京都大学	博士（医学）	氏　名	浦　克明
論文題目	Enhanced *RASGEF1A* Expression Is Involved in the Growth and Migration of Intrahepatic Cholangiocarcinoma (肝内胆管癌の増殖能及び移動能と *RASGEF1A* 遺伝子の発現との関連性に対する研究)		

（論文内容の要旨）

肝内胆管癌の分子生物学的研究によりK-RASやp53を含む複数の遺伝子変異の存在が明らかになった。K-RASの変異は、そのシグナル経路の下流を恒常的に活性化し、その結果腫瘍形成を促進するとされている。一方、正常なRas蛋白はGDP/GTP交換蛋白(guanine nucleotide exchange factor(GEF)蛋白)とGTP加水分解蛋白により調節を受け、GTPに結合した状態の活性型と、GDPに結合した不活化型を往復する。GEF蛋白は、細胞外刺激を受けてRas蛋白のGDP遊離とGTP結合を進め、その結果活性化されたRasはその下流蛋白(Raf等)にシグナル伝達する。

今回、25例の肝内胆管癌標本を用いて施行したゲノムワイドなcDNAマイクロアレイ遺伝子発現検索を行い、その結果高発現が確認された遺伝子の内、Ras活性領域を持つことが予測される未知の遺伝子*RASGEF1A*　(RasGEF domain family,member 1A)に注目し研究を行った。その結果、RASGEF1AがK-RAS、Ha-RAS、N-RASに対するGDP/GTP交換能を有することが判明し、RASGEF1Aが肝内胆管癌の新しい治療分子標的となる可能性が示唆されたのでこれを報告する。

初めに、K-RAS、Ha-RAS、N-RAS蛋白にそれぞれ[^{3}H]ラベルしたGDPを結合させ、その反応液に組み換えRASGEF1A蛋白を加えた後のGDP結合Rasをシンチレーションカウンターで測定した。Positive controlとして用いた、既知のRASGEF蛋白であるSOSがGDP結合K-RASを40%減少させたのに対し、RASGEFIAはそれを50%減少させた。同様にRASGEF1AはHa-RASとN-RASに対してもそれぞれ約40%と80%GDPを遊離した。以上からRASGEFlAが3種のRasに対してGDP遊離能を持つことが示された。

次に、活性型RasがRaf-1蛋白へのより高い親和性を持つことを利用して、組み換えRaf-1を使ったpull-down　assayを行った。RASGEF1Aを強制発現させたCOS7細胞(COS7-RASGEF1A)及びMock　vector組み込みCOS7細胞(COS7-Mock)からの抽出蛋白に対して実験した結果、RASGEF1A強制発現下でRaf-1結合Ras蛋白の量が有意に増加し、RASGEF1AがRasを活性化させたことが示された。

続いて、RASGEF1Aが高発現していることが確認されたSSP25胆管癌cell　lineに対してsiRNAの手法を用いてRASGEF1Aの発現を特異的に抑制したところ、細胞の増殖が有意に抑制され、RASGEF1Aの抑制が癌細胞の増殖抑制に重要であることが示唆された。

次にCOS7-RASGEF1A細胞とCOS7-Mock細胞を用いた、Wound-healing　assayを行った結果、COS7-RASGEF1A細胞はCOS7-Mock細胞に比較して明らかに早い遊走能を示した。更にMatrigelを用いた　Transwell　assayを行い浸潤に対する影響を検証したところ、Wound-healing　assayのデータと一致して、COS7-RASGEF1A細胞が有意に多く小孔を通じて移動した。COS7-RASGEF1A細胞、COS7-Mock細胞の増殖能が類似していた結果を考慮すると、RASGEF1Aが細胞の移動・浸潤にも重要な役割を果たしていると考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

肝内胆管癌は手術以外の有効な治療法がなく、その制圧には増殖・進展の分子機構を解明することが重要な課題である。申請者は、本研究において、肝内胆管癌で高発現する機能未知の遺伝子RASGEF1AをゲノムワイドなcDNA　microarrayを用いて見出した。RASGEF1AはRas活性化ドメインを持つことが配列より予測されたため、Rasの活性化に着目して肝内胆管癌の増殖・進展への関与を検討した。

正常なRas蛋白はGDP/GTP交換蛋白(GEF蛋白)の作用でGTP結合の活性型となり、その下流蛋白にシグナル伝達する。RASGEF1AのGEF蛋白としての作用をRas　activation　assayで検討した結果、RASGEF1AがK-RAS、H-RAS、N-RASに対するGDP/GTP交換能を有することが判明し、実際に細胞内のRasを活性化させた。

続いて、RASGEF1A高発現胆管癌細胞株に対してsiRNAでRASGEF1Aの発現を特異的に抑制すると細胞の増殖も抑制され、RASGEF1Aの増殖への関わりが示された。更にWound-healing assay、Transwell　assayの結果から、細胞の移動・浸潤にも関与する事が示唆された。

以上の研究は、肝内胆管癌で高発現のRASGEF1Aが増殖・浸潤に関与する分子であることを示し、肝内胆管癌の進展の分子機構の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成20年7月7日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降