

学位論文題名

TRIM40はIKK γ のNedd8化を促進しNF- κ B活性を抑制することで腸管の炎症・癌化を抑制する

学位論文内容の要旨

【背景と目的】消化管癌ではNF- κ B活性が恒常的に活性化している例が多く、持続的なNF- κ Bの活性化による増殖、慢性炎症が発癌に関与している可能性が示唆されている。NF- κ Bの活性化はリン酸化、ユビキチン化及びnedd8化等のいくつかの翻訳後修飾によって調整されている。本研究において、我々は消化管に特異的に発現している新規NF- κ B制御タンパク質としてTRIM40を同定した。さらに、TRIM40が消化管の慢性炎症や癌において、いかなる発現変動をしているかを検討した。

【材料と方法】遺伝子発現データベース (BioGPS) において消化管に特異的に発現しているTRIMファミリータンパク質を検索し、TRIM40を同定した。TRIM40の相補的DNAを作成しイーストツーハイブリット法にてTRIM40と相互作用するタンパク質を検索した。TRIM40の変異体、タンパク質及び抗体などを作成し、哺乳類細胞株を使用してウエスタンブロット法、ルシフェラーゼアッセイ、免疫染色法及びノックダウン法などの生化学的解析にてTRIM40の分子生物学的機能を解析した。消化管疾患との関連を検討するために、同分子の発現量を当科で手術施行された消化器疾患の検体の正常部・病変部(胃癌13例、大腸癌3例、大腸腫瘍1例、直腸癌4例、クローン病1例の合計22例)を用いて定量性real-time PCRにて解析した。

【結果】TRIM40は腸管に強く発現していた。イーストツーハイブリット法にてTRIM40と関連するタンパク質としてNedd8を同定した。哺乳類細胞株にてTRIM40とNedd8が結合することを確認した。SCF複合体を形成するCullin1がNedd8化されることによりNF- κ B活性の調節に関わっていることからTRIM40がNF- κ B活性に関与するかどうかをルシフェラーゼ測定によって検索したところ、TRIM40がNF- κ B活性を抑制していた。同時にRINGドメインを欠損させたTRIM40変異体を作成しNF- κ B活性を測定したところ、この変異体では抑制していなかった。よってTRIM40はRINGドメイン依存性にNF- κ B活性を抑制していた。TRIM40がNF- κ B活性を抑制する機序を解析するためにTNF α 負荷時のp65の核内移行の免疫染色を行ったところ、TRIM40はp65の核内移行を抑制していた。TRIM40はNF- κ Bカスケードにおいて核内移行前に関与していると考えI κ B α との関与を解析したところ、TRIM40はI κ B α のリン酸化を抑制していた。次に、I κ B α のリン酸化を調整しているIKK複合体とTRIM40の関与を解析したところ、TRIM40はIKK複合体と結合した。また、TRIM40はIKK γ のNedd8化を促進していた。また、TRIM40のRINGドメイン欠損変異体ではIKK複合体と結合するが、IKK γ のNedd8化は促進していなかった。TRIM40はRINGドメイン依存性にIKK γ をNedd8化することでNF- κ B活性を抑制していた。次にTRIM40が強く発現している細胞株IEC-6にてTRIM40をノックダウンしたところ、NF- κ B活性と細胞増殖の促進を認めた。さらに、TRIM40が腸管での正常状態の増殖や癌化に関与しているのであれば、臨床検体において病変部と非病変部のTRIM40

の発現量に変動あると考え定量性 real-time PCT を施行した。胃癌 13 例中 13 例 (100%)、大腸癌 3 例中 3 例 (100%)、直腸癌 4 例中 3 例 (75%)、大腸腺腫 1 例中 0 例 (0%) 及びクローン病 1 例中 1 例 (100%) の合計 22 例中 20 例 (90.9%) の病変部において、TRIM40 が正常部と比較にて有意に低発現していることが判明した。

【考察】TRIM40 は RING ドメイン依存性に IKK γ を Nedd8 化することにより NF- κ B 活性を抑制していた。IKK γ は、非タンパク質分解リシン 63 (K63) のポリユビキチン化や N 末端の直鎖ユビキチン化によって NF- κ B 活性を促進しているとの報告がある。TRIM40 は IKK γ を Nedd8 化を促進することで、NF- κ B 活性を抑制していると考えた。腸管には常在細菌叢があり、これらの細菌は非自己であるのに腸管において免疫寛容があり常在細菌叢に対する免疫反応は普段起こっていない。また、ヘリコバクターピロリや潰瘍性大腸炎のような慢性炎症が癌化に関与しているとの報告がある。さらに NF- κ B 活性は炎症と癌化に対して重要な役割を果たしており、TRIM40 が、正常状態の腸管において強く発現することで NF- κ B 活性と抑制することで TNF α 、IL-6、IL-1 及び IL-8 等の炎症性サイトカインを抑制的調整し腸管の免疫寛容、また、腸管上皮細胞の増殖・癌化に対して重要な役割を担っている可能性が考えられた。

