

**論 文 審 査 の 要 旨**

筆頭著者（学位申請者）氏名

原 雅樹

主論文の題目  
および

掲載誌・審査委員

題 目 Calcitonin Gene-related Peptide Inhibits Tumor Cell Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells Through the Ras/MEK/ERK Pathway (カルシトニン遺伝子関連ペプチドはRas/MEK/ERK経路を介して肝細胞癌細胞株の細胞増殖を抑制する)

掲載誌 Journal of St. Marianna University 2015;6:263-272

主査 太田 智彦

副査 松井 宏晃

副査 高田 礼子

[論文の要旨・価値] 肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC) には化学療法を含む集学的治療が施行されるが、現状では効果が十分とは言えず、依然として予後不良であり、新規薬剤の登場が期待される。本研究では最近抗腫瘍活性が注目されている神経ペプチドの1つである Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) とその関連タンパク質の HCC における発現と、抗腫瘍活性のメカニズムについて解析している。正常肝組織、HCC 余剰検体、および HCC 由来細胞株 Huh7 と HepG2 を用いて、関連因子の発現は免疫組織染色および RT-PCR 法、細胞増殖は CellTiter96®を用いた比色法、細胞株における関連因子の発現量およびリン酸化の変動はウェスタンブロットにて解析した。その結果、①免疫組織染色にて HCC 腫瘍部および周囲非癌部で正常肝細胞に比較して高度な CGRP の発現を認めた。② RT-PCR にて HCC および HCC 由来細胞株 2 株で CGRP の細胞膜上の 2 量体リガンドである CLR と RAMP-1 の発現が確認された。③CGRP は Huh7 細胞の増殖を有意に抑制し、抑制率は  $10^{-10}$  M にて最大であった。④CGRP は Huh7 細胞の CREB タンパク質およびリン酸化 CREB を誘導し、この作用は CGRP アンタゴニストである CGRP<sub>8-37</sub> によってキャンセルされた。⑤CGRP は Huh7 細胞の MAPK 経路、すなわち Ras、MEK、ERK タンパク質の発現およびリン酸化 MEK とリン酸化 ERK を抑制した。⑦CGRP による ERK の抑制は CGRP<sub>8-37</sub> によってキャンセルされた。以上より、HCC において CGRP はリガンド依存的に CREB を誘導し、その結果 CREB の下流である MAPK 経路が抑制されることにより、細胞増殖抑制効果を生む可能性が示唆された。本論文は、CGRP の主要な伝達経路である cAMP-PKA-CREB 経路とは別に、MAPK 経路抑制を介した腫瘍増殖抑制メカニズムを明らかにし、HCC における cAMP と MAPK 経路のクロストークの可能性を示したもので、CGRP の HCC 治療へ繋がる基盤研究として重要な論文である。

[審査概要] 学位審査は平成 28 年 2 月 23 日、多数の陪席者のもとに行われた。約 20 分間の PC を用いた発表の後、約 40 分間の質疑応答が行われた。質疑応答では、①HCC における CGRP 高発現とその増殖抑制作用の矛盾、②PCR プライマーの特異性、③細胞増殖の解析が 24 時間という短時間であった点、④細胞分画の抽出法、⑤ローディングコントロールの必要性、⑥CREB による MAPK 経路の制御機構、⑦CGRP の臨床応用における偏頭痛の懸念、などが質問され、おおむね適切に回答した。

**最 終 試 験 結 果 の 要 旨**

[研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価] 研究手法に関する質問には一部回答が明瞭でない点があったが、概ね的確な回答をすることができた。当該研究領域における背景、問題点、研究に至った経緯をうまく説明し、領域に関する質問にも適切な回答が得られた。英語読解力に関しては引用文献の抄録部分の和訳を行い、特に問題なく翻訳を終えた。態度、人柄にも優れ、研究能力、学識、研究意欲を総合的に考えた結果、学位授与に値すると判断した。