

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 野口 慶太

### 学位論文題名

TRIM40 は IKK $\gamma$  の Nedd8 化を促進し NF $\kappa$ B 活性を抑制することで腸管の炎症・癌化を抑制する。

【背景と目的】消化管癌では NF- $\kappa$ B 活性が恒常的に活性化している例が多く、持続的な NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 活性の調節に関わっているとことから TRIM40 が NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 活性を抑制していた。TRIM40 が NF- $\kappa$ B 活性を抑制する機序を解析するために TNF $\alpha$  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- $\kappa$ 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 $\kappa$ B $\alpha$  との関与を解析したところ、TRIM40 は I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を抑制していた。次に、I $\kappa$ B $\alpha$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  を Nedd8 化することで NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 $\gamma$  を Nedd8 化することにより NF- $\kappa$ B 活性を抑制していた。IKK $\gamma$  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- $\kappa$ B 活性を促進しているとの報告がある。TRIM40 は IKK $\gamma$  を Nedd8 化を促進することで、NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 活性と抑制することで TNF $\alpha$ 、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- $\kappa$ B は癌や免疫抑制の標的として注目を集めており、IKK $\beta$  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- $\kappa$ 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 Bortezomib が、I $\kappa$ B の分解を抑制し NF- $\kappa$ 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考えた。

【結論】 TRIM40 は NF- $\kappa$ 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。