近年、NF- κ B は癌や免疫抑制の標的として注目を集めており、IKK β 抑制剤である MLN120B が多発性骨髄腫細胞株の増殖を抑制したとの報告や NF- κ B 抑制剤である dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) が同種移植後の拒絶反応に有効であったとの報告がある。さらに、ユビキチン-プロテアソーム抑制剤である Bortemib が、I κ B の分解を抑制し NF- κ B 活性を抑制することで多発性骨髄腫の増殖抑制に有効であり臨床応用されている。また、Nedd8 活性化酵素抑制剤である MLN4924 が cullin-RING リガーゼを抑制することでヒト腫瘍細胞株の増殖抑制に有効であったとの報告もある。よって TRIM40 のさらなる分子生物学機序の解明により TRIM40 が腸管の炎症・癌化の治療の標的になりうると思った。

【結論】TRIM40 は NF- κ B 活性を介して腸管上皮細胞の炎症・増殖において重要な役割を担っている可能性が高く、消化管における TRIM40 のさらなる解析により、炎症性腸疾患や消化管癌の予防、診断及び治療に寄与する知見が得られると考える。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	松本	美佐子
副査	教授	畠山	鎮次
副査	教授	野口	昌幸
副査	准教授	神山	俊哉

学位論文題名

TRIM40はIKK γ のNedd8化を促進しNF- κ B活性を抑制することで腸管の炎症・癌化を抑制する

転写因子 NF- κ B の活性化は、細胞増殖・癌化・炎症・抗アポトーシスなどと密接に関連している。本研究は、RING フィンガードメインを有する TRIM ファミリータンパク質のなかで機能未知であった TRIM40 の解析を行い、マウスにおいて、正常胃・小腸及び大腸に高発現していること、ユビキチン様タンパク質である Nedd8 と結合することを明らかにした。TRIM40 は、NF- κ B シグナル伝達経路において IKK 複合体 (IKK α , β , γ) と相互作用して IKK γ の Nedd8 化を促進し、I κ B α の分解、p65 の核移行を抑制することで NF- κ B 活性を負に制御することを明らかにした。また、内在性 TRIM40 のノックダウンにより TNF- α 刺激による NF- κ B の活性化が増強されることを示した。さらに、ヒト消化器疾患において病変部で TRIM40 の発現が優位に減少することを明らかにし、腸管の抗炎症作用と癌化制御に TRIM40 による NF- κ B 活性化制御の重要性が示唆された。

審査会において、副査の野口教授から、Nedd8 の発現分布、内在性 Nedd8 と TRIM40 の結合について質問を受け、Nedd8 は組織、細胞に広く発現していること、TRIM40 に対する高感度の抗体がないため内在性の TRIM40 と Nedd8 の結合は確認できておらず、現在抗体作製を行っている」と述べた。副査の畠山教授より、TRIM40 による p53 など他のタンパク質の Nedd8 化の可能性について質問を受け、TRIM40 と p53 は相互作用しないことを実験的に確かめたと返答した。また、TRIM40 のシーズとしての可能性についての質問に対し、腸管疾患の診断・予防のバイオマーカーとしての可能性を述べた。主査の松本准教授より、TRIM40 の細胞内局在と TRIM40 による IKK 複合体の活性制御メカニズムについて質問を受け、TRIM40 は核と細胞質の両方に局在すること、IKK γ の Nedd8 化とユビキチン化の関係は明らかでないと述べた。また、TRIM40 の腸管特異的発現と腸内細菌による炎症誘発制御の関連について質問され、TRIM40 が炎症制御に重要であるとの考えを述べた。最後に副査の神山教授から、臨床検体における TRIM40 の発現低下の理由について質問を受け、炎症刺激によるとの見解を示した。さらに臨床でバイオマーカーとして用いる場合の問題点について質問がなされ、TRIM40 の簡便で感度の高い検出法

を考案する必要があると回答した。申請者はすべての質問に対してその主旨を理解し、自らの研究内容と文献的考察を交えて適切に回答した。

この論文は、TRIM40 が消化管特異的に発現し、NF- κ B 活性化経路において、TRIM40 による IKK γ の Nedd8 化という既知の制御メカニズムと異なる新たな制御機構が存在することを明らかにし、腸管の炎症・癌化の抑制との関連性を示唆した点で高く評価された。今後は TRIM40 の機能の更なる解明と、臨床における TRIM40 の発現量と炎症・癌化との関連性、バイオマーカーとしての可能性の検討が期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。