







## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 593 号	氏名	一万田 充洋
審査委員会委員	主査氏名	濱田 文彦	
	副査氏名	白尾 国昭	
	副査氏名	松尾 哲孝	
論文題目 Downregulation of DUSP4 enhances cell proliferation and invasiveness in colorectal carcinomas (DUSP4 の発現低下は大腸癌における細胞増殖および浸潤を増強する) 論文掲載雑誌名 Cancer Science 目的 Dual-specificity protein phosphatases 4 (DUSP4) は、Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路において活性化された ERK (extracellular signal-regulated kinase) を脱リン酸化によって不活化する制御分子である。本研究では大腸癌組織における DUSP4 の発現パターンとその意義を明らかにすることを目的とした。 研究対象および方法 1) 正常大腸上皮細胞と Cancer Cell Line Encyclopedia の DUSP4 発現データに基づいて選んだ 8 種類の大腸癌細胞株について、RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 法および Western blotting 法で DUSP4 の発現レベルと ERK の活性化レベルを調べ、DUSP4 の発現低下と ERK の活性化亢進を示した 2 種類の大腸癌細胞株にレンチウイルスを用いて DUSP4 あるいは恒常的活性化型変異をもつ ERK2 の発現誘導を行い、増殖能および浸潤能への影響を観察した。また MEK (MAPK/ERK kinase) 阻害薬による MAPK 経路の不活化が細胞の増殖・浸潤へ与える影響も観察した。 2) 大腸癌 59 例の切除標本を用いて、免疫組織化学法および Western blotting 法によって DUSP4 の発現と ERK の活性化を調べた。癌部の浅部領域 (粘膜筋板より粘膜側) と深部領域 (粘膜筋板より漿膜側) における DUSP4 の発現強度と発現陽性細胞の割合をスコア化した。 結果 1) DUSP4 の導入により、大腸癌細胞株の増殖能および浸潤能が有意に抑制され、その抑制は恒常的活性化型変異 ERK2 の導入によりキャンセルされた。MEK 阻害薬も同様の抑制効果を示した。 2) DUSP4 スコア (intensity 0-3 + population 0-3 = 最大 6 点) は非癌部粘膜で $2.8 \pm 1.5$ 、浅部領域で $5.0 \pm 1.4$ 、深部領域で $2.5 \pm 1.6$ であった。大腸癌組織において DUSP4 は浅部領域で強く発現し、深部領域で弱く発現していた。ERK の活性化レベルはこれと逆相関関係にあった。 結論 大腸癌において、DUSP4 の発現低下とこれに伴う ERK の活性化が、その増殖能および浸潤能の獲得に関与していることを明らかにした。 本研究は大腸癌の増殖、浸潤の過程における DUSP4 の発現低下とこれに伴う ERK の活性化の役割および MEK 阻害剤を基盤とした化学療法的重要性を示した意義のある成果である。よって、審査委員会は本論文が学位論文として適切であると判断した。			

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 ① 課・論	第593号	氏名	一万田 充 洋
審査委員会委員	主査氏名	濱 田 文 彦	
	副査氏名	白尾 国 昭	
	副査氏名	松尾 哲 孝	

学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

- ① 大腸癌において、MEK, ERK などの constitutive active 変異などの報告はあるか？
- ② DUSP4 の発現に組織特異性等はあるか？
- ③ 正常細胞における DUSP4 の発現レベルや機能についての知見はあるか？
- ④ ERK を脱リン酸化する分子は DUSP4 だけか？他にも働く分子が存在するか？
- ⑤ Cancer Cell Line Encyclopedia で大腸癌株 2 種を選択しているが、その際の選択基準は何か？どのような結果を期待して、どのような株を選択したのか？他の細胞株との比較は？
- ⑥ 大腸癌細胞株を 5-aza-dc 処理することによって DUSP4 の発現が 2~3 倍程度になっているが、これは意味がないあるいは誤差範囲と解釈するべきか？
- ⑦ 大腸癌細胞株において DUSP4 の発現が減少している原因は DNA のメチル化以外にどのようなことが考えられるか？
- ⑧ 遺伝子発現が抑制されるメカニズムとして、エピジェネティックな変化、ジェネティックな変化、あるいは miRNA など様々なものが考えられるが、どのメカニズムによるものが最も起こりやすいか？あるいは遺伝子発現の制御に要する時間が短いか？
- ⑨ ERK2 mutation が恒常的活性型になるしくみはどうなっているのか？
- ⑩ ERK 活性の程度により DUSP4 の発現が制御されるとのことであるが、この negative feedback が RAS-MAPK 経路の下流において特に著しいという報告があるか？
- ⑪ 臨床試験において大腸癌は MEK 阻害剤に不応であることが報告されたとのことであるが、これを RAS-MAPK 経路の negative feedback 機構によって説明できるか？
- ⑫ MEK 阻害剤が大腸癌に対して無効であったとする臨床試験結果は、自然耐性を示したもののか、獲得耐性を示したもののか、推測可能か？
- ⑬ DUSP4 の癌細胞に対する役割はどうなっていると考えているか？
- ⑭ 大腸癌病変の浅部領域と深部領域での DUSP4 の発現の違いは、予想されたものであったか？その違いは何を意味しているか？これまでの臨床病理学的検討結果との差は？
- ⑮ DUSP4 抗体と pERK 抗体を用いた二重染色が最も欲しいデータだが、今後 pERK 抗体を用いた染色を可能にするために考えられる対策は？

これらの質問に対して、申請者は概ね適切に回答した。審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。