

## 審査の結果の要旨

氏名 金森 茜

本研究において、膵癌細胞による実験から、Mint3 は膵癌において FIIH-1 の抑制を介して HIF-1 を活性化し、SKP2 の発現を促進することで EMT や、幹細胞性、抗がん剤抵抗性を引き起こすことを明らかにした。また、マウスモデル実験から Mint3 は造腫瘍能に関与することを明らかにし、Mint3 が膵癌治療の標的としての可能性を示した。

本論文は *in vitro* および *in vitro* の解析において Mint3 の膵癌における重要性について展開させている。

*In vitro* の解析においては、3 種類の膵癌細胞において Mint3 ノックダウン細胞の細胞増殖が低下することを示しており、その原因が G0/G1 期の細胞周期停止を引き起こしていることを示した。また細胞周期関連タンパク質を詳細に調べ、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 と p27 タンパクが増加していることが明らかにしている。p21 と p27 の mRNA 発現に変動は認められないことから、タンパクレベルで p21 と p27 を制御する因子を調べ、ユビキチンリガーゼ SKP2 が Mint3 ノックダウン細胞で mRNA、タンパク共に低下することが明らかにしている。Mint3 が SKP2 の発現促進する経路については、Mint3 が FIIH-1 抑制を介して HIF-1 活性を増加させると報告されていることから、さまざまなノックダウンや発現実験により検証し Mint3 が FIIH-1 抑制を介して HIF-1 活性化し、その結果 SKP2 の発現を増加させることを示した。また、Mint3 や HIF-1 $\alpha$  ノックダウンにより SKP2 のプロモーター活性が低下することから、HIF-1 が SKP2 の制御に関わることを示唆している。

*In vitro* の解析においては、さらに Mint3 の膵癌悪性化における機能について検証している。申請者は Mint3 ノックダウンにより、Slug、N-cadherin、Vimentin など一部の EMT マーカーのタンパクが低下することを示し、Mint3 が HIF-1-SKP2 の経路で EMT に関わることを明らかにしている。N-cadherin や Vimentin は Mint3 ノックダウンで mRNA も低下し、Slug はタンパクのみ低下していた。SKP2 はタンパクの安定化にも関わることから、申請者は Slug が SKP2 の直接のターゲットであるか調べ、タンパク安定化に関わる K63 を介するユビキチン化が Mint3 ノックダウンにより低下することから、Mint3 が SKP2 を介して Slug の安定化に関わることを示唆している。さらに EMT は癌細胞の幹細胞性や抗がん剤感受性に関わることから、スフィア形成能を調べ、Mint3 ノックダウンにより低下することを示した。ま

た、膵癌治療に用いられる抗がん剤の感受性を調べ、Mint3 が抗がん剤抵抗性に関わることを明らかにした。また、Mint3 は HIF-1 $\alpha$  と SKP2 を介して EMT、幹細胞性、抗がん剤抵抗性に関わることを明らかにした。Mint3 は癌細胞でのみ HIF-1 を活性化することから、実際に正常な膵臓腺房細胞を用いて Mint3 をノックダウンしても SKP2 や p21、p27 のタンパクに変動は見られないことを示した。

In vivo における解析では免疫不全マウスにヒト膵癌細胞を同所移植して行い、Mint3 ノックダウン移植群ではコントロール細胞移植群に比べて有意に腫瘍の重量が低下することを明らかにした。さらに、その切片の解析では in vitro の解析と一致して、Mint3 ノックダウンの切片において SKP2 の低下と p21 と p27 の増加が認められた。また、一部の EMT マーカーについても低下が認められた。さらに Mint3 が膵癌治療の標的となるか調べるために、Gemcitabine と Paclitaxel 共投与において検証を行った。その結果、Mint3 ノックダウン細胞移植群に抗がん剤投与したときの膵臓重量は、マトリジェルのみ投与群と同程度になっており、マウス実験においても Mint3 ノックダウンにより抗がん剤感受性が向上することを明らかにした。最後に、データベース解析から、ヒト膵癌において Mint3 が高いほどに予後不良であることを示した。

In vitro、in vivo における解析から、膵癌において Mint3 は HIF-1 を介して SKP2 を制御し、細胞周期停止を引き起こすとともに、EMT マーカーの一つである Slug タンパクの安定化に関わることを示された。その結果、Mint3 は膵癌の抗がん剤抵抗性に関わっており、また正常細胞では SKP2 の制御に関わらないことから、Mint3 は膵癌の治療標的になりうることを示唆された。

本論文は申請者が主体となって分析および検証を行ったもので、申請者の寄与は十分であると判断する。

よって本論文は博士（科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 2000 字