

学位論文抄録

融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内発現抑制を介した異常シグナル分子群の解析

(Analysis of abnormal cellular signals via silencing of NF1 tumor suppressor protein in neuronal cells by integrated proteomics)

平山 未央

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腫瘍医学

指導教員

荒木 令江 准教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻腫瘍医学

学位論文抄録

【目的】神経線維腫症 I 型 (NF1) は、多発性神経線維腫や色素斑を始め多彩な病態を呈す常染色体優性遺伝性疾患である。NF1 の原因遺伝子産物 Neurofibromin は Ras-GAP 相同領域を有しており、その機能欠損による Ras を介した細胞内シグナル伝達異常は、神経系細胞の増殖と分化異常を誘発し、更に腫瘍化など NF1 の重篤な病態に関わるとされている。しかしながら、Ras-GAP の機能のみでは NF1 の多様な病態を説明できないため、NF1 の病態発症機構は未だ不明な点が多く、本疾患の根治療法は存在しない。本研究では、NF1 病態モデル PC12 細胞を用いて、独自の融合的 mRNA/タンパク質網羅的発現解析(融合プロテオミクス)を行うことで Neurofibromin の細胞内機能とその欠損による神経系細胞異常分化・増殖機構の解明を目的とした。

【方法】神経系モデル細胞である PC12 細胞に RNA 干渉法によって NF1 遺伝子発現を抑制した NF1 病態モデルを作成した。本モデルを用いて、神経成長因子(NGF)添加による神経細胞様分化過程における経時的遺伝子およびタンパク質の発現変動を、DNA array 法、蛍光標識二次元ディファレンシャル電気泳動法(2D-DIGE)、および iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 法を用いて網羅的に解析した。得られた全データを iPEACH によって統合し、コントロール細胞と比べて NF1 病態モデル細胞において発現変動している分子群の抽出を行い、分子間ネットワーク解析を行った。抽出したシグナルの構成因子に対し、NF1 欠損細胞における挙動の検証と表現型に対する影響を解析した。

【結果】NF1 病態モデル細胞では神経突起の伸長阻害という特徴的な表現型が見られ、また細胞運動の亢進が観察された。融合プロテオミクス解析によって定量的に同定された 3198 分子群から、NF1 siRNA 処理によって有意に発現上昇した分子をネットワーク解析した結果、Dynein IC2、GR、COX-1 の発現変動を含む一連のシグナルネットワークが検出され、これらの分子相互作用が重要であることが推測された。次に NF1 病態モデル細胞において Dynein IC2、GR、COX-1 の発現亢進をウエスタンブロット法で確認し、GR アンタゴニスト、Dynein IC2 siRNA、COX-1 siRNA により本経路の構成分子の発現や機能を阻害したところ、Dynein IC2 が GR の核輸送に関与しており、核移行した GR が転写因子として機能する結果、COX-1 の転写が誘導されていることが判明した。さらに、NF1 欠損 PC12 細胞において本経路の最下流因子である COX-1 の発現を抑制したところ、神経突起伸長阻害が回復し、分化異常が正常化することが判明した。

【考察】本研究では、NF1 ノックダウンに伴う神経系細胞分化異常に連動して変動する分子群の挙動を明らかにした。NF1 欠損 PC12 細胞で上昇していた Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの慢性的な亢進は、プロスタグランジン産生を増大することで、神経線維腫症 I 型に特徴的な神経系細胞の分化や増殖の異常を誘発している可能性が示唆された。

【結論】NF1 病態モデル細胞において特異的に亢進する新規分子ネットワークを融合プロテオミクス法によって発見し、NF1 病態発症メカニズムの一旦を明らかにした。本発見は、治療法のない本疾患における新規の治療法開発や創薬に貢献できるものと考えられる。