



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1442号
学位記番号	第303号
氏名	坂井 勇斗
授与年月日	平成26年3月31日
学位論文の題名	がんの発生及びその特性における TRB3 の機能解析
論文審査担当者	主査： 服部 光治 副査： 林 秀敏, 平嶋 尚英, 長田 茂宏

氏名	さかい ゆうと 坂井 勇斗
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 303 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	がんの発生及びその特性における TRB3 の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 服部 光治 (副査) 教授 林 秀敏・教授 平嶋 尚英・准教授 長田 茂宏

論文内容の要旨

がんの発生及びその特性における TRB3 の機能解析

坂井 勇斗

[研究背景および目的]

がんは、日本人の主要な死因が感染症から生活習慣病へと移行する中で、1981 年以来死亡原因の第 1 位となり、2010 年度では死因の約 3 割を占めるに至った。全世界的にみても疾病対策上の最重要課題として対策が進められている。近年、遺伝子レベルでの病態の理解が進み、「がんは遺伝子の異常によっておこる病気である」という概念確立とともに、診断および標準的治療法・予防法の確立に関する研究が広く推進されている。

がん細胞は、細胞周期のチェックポイント機能の異常やアポトーシスに対する抵抗性の獲得など、細胞増殖の正常な制御機構や修復機構が破綻しているため、著しい細胞数の増加を引き起こす。

Tribbles は *Drosophila* において、正常細胞の増殖、遊走および形態形成を制御する増殖因子のインヒビターとして機能している。

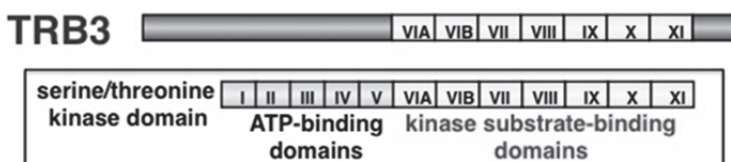


Fig.1 TRB3 contains the classic substrate-binding domains of a protein kinase but not the ATP-binding and kinase-activating domains.

哺乳類における Tribbles のオルソログは TRB1、TRB2、TRB3 である。TRB3 は、Tribbles と同様にセリン/スレオニンキナーゼの基質結合ドメインを持つが、ATP 結合ドメインやキナーゼ活性化ドメインを持たないことから(Fig.1)、pseudokinase ファミリーのの一つとして捉えられている。TRB3 は哺乳類の Tribbles ファミリーの中でも重要な分子であり、TRB3 と相

相互作用を示す分子は、転写因子やユビキチンリガーゼ、bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor、mitogen activated protein kinase (MAPK) および phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナル伝達関連分子など広範囲に渡っている。これらの分子との相互作用を通して、TRB3 は糖・脂質代謝、アポトーシス、細胞分化、細胞ストレスおよびコラーゲン発現調節などの重要な細胞プロセスに関与することが報告されている。当研究室においてもストレス誘導性の転写因子である C/EBP

homologous protein (CHOP) へ TRB3 が結合することで、p300 の作用を阻害し CHOP の転写活性を抑制すること、TRB3 が cyclin dependent kinase (Cdk) の活性化に不可欠な cell division cycle 25 A (Cdc25A) の安定性を制御することなどを見いだしている。最近の研究により、TRB3 が腫瘍形成の重要な修飾因子であることが示されており、種々のヒトがん細胞株やヒトがん組織において高発現していることが報告されている。このように、がんの形成や増殖、悪性化に TRB3 の関与が強く疑われるが、その明確な役割は未だ明らかになっていない。

本研究では、TRB3 の発現が *in vitro* / *in vivo* における細胞増殖、及び形態学的な特徴に影響を与えるかどうかについて解析することを目的とした。

[結果]

