

スチャダ ピムセン氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Suppression of GANP causes DNA damage and cell death in p53-insufficient cholangiocarcinoma cells
(p53不活性型胆管癌細胞においてGANP発現抑制はDNA障害と細胞死を引き起こす)

胆管癌は、その発生機序に炎症等が関わり、しばしば p53 の変異に関連する DNA 障害を伴い、悪性度も高いことが知られている。近年、胚中心 B 細胞において免疫グロブリン遺伝子 V 領域の体細胞突然変異に関わる GANP (germinal center-associated nuclear protein) の発現異常が胆管癌で認められ、また GANP の発現上昇は胆管癌の悪性度と相関すると報告されている。このため、ヒト胆管癌細胞株および GANP siRNA (si Ganp) を用いて、GANP ノックダウンの効果を検討した。さらに、si Ganp が誘導する細胞死に着目し、GANP ノックダウンが p53 変異型腫瘍において細胞増殖抑制効果を示すことを解析した。

方法として、コンケン大学 (タイ) で樹立された胆管癌患者由来の 4 種類の細胞株 (KKU100、M156、M213、M214)、正常胆管細胞株 MMNK-1、子宮頸癌細胞株 HeLa を用いて、si Ganp 処理後の細胞周期、細胞死および DNA 障害の誘導について解析した。さらに、免疫不全マウスに si Ganp で処理した M213 を移植し、*in vivo*での腫瘍増殖能を検討した。

結果として、si Ganp 処理により、3 種類の胆管癌細胞 (M156、M213、M214) と HeLa において是有意な細胞死の誘導が見られた。しかし、野生型 p53 を発現する KKU100 と MMNK-1 では細胞死がほとんど誘導されなかったことから、この違いは p53 の機能に依る可能性が考えられた。実際に、MMNK-1 で p53 をノックダウンすると細胞死の誘導を認めた。次に si Ganp 処理後に細胞周期を解析したところ、S 期の減少と G2/M 期の集積がおり、DNA 障害が誘導されたことが分かった。si Ganp 処理した M213 と HeLa 細胞において、ミトコンドリア膜電位の変化、カスパーゼの活性化とその基質 PARP-1 の切断を認め、アポトーシスが誘導された。しかし、カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk の前処理を加えても細胞死が完全に抑制されないことから、一部にカスパーゼ非依存的細胞死があると考えられた。電子顕微鏡ではアポトーシスとネクローシスの両者が認められた。Balb/c-Rag2/Jak3 KO マウスを用いて細胞移植実験を行い、対照と比較して、si Ganp 処理した M213 細胞の腫瘍形成は遅延し、si Ganp が癌細胞の増殖抑制効果をもつことが示された。

審査において、(1) 正常組織での GANP の発現、(2) GANP ノックダウンと細胞周期の変化、(3) GANP ノックダウンで誘導される DNA 障害の実体、(4) 移植後の GANP ノックダウンの持続性、(5) カスパーゼ依存性及び非依存性の細胞死、(6) GANP 阻害剤の治療的応用の可能性、(7) 癌での GANP の発現異常、(8) 胆管癌のステージとの関連性、(9) GANP の生理機能、(10) si Ganp の特異性、(11) p53 欠失変異体の機能の有無、(12) GANP と p53 の機能的関連性、などについて質問が出され、発表者からは概ね適切な答えと討論がなされた。

本論文は、p53 機能不全の癌細胞で、GANP が DNA 障害と細胞死を抑制することに関わる可能性を明らかにしたものであり、GANP の阻害が p53 変異型腫瘍に対する新たな治療的アプローチになり得ることを示唆した点で高く評価する。

審査委員長 細胞医学担当教授

中尾 光善