［課程－２］

審査の結果の要旨

氏名　原田　真悠水

本研究はホルモン受容体（HR）陽性、HER2 陰性乳癌の治療薬として近年注目されている CDK4/6 阻害薬の作用機序に着目し、CDK4/6 阻害薬のひとつである Palbociclib が Activin-SMAD シグナルへ与える影響を解明することを目的として研究を開始し、下記の結果を得ている。

１．HR 陽性乳癌細胞株 T47D 細胞を用いた BrdU 及び EdU 細胞増殖アッセイ、Fucci 導入細胞による細胞周期アッセイを行い、Palbociclib と Activin が相加的に細胞増殖を抑制することを示した。

２．CDK4/6 がリン酸化する SMAD2 のアミノ酸残基についての検証では、Palbociclib の投与によって SMAD2 のリンカー領域 Ser255 のリン酸化が阻害され、その阻害効果は Rb のリン酸化阻害効果と同程度であることを示した。

３．ChIP シーケンシング（ChIP-Seq）による SMAD2 の結合領域に関する網羅的解析では、Palbociclib を投与することで SMAD2 の結合箇所が増加し、それぞれの結合箇所で SMAD2 の結合強度が増強することを示した。また、結合領域のモチーフ解析では Palbociclib 投与・非投与いずれにおいても FOX ファミリーが上位にあがり、HR 陽性乳癌において FOXA1 が結合するエンハンサー領域に SMAD 複合体が結合している可能性が考えられた。

４．RNA シーケンシング（RNA-Seq）による GSEA（gene set enrichment analysis）解析では、Palbociclib が TGF-β/Activin シグナルを増強することを示した。

５．ChIP-Seq による SMAD2 結合領域の解析と RNA-Seq による遺伝子発現プロファイリングデータを組み合わせ、Palbociclib が Activin-SMAD シグナルの増殖抑制作用を増強するうえで、SMAD2 の標的遺伝子として *CCNG2* が重要な役割を担っている可能性が推測された。

６．トリプルネガティブ乳癌細胞株 Hs578T 細胞においても Palbociclib が SMAD2 の結合強度を増強することを示した。

７．T47D 細胞、Hs578T 細胞いずれの細胞株でも腫瘍促進作用への影響は明らかではなかったが、EMT 関連遺伝子 *SNAI1*、*ZEB1* において Palbociclib 投与により SMAD2 の結合強度が増強され、EMT を促進する可能性も考慮すべきと考えられた。

以上、本論文は Palbociclib が Activin-SMAD シグナルの細胞増殖抑制作用を増強することを明らかにし、さらに EMT への影響について言及した。Palbociclib の新たな作用機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。