

# 論文審査の結果の要旨

氏名 成島 悠太

本論文は4章から成り、第1章は序論、第2章は本研究で用いられた材料及び実験・解析手法、第3章は膠芽腫幹細胞の分化誘導における定量リン酸化プロテオーム解析及びその解析結果から抽出された分化誘導関連因子の細胞生物学的検証結果、第4章は考察及び結論で構成される。

第1章では、研究対象である膠芽腫幹細胞の背景及び本研究で用いられた定量リン酸化プロテオミクスの技術背景が述べられている。

膠芽腫は原発性脳腫瘍の一つであり、診断後の平均生存期間は約1年と短く、その治療成績は現在もなお改善されていない。しかしながら、近年のがん研究の進展により、自己複製能・多分化能を示し、従来の放射線療法及び化学療法に耐性を有するがん幹細胞の存在がその治療抵抗性に大きく寄与していることが明らかとなっている。膠芽腫幹細胞において、その腫瘍形成能や各種療法に対する耐性は分化により減弱することが報告されていることから、幹細胞性の制御に関する詳細なメカニズムの解明が希求されている。

細胞内シグナル伝達系において、タンパク質リン酸化は細胞の運命決定に重要な役割を担っている。膠芽腫幹細胞に関しても個々の細胞内シグナル伝達系におけるリン酸化の関与が報告されているが、その制御ネットワークの全体像は未解明である。そこで本研究では、分化誘導において重要なリン酸化関連因子を包括的に明らかにするために、膠芽腫患者組織から単離及び樹立されたがん幹細胞株であるGB2細胞について、幹細胞性が維持された細胞と分化が誘導された細胞の高精度比較定量リン酸化プロテオーム解析を行った。

第2章では本研究で用いた材料と方法について述べられており、GB2細胞の培養及び分化に関する実験手法、定量リン酸化プロテオーム解析に供する分析サンプルの調製法、高感度質量分析によるリン酸化タンパク質の同定及び定量解析、定量リン酸化プロテオームデータに基づくバイオインフォマティクス解析、抽出された分化関連因子に関する細胞生物学的検証法で構成されている。

第3章では血清を用いた膠芽腫幹細胞の分化誘導に関する定量リン酸化プロテオーム解析、分化誘導によりリン酸化が変動したタンパク質群に関するバイオインフォマティクス解析、同定された分化誘導関連因子に関する細胞生物学的検証の結果について述べられている。

論文提出者は膠芽腫幹細胞株であるGB2細胞について血清培地を用いた分化誘導における定量リン酸化プロテオーム解析を行い、1,139種類のリン酸化タンパク質の中で419種類

のタンパク質のリン酸化が分化誘導により 2 倍以上変動していることを明らかにした。分化誘導によりリン酸化が変動したタンパク質群に関して多角的なバイオインフォマティクス解析を行い、膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持に関わる鍵因子の抽出を試みた。KeyMolnet 及び Ingenuity Pathway Analysis (IPA)によるネットワーク解析を行った結果、細胞骨格系に関わる Intermediate filament 及び Rho family GTPases シグナルが分化誘導と有意に関連することが示された。さらに、PhosphoSiteAnalyzer を用いた上流キナーゼ予測解析からは TGF-beta receptor type-2 (TGFBR2)、IPA を用いた上流制御因子解析からは TGFBR2 のリガンドである TGF- $\beta$ が分化誘導におけるリン酸化の変動と最も有意に関連していることが示された。分化誘導との関連が示唆された TGFBR2 について TGFBR1/2 二重阻害剤を用いた細胞生物学的検証を行った結果、スフィアアッセイにおいて自己複製能の亢進が見られ、Western blot においては分化誘導時に幹細胞マーカーの発現量上昇及び分化マーカーの発現量低下が見られた。一方、TGFBR1 阻害剤を用いた場合では DMSO 添加時と比べて変化が見られないことから、TGFBR2 の活性が膠芽腫幹細胞の分化誘導における幹細胞性の制御に関与していることが示されている。

第 4 章では本研究において膠芽腫幹細胞分化との有意な関連が示されたシグナル伝達経路及びその関連因子群についての考察と結論が述べられている。

本研究は分化誘導における膠芽腫幹細胞のリン酸化シグナルに関する変動を包括的に解析し、さらに多角的なバイオインフォマティクス解析を行うことで分化に重要なパスウェイ及び分子を統計科学的に導出する新規の方法論を提示しており、膠芽腫幹細胞のリン酸化ネットワークを標的とした治療法の開発に向けて新たな道筋を与えるものと考えられる。

なお、本論文は、秦裕子、那須亮、津本浩平、井上純一郎、秋山徹、尾山大明との共同研究であるが、論文提出者が主体となって検証したもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。

以上 1,840 字