1. TRB3 安定発現株の増殖促進効果および同株皮下移植腫瘍の体積増大効果

1-1. TRB3 は細胞増殖を促進する

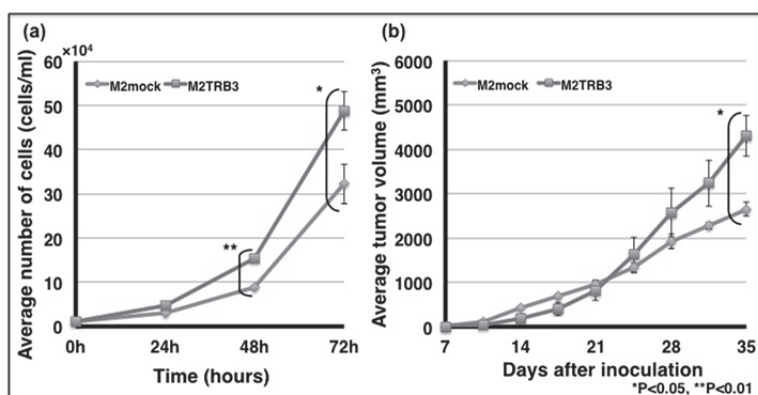


Fig.2 Enhancing effect of TRB3 on the growth of M2TRB3 cell line and implanted M2TRB3. The formula of $V \text{ (mm}^3\text{)} = L \times D \times H \times \pi / 6$, where L is length, D is depth, and H is height.

(Fig.2a)。さらに、個体レベルでの影響を検討するため、これらの細胞株をヌードマウス側腹部皮下に移植し、形成された腫瘍の体積を測定した (2回/週)。移植 35 日後において M2TRB3 腫瘍の体積が M2mock 腫瘍に比べ有意に増加した (Fig.2b)。また、屠殺剖検後に H.E.染色による腫瘍の組織学的解析および proliferation cell nuclear antigen (PCNA) 染色により細胞増殖率を測定した。組織学的にいずれの細胞株も間質に乏しく solid な増殖像を示した。M2TRB3 腫瘍では papillary growth がみられた。また、M2TRB3 腫瘍細胞の核の最大径は M2mock 腫瘍細胞に比べて有意に大きいことが明らかとなった。PCNA 染色では、M2TRB3 腫瘍においてコントロールと比較して陽性率が増加していた (有意差なし) (Fig.3)。

細胞増殖への TRB3 の影響を解析するため、マウス乳がん細胞株 Cl66M2(M2) にヒト TRB3 遺伝子および空ベクターを導入し、ヒト TRB3 遺伝子安定発現株(M2TRB3) およびコントロール mock 株(M2mock) を作製した。これらの細胞株を、6 ウェルプレートに 1.0×10^4 個/ウェルで播種し、0.5%FBS 添加 DMEM で 48 時間培養後、10%FBS 添加 DMEM に培地交換をして培養し、0、24、48、72 時間で細胞を回収、細胞数を計測した。計測した値から増殖曲線を作成した。M2TRB3 は M2mock に比べ、48 および 72 時間で有意に細胞数が増加した

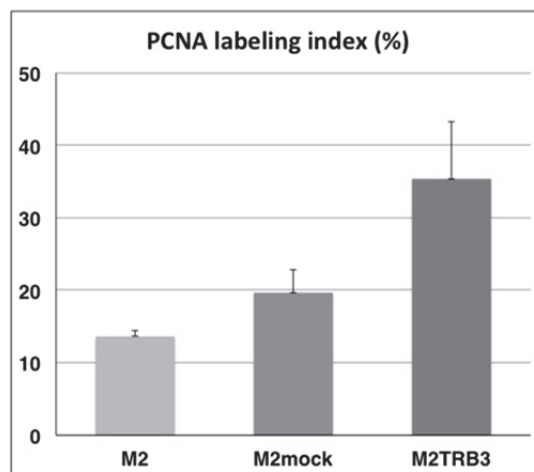


Fig.3 Effect of TRB3 on cell proliferation determined by PCNA staining. PCNA labeling index (%) was measured by calculating the number of PCNA-positive cells/the total number of cells seen in high power field.

1-2. TRB3 は DNA 倍数性に寄与する

TRB3 安定発現株の腫瘍の核サイズ変化が観察されたので、DNA 倍数性への影響をフローサイトメトリー解析によって調べた。各細胞株を 0.5%FBS 添加 DMEM で 48 時間培養後、10%FBS 添加 DMEM に培地交換をして培養し、0、72 時間で細胞を回収、70%エタノールで固定後、propidium iodide (PI) によって染色し解析した。M2mock 株は二倍体や四倍体、八倍体を含む倍数性を示していたが、M2TRB3 株では四倍体および八倍体のみが観察され、二倍体の染色体集団は観察されなかった (Fig.4)。

