

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 馬 艶霞

本研究は転写因子 Krüppel like factor 15 (KLF15) のヒト乳癌細胞増殖における意義を明らかにすることを、KLF15 と相互作用する分子に着目して、培養癌細胞、マウスを用いて試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 質量分析法により、すでに KLF15 と相互作用することが知られている p300 を含む 11 種類の KLF15 結合タンパク質候補分子を得た。そのうち、近年各種の腫瘍の増殖に参与することが注目されている PKM2 に焦点をあてた。

2. MCF-7 などの乳癌細胞を用いて免疫沈降により KLF15 と PKM2 の相互作用を検討したところ、いずれの細胞においても、また、ホルモン非依存性にかかる相互作用が観察された。

3. これらの細胞間で KLF15 mRNA およびタンパク質レベルには差があったが、PKM2 の発現量は同程度であった。KLF15 と PKM2 の細胞内局在を免疫組織化学的に検討したところ、KLF15 は核内、PKM2 は核と細胞質の両方、で観察された。かかる細胞内局在の結果は細胞を細胞質と核分画に分けて行ったウエスタンブロット法によっても確認された。

4. KLF15 と PKM2 の相互作用に参与する領域をドメイン欠失解析によって検討した結果、PKM2 の N 末端から 377 番目のアミノ酸配列、および、KLF15 の N 末端領域の 45 から 351 番目のアミノ酸配列、が必須であることが示された。 β カテニン依存性レポーター遺伝子の発現は PKM2 によって亢進し、KLF15 はそれを抑制する。N 末端領域の 45 から 351 番目のアミノ酸配列を欠失した KLF15 にはその抑制作用はなかった。

5. 乳癌細胞の増殖に対する KLF15 と PKM2 の効果を検討するために、KLF15、PKM2、いずれかの cDNA ないし shRNA を安定的に導入した MCF-7 細胞株を樹立した。PKM2/ β -catenin 下流因子 (c-Myc の、PTBP1)、および細胞周期調節因子 (MCM2 及び CDK2) は、KLF15 過剰発現と PKM2 ノックダウン細胞では減少し、KLF15 ノック

クダウンないし PKM2 過剰発現では増強されていた。

6. 5 で作成した MCF7 細胞株の細胞周期分布を検討した。KLF15 過剰発現または PKM2 ノックダウン細胞では、KLF15 ノックダウンまたは PKM2 過剰発現細胞に比較して、G2/M 期への移行が阻止されて G0/G1/S 期の割合が増加していた。
7. これらの細胞株を用いた wound-healing assay では、「創傷治癒速度」は、KLF15 過剰発現または PKM2 ノックダウン細胞で減少、KLF15 ノックダウンまたは PKM2 過剰発現細胞では増加した。
8. これらの細胞株を NOD-SCID マウスに移植し、腫瘍体積・質量を測定したところ、KLF15 過剰発現または PKM2 ノックダウン細胞で減少、KLF15 ノックダウンまたは PKM2 過剰発現細胞では増加した。
9. 乳癌患者から採取された病理組織標本を用いて KLF15 と PKM2 の免疫組織学的分析を行った。やはり、KLF15 は核に、PKM2 は核と細胞質いずれにも存在する傾向が確認された。KLF15 の発現量と PKM2 の発現量の間には負の相関があることが示唆された。

以上、本論文は KLF15 が、少なくとも一部は PKM2 との相互作用を介して、乳癌細胞の増殖に抑制的に働くことをはじめて示した。今後、乳癌をはじめとした腫瘍増殖のメカニズムの解明や新しい治療法の開発に貢献する可能性があると考えられ、学位の授与に値するものと考えられた。