

氏名	矢部 邦章
学位の種類	博士(医療科学)
学位記番号	甲第23号
学位授与の日付	2022年3月13日
学位論文題名	Progranulin depletion inhibits proliferation via the transforming growth factor beta/SMAD family member 2 signaling axis in Kasumi-1 cells 「Kasumi-1細胞株におけるプログランニューリン抑制によるTGF- $\beta$ /Smad2シグナルを介した増殖抑制作用の解明」
指導教員	教授 齋藤 邦明
論文審査委員	主査 教授 竹松 弘 副査 教授 秋山 秀彦 教授 浅田 恭生

### 論文内容の要旨

プログランニューリンは胚発生や創傷部の修復、神経細胞の生存に寄与する成長因子であることに加え、炎症反応の抑制にも寄与するなど、多岐にわたる機能を有するタンパク質である。腫瘍細胞の一部はプログランニューリンを盛んに産生することが知られており、産生されたプログランニューリンは腫瘍細胞の増殖や遊走を促進するほか、足場非依存性増殖能および化学療法薬剤に対する抵抗性の付与、上皮-間葉細胞分化転換の促進など腫瘍細胞の生存に有利に働きかけることが報告されている。さらに免疫不全マウスを用いたヒト腫瘍細胞株の移植実験からは、プログランニューリンの発現を抑制することで腫瘍の増殖を押さえ込めることも明らかにされている。臨床研究においては乳がんや肺がん、造血器腫瘍などにおける腫瘍組織中のプログランニューリン発現量が高い患者群や、血中プログランニューリン濃度が高い患者群は総生存期間が短い、再発率が高いなど予後と関連した所見を示すことが明らかにされている。

このようにプログランニューリンは患者階層化に繋がるバイオマーカーとしてのみではなく、新たな治療標的因子にもなる可能性を示しており、その作用機序もAkt/mTOR経路を介していることが明らかにされつつある。その反面、Akt/mTOR経路のみでは説明できない現象も認められることから、他の経路の存在が示唆されていた。本論文では血中プログランニューリン濃度の顕著な上昇が認められる造血器腫瘍を対象に、プログランニューリン抑制による腫瘍細胞の増殖抑制に関わる新たなシグナル経路の同定に取り組んだ。

ヒト由来細胞株としてパーキットリンパ腫に由来するDaudiおよびRAJI、急性前骨髄性白血病に由来するHL60、急性骨髄性白血病に由来するKasumi-1、脾B細胞リンパ腫に由

来するSLVLを本研究において使用した。電気穿孔法を用いてプログランニューリン特異的siRNAを導入し、プログランニューリン発現量が低下していること、細胞増殖が抑制されることを確認した。これらの細胞株のうちHL60とKasumi-1は顕著な増殖抑制を示し、特に急性骨髄性白血病は新たな治療法が求められていることから、急性骨髄性白血病に由来するKasumi-1を今後の検討に用いた。

既報に基づき、造血器腫瘍であるKasumi-1においてもAkt/mTOR経路が重要な役割を担っているのか明らかにするため、当該経路のリン酸化およびKasumi-1の増殖能に与える影響をプログランニューリン特異的siRNAと中和抗体を用いて解析した。結果としてプログランニューリン抑制が当該経路のリン酸化を抑制することが示され、他のがん種と同じくAkt/mTOR経路が重要な役割を果たしていた。一方、プログランニューリン抑制とAkt/mTOR経路阻害剤であるラパマイシンの併用は相加的に増殖抑制効果を示したことから、当該経路に依存しない作用機序の存在も示唆された。プログランニューリン抑制はAkt/mTOR経路非依存的にアポトーシスを誘導することも報告されており、アポトーシスのマーカーのひとつであるPARP分解産物の増加とAnnexin V陽性死細胞の増加を確認した。しかし代表的なアポトーシス関連タンパク質であるBaxやBcl-2に変動は認められず、カスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMKはプログランニューリン抑制による増殖抑制に影響を与えなかった。新たな作用機序を見出すためにmRNAマイクロアレイ法を用いて網羅的解析を実施したところ、プログランニューリン抑制により活性化されるシグナル経路としてTGF- $\beta$ が見出された。

さらなる解析からプログランニューリン抑制によりTGF- $\beta$ 産生量が増加すること、TGF- $\beta$ 受容体の下流に位置するSmad2のリン酸化が亢進することも明らかにした。さらに抗TGF- $\beta$ 抗体によりプログランニューリン抑制に起因するPARP分解産物の増加が抑制されること、抗TGF- $\beta$ 抗体とTGF- $\beta$ 受容体阻害剤であるLY2109761の双方がプログランニューリン抑制による増殖抑制を緩和することを明らかにした。

これらの結果から、プログランニューリン抑制による腫瘍細胞の増殖抑制はTGF- $\beta$ を介した経路も関与していることが示された。TGF- $\beta$ は腫瘍細胞の体細胞変異の程度や周囲の微小環境により、腫瘍促進的、抑制的のどちらにも働くことが知られている。プログランニューリンの治療標的化を進めるに際して、本知見は重要な役割を果たすと期待される。

### 論文審査結果の要旨

口頭試問では、プログランニューリンを抑制することで、Kasumi-1細胞での増殖抑制、細胞死誘導がおこることにおける分子機構についての研究結果が発表された。また、発表後には全審査員による質疑応答審査がなされ、研究の妥当性、研究の将来性、研究の意義などについての議論が行われた。

研究発表では、研究の新規性、学術性についての論理的な発表があり、質疑応答でも、十分に審査員のあげた疑問点に答えていた。

以上より、当該論文は、学位論文として認められる論文であったと判断された。