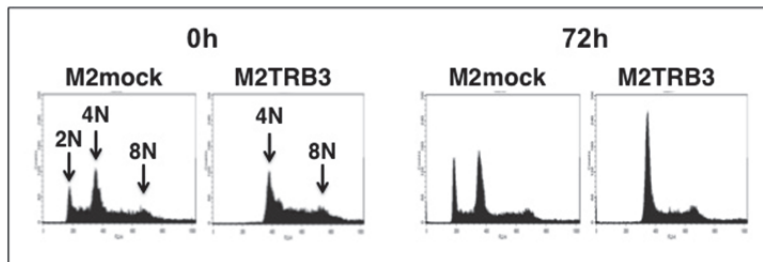


Fig.4 Effects of TRB3 gene on DNA ploidy. After synchronizing cells in G0/G1, ploidy status was determined by flow cytometry analysis at 0 (left two panels) and 72h (right two panels) in the M2mock and M2TRB3 cell lines. Note three peaks (2N, diploid; 4N, tetraploid; 8N, octaploid) in different locations in DNA histogram.

2. ヒト TRB3 発現トランスジェニックマウス(hTRB3TG)の肝組織に与える影響

2-1. ヒト TRB3 発現トランスジェニックマウスの作製

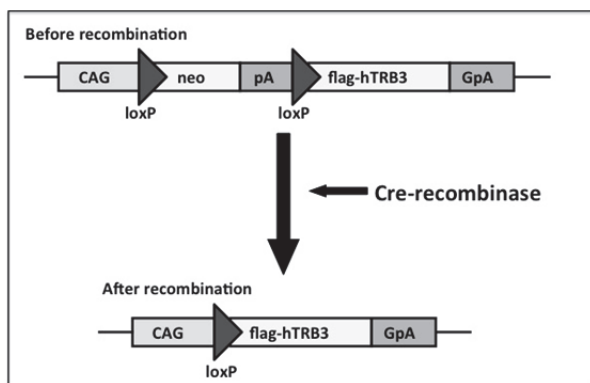


Fig. 5 Scheme of recombination of hTRB3 construct
The pCALNL-flag-hTRB3 construct is comprised of a hybrid CMV enhancer/chicken β -actin (CAG) promoter, a cassette for the neomycin resistance gene flanked by loxP sites, and a sequence containing a human TRB3 with a flag-tag. Infection with the Cre expressing adenovirus results in recombination of hTRB3 construct, eventually generating a functional flag-hTRB3 gene expression unit. GpA, rabbit β -globin poly A site; pA, SV40 early poly A site.

Cre/loxP 発現制御系を用いることで、時期・組織特異的に TRB3 遺伝子を発現させることができるコンストラクトを用いた (Fig.5)。作成したコンストラクトをサル腎臓由来線維芽細胞株 COS-7 に導入し、Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを感染後、ウェスタン法により TRB3 タンパクの発現を確認した。マイクロインジェクション法により C57BL/6NcrSlc マウス前核期受精卵にヒト TRB3 遺伝子コンストラクトを導入し、トランスジェニックマウスを得た。トランスジェニックマウスにおけるヒト TRB3 の発現を mouse embryonic fibroblast (MEF : マウス胎児線維芽細胞) を用いた RT-PCR 法およびウェスタン法によって確認した。Cre リコンビナーゼを作用させたトランスジェニックマウス由来の MEF から Cre/loxP の組みかえ、およびヒト TRB3 が発現していることを確認した。投与ウイルス量依存

的に、TRB3 mRNA の発現量が増加していた (Fig.6)。

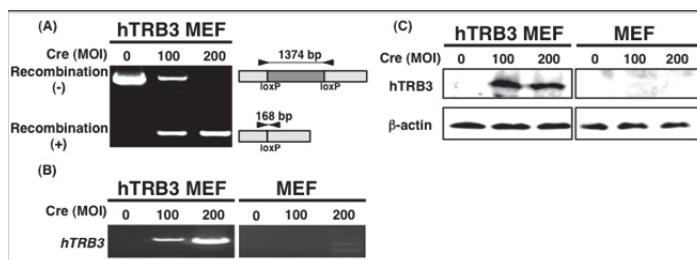


Fig. 6 Confirmation of recombination of hTRB3 construct and hTRB3 mRNA/protein expression in hTRB3 MEF cells
hTRB3 MEF and MEF cells were generated from hTRB3 and wild mice, respectively. These cells were treated with Cre expressing adenovirus (0, 100, 200 MOI). MOI indicates multiplicity of infection. (A) Confirmation of recombination of hTRB3 construct in hTRB3 MEF cells by PCR assay. A 168-bp DNA fragment derived from recombinant hTRB3 construct was seen in cells treated with Cre expressing adenovirus. hTRB3 DNA fragments were not PCR-amplified in MEF cells (data not shown). (B) Confirmation of hTRB3 mRNA expression in hTRB3 MEF/MEF cells by RT-PCR assay. Increasing mRNA expression was seen in hTRB3 MEF cells (left panel). No mRNA expression was seen in MEF cells (right panel). (C) Confirmation of hTRB3 protein expression by western blot assay. hTRB3 protein expression was observed in hTRB3 MEF cells but not in MEF cells. β -Actin was used as an internal control.

