HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Cancer Inducible Mechanism via Abnormal Nucleolar Formation by Overexpression of Protein Phosphatase PPM1D [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小境, 夕紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11916号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59002
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuuki_Kozakai_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（理学）　氏名　小 境 夕 紀

審査担当者
主 査 教 授　村 上 洋 太　（理学研究院）
副 査 教 授　坂 口 和 靖　（理学研究院）
副 査 教 授　藤 田 恭 之　（遺伝子病制御研究所）
副 査 教 授　高 木　睦　（工学研究院）
副 査 准教授　今 川 敏 明　（理学研究院）

学 位 論 文 題 名

Study on Cancer Inducible Mechanism via Abnormal Nucleolar Formation by Overexpression of Protein Phosphatase PPM1D
（脱リン酸化酵素 PPM1D 過剰発現による核小体形成異常を介した細胞癌化メカニズムに関する研究）

癌細胞では、リボソーム合成の中心的な核内構造体である核小体形成に異常が見られることが知られている。核小体および核質に局在する脱リン酸化酵素 PPM1D は、605 アミノ酸残基から構成され、N 末端の触媒ドメインおよびC 末端の調節ドメインを有している。正常細胞における PPM1D605 の機能の 1 つは、DNA 損傷に応答してリン酸化および活性化した p53 のネガティブフィードバック機構を介した細胞周期制御であることが報告されている。一方、乳癌を含む様々な癌細胞において、その遺伝子増幅および過剰発現、また、C 末端領域の遺伝子変異が見出されている。本論文では、*PPM1D* 遺伝子異常による癌細胞増殖に対する新規阻害法の開発および核小体形成メカニズムの解明を実施している。

本論文は、全五章で構成されている。

第一章では、癌細胞での形態的特徴や PPM1D ドメイン構造および癌細胞での遺伝子異常を示し、未知の核小体形成メカニズムや PPM1D を標的とした癌治療のための細胞癌化メカニズム解明の重要性について述べている。

第二章では、PPM1D 遺伝子異常の癌細胞に対する PPM1D 阻害剤の効果について述べている。HCT-116 は通常レベルの野生型 PPM1D605 と過剰発現した C 末端切断型 PPM1D を有している結腸腺癌由来の細胞である。HCT-116 での化合物添加による細胞生存率解析の結果、SPI-001 と Doxorubicin を共に添加した際、Doxorubicin 単独添加したときと比較して、細胞生存率を減少させることを明らかにした。また、Doxorubicin 単独添加と比較して、SPI-001 と Doxorubicin を共に添加した際、p53 のリン酸化レベルが顕著に増加し、p53 の下流のタンパク質で細胞周期停止に関与する p21 の量も増加した。これらより、C 末端欠損型 PPM1D が過剰発現している細胞では、化学療法剤による p53 の活性化を妨げられていると考えられる。一方、PPM1D 阻害剤の添加により、p53 が活性化するメカニズムが示唆された。

第三章では、乳癌由来 MCF7 細胞（PPM1D 過剰発現、p53 wt）において、PPM1D 阻害剤および PPM1D のノックダウンが核小体数の減少を誘導することを見出した。また、PPM1D の発現量が異なる 2 種の肺癌由来 H1299 細胞 clone（p53 null）において、PPM1D の発現量に依存した核小体数の変化が観察され、PPM1D 過剰発

現による核小体数の増加がp53には依存しないことが示唆された。また、PPM1Dの過剰発現が核小体のサイズも増加させることを明らかにした。

第四章では、PPM1Dの過剰発現が担う核小体数を制御する分子メカニズムを解明することを目的とし、MCF7におけるPPM1Dノックダウンが、核小体タンパク質NPMにおいてCDK1標的部位であるThr199およびPLK1標的部位であるSer4のリン酸化を減少させること、さらに、これらのリン酸化部位が核小体数の増加を誘導することを見出した。また、CDK1によるNPMのThr199のリン酸化が、PLK1によるNPMのSer4のリン酸化を著しく向上させることを示した。さらに、CDK1の活性化ホスファターゼであるCDC25Cは、独立した異なる経路でPPM1Dの過剰発現により活性化される可能性が示唆された。以上の結果より、PPM1D過剰発現によるCDC25C-CDK1-PLK1経路の活性化が引き起こすNPMのリン酸化機構および核小体数増加という新規細胞癌化モデルを提案した。

第五章では、本研究で得られた結果を総括し、PPM1Dを標的とした抗癌剤の開発、および分子機構が未知であった核小体形成機構解明への展開の可能性について述べている。

以上、本研究は、（1）切断型PPM1Dに対するPPM1D阻害剤の効果から、PPM1D阻害剤およびDoxorubicinの併用投与の有用性、（2）PPM1D過剰発現によるCDC25C-CDK1-PLK1カスケードを介したNPMのリン酸化、およびそれが誘導する核小体数の増加を介した新規細胞癌化モデルを提案している。これらは*PPM1D*遺伝子異常の癌細胞に対する新規治療法の開発、さらには核小体形成メカニズムの解明に大いに貢献することが期待される。関連原著論文は２編あり、英文で国際誌に掲載されている。

よって、審査員一同は、著者が、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。