

氏 名	なが お とし かず 長 尾 壽 和
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2637 号
学位授与の日付	平 成 15 年 7 月 23 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	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	MAGE-A4 Interacts with the Liver Oncoprotein Gankyrin and Suppresses Its Tumorigenic Activity (MAGE-A4蛋白は肝腫瘍蛋白ガンキリンと結合しその造腫瘍活性を抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 今 村 正 之 教 授 飯 塚 忠 彦

論 文 内 容 の 要 旨

肝癌は東南アジアおよび南アフリカにおいて最も一般的な悪性腫瘍に位置づけられている。治療の様式は様々であるが、再発と転移の比率は高く、その予後は満足のいくものではない。近年見い出されたがん遺伝子であるガンキリンは研究対象となったすべての肝癌において過剰発現しており薬物療法における格好の標的となりうる。ガンキリンは6個のアンキリンリピートをもち癌抑制遺伝子産物である網膜芽細胞腫蛋白 (Rb 蛋白), サイクリン依存性キナーゼである CDK4 および 26S プロチアソームの S6ATP アーゼと結合する。このうち Rb 蛋白との結合の結果、そのリン酸化および分解を促進し、CDK4 との結合では p16 や p18 といったアンキリンリピートをもつ癌抑制蛋白に拮抗する。

今回の研究では、ガンキリンの造腫瘍メカニズムのさらなる解析とこれを標的とする新たな治療法の可能性を検討した。酵母のツーハイブリッド法によるスクリーニングをおこなった結果、新たに結合蛋白として MAGE-A4 を同定した。この結合はガンキリンの全長と MAGE-A4 のカルボキシル末端にて生じ、COS7, NIH3T3 といった哺乳類細胞中においても再現可能であった。とくに U-20S 細胞中においては内在性の両蛋白の結合が認められた。また、両者の細胞内局在は細胞質で一致した。

元来、MAGE は主要組織適合抗原クラス I によって提示され、細胞傷害性 T 細胞によって認識されるペプチドの根源として同定された蛋白であり、構造的に類似した遺伝子群によりファミリーを構成している。その中でガンキリンとの結合は MAGE-A4 特異的であった。なぜなら MAGE-A1 や A2, A12 といった他の MAGE ファミリー蛋白はガンキリンに結合しなかったからである。一方、ガンキリンと Rb 蛋白、ガンキリンと S6ATP アーゼとの結合は MAGE-A4 の過剰発現によっても阻害されることはなかった。ガンキリンと MAGE-A4 の結合による生物学的効果の研究ため、テトラサイクリンによる蛋白発現誘導システムを利用した。これはドキシサイクリンにより MAGE-A4 を発現誘導する一方、ガンキリンは常時過剰発現するような NIH3T3 細胞のクローンによるものであった。この細胞を軟寒天中で生育させるとドキシサイクリンの含有により形成されるコロニー数が減少した。また免疫不全マウスに移植した際、ドキシサイクリン含有水を摂取していたグループの腫瘍形成速度は低下した。いずれも MAGE-A4 が誘導されないガンキリン常時過剰発現細胞では認められない現象であった。よって MAGE-A4 はガンキリン過剰発現細胞の足場非依存性増殖と免疫不全マウスにおける腫瘍形成の両方を一部抑制することが明らかとなった。さらに、種々の長さの MAGE-A4 変異体を使用したガンキリン過剰発現細胞でのコロニー形成実験からガンキリンと結合することのできない MAGE-A4 変異体は足場非依存性増殖の抑制能を欠くことが判明した。これらの結果から MAGE-A4 はガンキリンに結合しその造腫瘍活性を抑制すると考えられた。

これまで MAGE 蛋白に関する研究はその癌免疫療法における可能性に主として焦点があてられてきた。我々の結果は MAGE 蛋白のもつ新たな機能に暑光をあてうるものである。同時に肝癌発生、増殖の重要な因子であるガンキリンを標的とする治療法の開発の可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

肝臓癌において過剰発現しているがん遺伝子であるガンキリンはRb蛋白, CDK426SプロテアソームのS6ATPアーゼといった蛋白と結合する。

今回の研究ではガンキリンの造腫瘍メカニズムのさらなる究明とこれを標的とする新たな治療法の可能性を探究した。酵母ツーハイブリッド法により新たな結合蛋白としてMAGE-A4が同定された。同じMAGEファミリーでもA1などは結合せずA4の特異性が認められた。その局在が細胞質で一致した両者は哺乳類細胞中でも結合が確認された。MAGE-A4はガンキリンとRb蛋白, ガンキリンとS6ATPアーゼとの結合には影響を与えなかった。しかしガンキリン過剰発現細胞の足場非依存性増殖と免疫不全マウスにおける腫瘍形成の両方を一部抑制した。さらにMAGE-A4の変異体を使用した実験からガンキリンと結合することのできない変異体は足場非依存性増殖の抑制能を欠くことが判明した。これらの結果からMAGE-A4はガンキリンに結合しその造腫瘍活性を抑制すると考えられた。

以上の研究はMAGE蛋白のもつ新たな機能をあきらかにするとともに肝癌発生, 増殖の重要な因子であるガンキリンの機能解明に貢献し, これを標的とする治療法の開発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15年6月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。