The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Suppressor of cytokine signaling-1 induces significant preclinical antitumor effect in malignant melanoma cells
Author(s)	田上, 尚子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55735
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	田上　尚子
論文題名 Title	**Suppressor of cytokine signaling-1 induces significant preclinical antitumor effect in malignant melanoma cells** （SOCS-1はメラノーマ細胞において著明な抗腫瘍効果を誘導する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

サイトカインや増殖因子による細胞内シグナル伝達は、細胞の増殖や分化、細胞死に重要である一方、その制御異常は癌の増殖に深く関与することが報告されている。Suppressor of Cytokine Signaling（以下SOCS）ファミリー分子の１つであるSOCS-1は、IL-6, IFN-γなどの様々なサイトカインのシグナルによって発現が誘導され、チロシンキナーゼの一つであるJAK分子と結合して、キナーゼ活性を阻害することで、STAT3の活性化を抑制し、これらの細胞内シグナル伝達を負に制御する働きを持つ。今回、メラノーマにおけるSOCS-1の細胞増殖抑制機序を解析し、マウス皮下移植モデルを用いて*in vivo*での抗腫瘍効果を検証することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

G361、SK-MEL5、SK-MEL28のメラノーマ細胞株に対し、アデノウイルスベクターを用いてSOCS-1(AdSOCS-1)を強制発現させ、細胞増殖阻害を評価した。G361とSK-MEL5ではAdSOCS-1添加量依存性に増殖が抑制された。以降、G361とSK-MEL5の2つのcell lineを用いた。ウェスタンブロット法にて細胞増殖に関わるSOCS-1の標的経路を解析した結果、JAK/STAT経路以外にp53活性およびその下流のp21の発現上昇が確認された。さらに、p53とSOCS-1の関連及び、p53siRNAを用いてp53がメラノーマの増殖に実際に関与しているかを検討した。抗p53抗体を用いた共免疫沈降法による解析の結果、コントロールのAdLacZ感染細胞群と比較して、AdSOCS-1感染細胞群においてSOCS-1が検出されたことから、p53とSOCS-1が複合体を形成していることが示された。さらに、p53siRNAを使用してp53siRNAとコントロールsiRNAで処理して、24時間後にそれぞれAdSOCS-1とAdLacZを感染させ、細胞増殖アッセイを施行した。AdLacZ群において、p53をノックダウンすることによる細胞増殖抑制の減弱は有意差がみられなかったが、AdSOCS１群で、SOCS-1による細胞増殖抑制はp53をノックダウンすることで有意差をもって減弱することがわかった。これはSOCS-1がp53と複合体を形成して安定性が高まり、その結果、p53を介した抗腫瘍効果が増強されたことによると考えられた。つまり、p53はG361、SK-MEL5の増殖や生存に関与することが示された。また、p53siRNAもしくはcontrol siRNAをトランスフェクションし、p-STAT3の発現を比較したところ変化が認められなかったことから、SOCS-1はJAK/STATシグナルとp53をそれぞれ独立して制御していることが示唆された。次に、細胞増殖が抑制されている機序を検討した。SOCS-1の標的経路として、JAK/STATシグナルの抑制とp53経路の活性が考えられたため、SOCS-1の細胞増殖抑制の機序の１つにアポトーシスを考え、アポトーシスの過程で重要であるCaspase3の活性を測定した。SOCS-1強制発現により濃度依存性にカスパーゼ3の上昇を認めた。さらに、SOCS-1による抗アポトーシスタンパク質の発現レベルをウェスタンブロット法で調べた。SOCS1強制発現にて抗アポトーシスタンパク質（Mcl-1,Bcl-xl）の減弱を認めた。以上よりSOCS-1の細胞増殖抑制の機序の１つにアポトーシスの制御があることが示された。さらに、SOCS-1の強制発現でp53およびその下流のp21が活性化されたので、細胞周期にも影響すると考え、フローサイトメトリーで細胞周期を調べた。その結果、SOCS-1を過剰発現させた時に、G0/G1期が有意に増加、S期が有意に減少しており、以上よりSOCS-1の細胞増殖抑制の機序にはアポトーシスに加え細胞周期のG0/G1期での停止も関与していると考えられた。最後に、ヌードマウスを用いメラノーマ皮下移植モデルを作成し、腫瘍体積が100mm^{3}に達した時点でAdSOCS-1あるいはAdLacZを週2回腫瘍内投与した。その結果、コントロール群と比較し、AdSOCS-1投与群では有意な腫瘍体積の減少および腫瘍細胞のアポトーシスがみられた。

〔総　括(Conclusion)〕

SOCS-1はJAK/STAT3、p53を介したシグナルを制御することでメラノーマ細胞の増殖に抑制的に働くと示唆された。また*in vivo*における抗腫瘍効果も示されたため、メラノーマに対する遺伝子治療法として有効であると考えられる。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）田上　尚子

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	許山一朗
	副　査	大阪大学教授	細川亘
	副　査	大阪大学教授	板見智

論文審査の結果の要旨

メラノーマは皮膚癌において最も死亡率の高い癌である。転移性メラノーマは手術、放射線治療、化学療法に抵抗性を示し、未だ有効な治療は確立されていない。今回の研究では細胞内サイトカインシグナル経路を阻害するSOCS-1のメラノーマに対する治療の有効性を検討した。SOCS-1は様々なサイトカインのシグナルによって発現が誘導され、JAK分子と結合してキナーゼ活性を阻害することでSTAT3の活性化を抑制し、これらの細胞内シグナル伝達を負に制御する働きをもつ。メラノーマの細胞株G361、SK-MEL5、SK-MEL28にアデノウイルスベクターを用いてSOCS-1を強制発現させた。これらのうち、G361、SK-MEL5ではSOCS-1の強制発現により*in vitro* 、*in vivo*において細胞増殖が著明に抑制されアポトーシスが誘導された。さらに、SOCS-１の細胞増殖抑制効果にSTAT3の活性化の阻害だけでなくp53シグナルの活性化が関与していることを示した。これらの結果よりメラノーマに対するSOCS-1治療の有効性が示された。以上より学位に値すると考える。