

## 学 位 論 文 内 容 要 旨

### 論 文 題 目

Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo

(siRNA を用いた Skp2 蛋白ノックダウンにより

in vitro および in vivo においてメラノーマ細胞の増殖は抑制される)

指導 (紹介) 教授 : 山 下 英 俊

申請者氏名 : 片 桐 美 之

Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor である p27<sup>Kip1</sup> は、cyclin E-CDK2 複合体のキナーゼ活性を阻害し G1 期から S 期への移行を抑制することにより、細胞周期において負の調節を行う。p27<sup>Kip1</sup> の mRNA 量は細胞周期を通して変化しないが、p27<sup>Kip1</sup> タンパクは G1 後期にユビキチン-プロテアソーム系で分解されることで、cyclin E-CDK2 複合体が活性化、S 期へ移行する。ユビキチン化において標的タンパクの識別に関わる酵素である E3 ユビキチンリガーゼのうち、Skp1、Cul1、Roc1/Rbx1、F-box protein で構成される SCF 複合体は F-box protein の多様性によって様々なタンパクを特異的に認識する。S phase kinase-interacting protein 2 (Skp2) は、p27<sup>Kip1</sup> を特異的に認識する F-box protein である。

悪性黒色腫を含む様々な悪性腫瘍で p27<sup>Kip1</sup> タンパクの発現低下が指摘され、それに伴う予後の悪化が報告されている。最近この p27<sup>Kip1</sup> を特異的に認識し、ユビキチン化を行う Skp2 が、予後の悪い悪性黒色腫において p27<sup>Kip1</sup> の発現低下に反比例して過剰に発現していることが報告された。このことから悪性黒色腫では、Skp2 の過剰発現に起因して p27<sup>Kip1</sup> の分解が促進され、細胞周期の亢進が起こっていると考えられる。

近年、small interfering RNA (siRNA) と呼ばれる 21mer~23 mer の短い二本鎖 RNA により配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である RNA interference (RNAi、RNA 干渉) が注目されている。われわれは siRNA を用いた Skp2 の gene silencing によって p27<sup>Kip1</sup> タンパクの分解を阻害し、結果としてメラノーマ細胞の増殖を in vitro および in vivo で抑制できるのではないかと考えた。Skp2 に対する siRNA を合成する plasmid vector を作成し、複数のメラノーマ細胞のうち Skp2 タンパクの発現レベルの高いものにこれを導入した。Skp2 siRNA vector を導入されたメラノーマ細胞では、Skp2 の mRNA とタンパクは減少するが、p27<sup>Kip1</sup> タンパクは集積することを real-time PCR と western blot 法で確認した。また、in vitro においてメラノーマ細胞の増殖は抑制された。さらに、Skp2 siRNA vector を導入されたメラノーマ細胞をヌードマウスの背部皮下に注射したところ、in vivo においても腫瘍の増殖は抑制された。これらの結果から、siRNA を用いた Skp2 の gene silencing は悪性黒色腫において p27<sup>Kip1</sup> 分解抑制性遺伝子治療の有効な手段になる可能性があると思われる。

平成 18 年 8 月 15 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 片桐 美之

論文題目： Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo  
(siRNA を用いた Skp2 蛋白ノックダウンにより in vitro および in vivo において  
メラノーマ細胞の増殖は抑制される)

審査委員：主審査委員

北中 千史



副審査委員

本山 侑一



副審査委員

河田 純男



審査終了日：平成 18 年 8 月 15 日

### 【 論文 審査 結果 要 旨 】

代表的皮膚悪性腫瘍である悪性黒色腫はしばしば早期から遠隔臓器への転移傾向を示し、転移性悪性黒色腫の予後は放射線・化学療法などの集学的治療を行っても極めて不良である。従って今後悪性黒色腫の治療成績を向上してゆくためには、従来にない機序に基づく新規治療法の開発が期待される。このような観点から、片桐美之氏は本研究において悪性黒色腫細胞の増殖制御に深く関わっていると考えられる分子に着目し、それらをターゲットとする悪性黒色腫の新たな治療法の可能性を模索した。

Skp2 は CDK インヒビターである p27 のユビキチン・リガーゼである。これまでの他の悪性腫瘍における検討から Skp2 の過剰発現が p27 のプロテアソーム依存的分解促進を介して腫瘍細胞の増殖に寄与していること、ならびに悪性黒色腫でも Skp2 の過剰発現とこれに呼応した p27 の発現低下がおきていること、などが報告されている。片桐氏はこれらの点に注目し、悪性黒色腫においても Skp2 の過剰発現が p27 蛋白質の発現低下、ひいては腫瘍細胞の増殖を引き起こしているのではないかと考え、逆に Skp2 の発現を抑制することができれば、p27 の発現誘導を介して悪性黒色腫細胞の増殖を抑制できるのではないかと作業仮説を立てた。

このような仮説を検証するために、Skp2 に対してデザインした 2 種類の siRNA を発現するベクターおよびコントロールベクターを作成し、Skp2 を高発現し p27 の発現レベルが低いヒト悪性黒色腫細胞株 MM96E に安定的に遺伝子導入した。これらの細胞を用いてまず in vitro で検討を行ったところ、Skp2 siRNA の発現に応じて Skp2 発現レベルの低下と p27 発現レベルの上昇が確認された。また Skp2 siRNA 発現細胞はコントロール細胞と比較して細胞分裂・増殖が抑制されていた。さらに Skp2 siRNA 発現細胞ならびにコントロール細胞をヌードマウスに移植し in vivo で腫瘍形成能を調べたところ、Skp2 siRNA 発現細胞で有意に腫瘍の増大が抑制されていることが確認された。

以上の研究成果は当初の作業仮説を支持するものであり、Skp2 が悪性黒色腫の新たな治療ターゲットとして有用である可能性を示している。本研究の in vivo の検討では siRNA 発現ベクターを予め安定的に導入した細胞株をマウスに移植しているためまだ治療モデルと呼ぶにはほど遠く、Skp2 に対する siRNA 自体が悪性黒色腫の治療に有用か否かは今後検討の余地がある。しかしながら本研究は世界で初めて Skp2 siRNA が生体内において悪性黒色腫細胞による腫瘍形成を抑制することを示すものであり、その成果は国際的な peer-reviewed journal に掲載されている。以上の審査結果に基づき、本審査委員会は本学位論文が学位（医学）の授与に値するものと判定する。

(1, 200 字以内)