

氏名	ぐえん だつと ていえん NGUYEN DAT TIEN
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第718号
学位授与の日付	平成26年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Study on the negative regulators of IKK β /NF- κ B focusing on the link between inflammation and cancer (炎症と癌の関連に注目した IKK β /NF- κ B 抑制メカニズムの研究)
審査委員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 竹谷 茂 教授 功刀 滋

論文内容の要旨

本申請論文は General Introduction・Chapter 1・Chapter 2・Conclusion によって構成されている。

General Introduction においては、以下の各項目において炎症制御転写因子 NF κ B についての概論が述べられている。①NF κ B の活性化細胞内シグナルの解説。特に IKK β が NF κ B 活性化に不可欠なキナーゼであることが述べられている。②多くの癌において NF κ B の活性化が認められること、ただし現在までのところ NF κ B 活性化阻害剤の使用が必ずしも奏功せず、NF κ B の活性化のみならず抑制のより詳細なメカニズムの解明が求められていることが述べられている。③Chapter1 で取り上げられた AMAP1 について、AMAP1 が細胞運動や浸潤を制御する small G protein Arf の GTPase activating protein (GAP) であり、進行性乳癌において高発現していることが示すように癌との関わりが深い蛋白として積極的に研究が行われていたことが解説されている。また炎症と癌が深い関わりがあることからその炎症における役割も予想されながらも、それについては今まで殆ど研究が行われていなかったことが述べられている。④Chapter2 で取り上げられたアスピリンについて、歴史の古い鎮痛薬であるが多くの疫学的研究から特に大腸癌を抑制する効果が確認されていること、しかしながらそのメカニズムは不明であることが解説されている。また、アスピリンに IKK β 阻害による NF κ B 抑制効果があることが最近報告されており、その効果の分子メカニズムは依然として解明の余地があることが述べられている。

Chapter 1 では、AMAP1 が NF κ B の negative-feedback regulator であることが各種実験結果とともに以下のように報告されている。①IKK β の未知の役割を解明すべく、IKK β に結合する蛋白を proteomics により網羅的に解析したところ AMAP1 が同定された。②IKK β および AMAP1 の各種 deletion mutant を作製し、その結合を観察することによって結合部位を同定したところ、IKK β においては NEMO (IKK γ) binding site が、AMAP1 においては SH3 domain がそれぞれの結合部位であることが判明した。③NEMO と IKK β との結合が NF κ B 活性化に不可欠であるというこれまでの報告から、AMAP1 が IKK β と NEMO との結合を阻害することによって NF κ B の活性を抑制するの

ではないかという仮説を立てた。これに基づき各種実験を行ったところ、まず AMAP1 の過剰発現が IKK β と NEMO の、NEMO の過剰発現が IKK β と AMAP1 の結合を阻害することを観察した。次に、AMAP1 を過剰発現したときに NF κ B が抑制され、siRNA により AMAP1 発現が抑制されたとき NF κ B が活性化することを観察した。④NF κ B 活性化サイトカインである IL-1 β 刺激により、AMAP1 が細胞膜・核内から細胞質内に移行し、IKK β との結合が増強されることを観察した。以上より、negative-feedback による NF κ B の新規抑制機構を担う分子として AMAP1 を見出したことを報告した。これまで AMAP1 が進行癌で発現が亢進しているのは癌の進展を促進するものと考えられていたが、今回の報告はそれはむしろ炎症を抑制することによって癌を抑制しようとする自己防衛機構の結果であることを示唆していると考えられ、今後の創薬の手がかりとして期待される。

Chapter 2 では、アスピリンが IKK β の発現を阻害することによって癌抑制遺伝子である Adenomatous Polyposis Coli の蛋白発現を促進することが各種実験結果とともに以下のように報告されている。①アスピリンによって発現が変化する蛋白を proteomics により網羅的に解析したところ、癌抑制遺伝子として広く知られている Adenomatous Polyposis Coli (APC) 蛋白が同定された。②上記の結果を培養細胞で確認したところ、高濃度・長時間のアスピリン刺激により APC 蛋白の発現増加が認められた。またそれは蛋白合成阻害剤である cycloheximide により抑制され、APC の mRNA 発現がアスピリンで増加することから transcriptional level での制御と考えられた。③アスピリンが IKK β を阻害すること、IKK β の活性化亢進が APC を抑制することがこれまで報告されており、これに基づき siRNA によって IKK β の発現を抑制したところ APC 蛋白の著明な増加を認めた。またアスピリンによる APC 蛋白発現亢進の際に IKK β の発現が低下することを観察した。④上記の観察はすべて HEK293 細胞によるものであるため、cell line ではない細胞である Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) を用いても実験を行ったが、やはり同様にアスピリンによる IKK β の蛋白発現低下と APC 蛋白の発現亢進を認めた。以上より、アスピリンが IKK β の抑制によって APC 蛋白の発現を亢進させることを報告し、これはアスピリンの有する癌抑制効果のメカニズムの一端を説明しうるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌のみならず循環器・呼吸器・消化器などあらゆる臓器の疾患において NF κ B 活性化による炎症の関与が報告されており、このため NF κ B をいかに制御するかは新規治療・創薬において喫緊の課題である。しかしながら NF κ B 活性化メカニズムがよく解明されているのに比して、その抑制メカニズムはいまだ未知の点が多い。この点に注目し、新規 NF κ B 抑制分子として AMAP1 を同定したこと、臨床疫学的に癌抑制効果を有することが明らかとなっているアスピリンが NF κ B 抑制を介して癌抑制遺伝子 APC の蛋白発現を増強させることを見出した今回の報告は、癌抑制にむけた NF κ B の新規制御メカニズムの解明として意欲的なものと考えられる。まず Chapter1 については、これまで殆ど報告のない NF κ B の negative-feedback regulation 機構を新規に解明したこと、しかもそれが既に臨床的に癌との関わりが重要視されている AMAP1 であることが意義の深い発見と考えられる。また Chapter2 においては、癌抑制効果が確実でありながらも明らかでなかったアスピリンの癌抑制メカニズムを NF κ B との関わりから解明したことは、これまでの疑問に答えうる先駆的研究と考えられる。また Chapter1、Chapter2 ともに AMAP1、APC 蛋白を解析するきっかけが proteomics による網羅的解析であり、研究の出発点において客観性が担保されていることも評価される。

学位論文は英語で丁寧に作成されており、論旨も明快であった。本論文の内容は、申請者が筆頭著者である 1 編を含む、査読制のある国際科学雑誌にすでに発表済みの下記 2 編の論文に基づいている^{1, 2}。

1. Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. Amap1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor-kappaB under inflammatory conditions. *Scientific reports*. 2014;4:5094
2. Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin augments the expression of adenomatous polyposis coli protein by suppression of ikkbeta. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446:460-464