査委員	教授 藤井 万紀子		
審査委員	教授 吉子 裕二		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>細胞は細胞周期の G1 期において、細胞増殖刺激や細胞分裂抑制シグナル強度の均衡を判断し、細胞運命を決定する。この情報伝達機構の 1 つに AKT-GSK38 伝達経路がある。増殖因子刺激によってホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) が活性化されると、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 [PI(4,5)P<sub>2</sub>] が、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-トリスリン酸 [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>] に代謝される。AKT は細胞膜の PI(3,4,5)P<sub>3</sub> に結合して移動し、ホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 (PDK1) 等により活性化され、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 38 (GSK38) をリン酸化して不活化し、相対的にサイクリン D1 の量が増え細胞周期が進行するという制御を示す。一方、静止期の細胞は GSK38 が活性化状態にあり、サイクリン D1 の分解を促して細胞周期進行を抑制する。すなわち、細胞周期進行の原動力として働くサイクリン D1 の情報伝達機構を制御する機構は、細胞分裂の開始を決定する重要な役割を担う。</p> <p>申請者の研究グループは、PLC-related catalytically inactive protein (PRIP) という、PLC と似たドメイン構造を持ちながら PLC 酵素活性を持たない分子の細胞膜リン脂質代謝機構について研究してきた。PRIP は、PI(4,5)P<sub>2</sub> に結合し PI3K による PI(4,5)P<sub>2</sub> から PI(3,4,5)P<sub>3</sub> への代謝を調節する分子である。そこで、本研究では PRIP が PI(4,5)P<sub>2</sub> 情報伝達系の下流で活性化される AKT-GSK38 伝達経路を介し細胞周期を制御するのではないかと仮説を立てた。</p> <p>PRIP には PRIP1 と PRIP2 の二つのサブタイプがある。まず、PRIP が PI(4,5)P<sub>2</sub> から PI(3,4,5)P<sub>3</sub> への産生に影響するかを調べた。PRIP1, PRIP2 ダブルノックアウトマウスから調整したマウス線維芽細胞 (PRIP-KO MEF) から抽出したリン脂質に含まれる PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 量をドットプロット法で解析した結果、PRIP-KO MEF では PI(3,4,5)P<sub>3</sub> 産生が亢進した。そこで PRIP が細胞周期に与える影響を検討するため、ヒト乳癌細胞 MCF7 (PRIP1<sup>+</sup>, PRIP2<sup>+</sup>) に対して siRNA を用いて PRIP2 をノックダウンした siPRIP2-MCF7 を作製し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、siPRIP2-MCF7 では G1 期の細胞の割合が減少していた。逆に PRIP1 を過剰発現させた PRIP1-MCF7 を作製し同様に解析したところ、G1 期の細胞の割合が増加した。次に細胞外の増殖因子刺激強度が PRIP に仲介される細胞周期の進行に影響するかを検討するため、培地に添加する FBS 濃度を変えてフローサイトメトリー解析を行なった。10% FBS もしくは 2% FBS 存在下で解析した結果、PRIP の有無による G1 期での解析結果の差が 2% FBS 存在下でより顕著であった。この結果から、PRIP が細胞周期の G1 期から S 期への進行を負に制御し、その抑制調節は増殖因子が希薄な環境で顕著になることが明らかとなった。</p> <p>PRIP の G1 期の調節が AKT-GSK38 伝達経路を介するかを検討するためウェスタンブロット解析を行った。siPRIP2-MCF7 では、AKT-GSK38 情報伝達経路は正に制御されサイ</p>			

クリン D1 の発現が亢進し、細胞周期がより活性化されていた。一方 PRIP1-MCF7 では、AKT-GSK3B 情報伝達経路は負に制御されサイクリン D1 の発現レベルが減少し、細胞周期の進行が抑えられていた。MEF やヒト乳癌細胞 HeLa を用いて検討し同様の結果を得ており、PRIP が仲介する細胞分裂抑制機構は、一般的な細胞機能であると考えられた。

PRIP は細胞周期の G1 期の分子機構を制御することが分かった。そこで PRIP が細胞増殖に与える影響を細胞数の計測により検討した。その結果、2% FBS 存在下では PRIP1-MCF7 の細胞増殖が抑制された。また、EGFP-PRIP1-MCF7 で異種移植片モデルを作製し腫瘍塊形成能を解析したところ、EGFP-PRIP1-MCF7 の腫瘍成長が著しく抑制された。

本研究で、PRIP は AKT-GSK3B 伝達経路を介し細胞周期の進行を負に制御し、癌細胞などの増殖を抑制することを明らかにした。PRIP 発現による細胞分裂の制御効果は、細胞外刺激が弱い場合に顕著に見られることから、血管新生が乏しく十分に増殖因子が届かない腫瘍に対し PRIP 機能ドメインを過剰に発現させるといった治療法を開発することにより、癌細胞増殖を抑制できる可能性がある。

よって審査委員会委員全員は、本論文が前谷 有香に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	前谷 有香
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
細胞周期を制御する PRIP 機能の解析研究			
最終試験担当者			
主査	教授 杉山 勝	印	
審査委員	教授 藤井 万紀子		
審査委員	教授 吉子 裕二		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年6月20日の第1回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年8月6日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1 PRIP1 と PRIP2 の相同性と細胞内機能の違い			
2 PRIP1 と PRIP2 の癌治療標的分子としての有用性			
3 10% FBS と 2% FBS 培養条件下での細胞増殖能に与える PRIP 有無の影響			
4 PRIP ノックアウトや過剰発現による個体への影響や副作用			
5 PRIP 情報伝達系を標的にした抗腫瘍薬開発の可能性と臨床応用への展望			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			