2-2. TRB3 のマウス肝組織

に与える影響

未処置の hTRB3TG および野生型マウスから、肝、腎、脾を摘出し、標本を作製し観察したところ、各臓器に特記すべき変化はみられなかった。hTRB3TG、および野生型マウスに Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを尾静脈から注

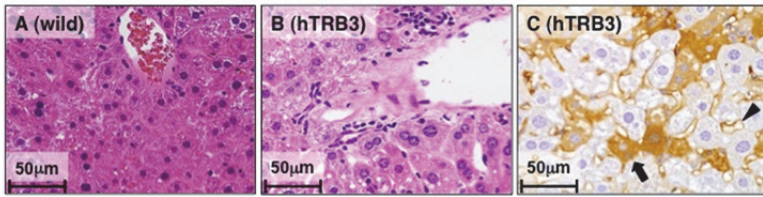


Fig. 7 Representative histological features and immunohistochemical analysis of liver, spleen and kidney tissues of hTRB3 and wild mice with Cre treatment
hTRB3 and wild mice were infected with Cre expressing adenovirus. (A) HE staining of liver tissue derived from wild mouse. No apparent abnormality was seen. (B) HE staining of liver tissue derived from hTRB3 mouse. Note that nuclear size of hepatocyte increases compared to that of wild mouse. Slight perivascular inflammation is also seen. (C) Immunohistochemical staining of liver tissue derived from hTRB3 mouse. Note that FLAG-mediated hTRB3 protein expression was seen in the cytoplasmic region of hepatocytes (arrow) and sinusoid of the liver tissue (arrowhead). FLAG-mediated hTRB3 protein expression was faintly or uncertainly stained in the remaining hepatocytes.

入し、10日後に肝を摘出し標本を作製した。hTRB3TGにおいて、肝細胞の核の肥大、核小体数の増加、focalな血管周囲の炎症像がみられた (Fig.7A, B)。FLAG抗体での免疫染色では肝細胞の細胞質が陽性に染まった (hTRB3 タンパク発現陽性) (Fig.7C)。

[結論および総括]

マウス乳がん細胞株でのヒト TRB3 遺伝子の安定発現は、乳がん細胞の増殖を有意に促進し、安定発現株の移植腫瘍の体積は時間依存的に増大した。フローサイトメトリー解析ではヒト TRB3 遺伝子安定発現株の倍数性変化が観察された。さらに、ヒト TRB3 遺伝子導入マウスの肝組織では肝細胞の肥大および核小体数の増加がみられた。これらの所見から以下の結論が考えられる。ヒト TRB3 遺伝子は、(1)マウス乳がん細胞の増殖を少なくとも正に制御する何らかの役割を果たしている。(2)マウス乳がん細胞の倍数性に与える影響および遺伝子導入マウス肝細胞の形態学的変化を考慮すると、細胞の不安定性や正常細胞から腫瘍への形態的特徴をもつ細胞への変化に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究成果は、TRB3 遺伝子発現によるがん細胞増殖への影響の一端を明らかにしたものであり、TRB3 依存性の発がん経路解明の一助になることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、各種ストレスで誘導されるキナーゼ様分子で、腫瘍組織やがん細胞の多くで高発現している TRB3 が、がんの発生や進行にどのように関与しているかを解明する目的で、悪性度（転移能）の低い腫瘍細胞への TRB3 の高発現や TRB3 のトランスジェニックマウスの作製を行い、その表現型を調査し、TRB3 の機能解析を進めたものである。

これらの高発現株や遺伝子改変動物を用いて解析した結果、TRB3 はゲノムの不安定化や核の膨張などの前がん病変を誘起することができることを明らかにしている。今まで、TRB3 が直接、がんの発生を促進しているという報告は見られず、がん遺伝子の特徴をもった分子としての役割を初めて明らかにしている。その分子メカニズムについての解析も行っており、細胞周期関連遺伝子や遺伝子修復関連遺伝子の発現異常の誘導などを示しており、新規の抗がん剤の創薬標的に可能性についても提案している。。

したがって、本審査委員会は博士(薬学)の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。