




## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 646 号	氏 名	RATSADA PRAPHASAWAT
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	駸阿勉	
	副査氏名	波野豊	
	副査氏名	千葉政一	
論文題目			
<p>DUSP4 is involved in the enhanced proliferation and survival of DUSP4-overexpressing cancer cells (DUSP4 高発現癌細胞において DUSP4 は増殖能および生存能の亢進に関与する)</p>			
論文掲載雑誌名			
Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨			
【緒言】			
<p>DUSP4 は MAP キナーゼシグナル伝達系に属する分子であり、ERK を不活性化する働きがあることから、tumor suppressor に位置づけられている分子である。肺癌、大腸癌を含む多くの悪性腫瘍でその発現が低下しているが、DUSP4 の過剰発現を示す悪性腫瘍も存在する。DUSP4 の過剰発現を呈している癌細胞で、この分子がどのように機能しているかを解析した。</p>			
【材料および方法】			
<p>DUSP4 を過剰発現している、大腸癌、胃癌の細胞株に対して RNAi 法を用い、DUSP4 の発現を抑制した。RNAi の効果を定量 PCR、ウェスタンブロット法で確認した。MTS アッセイ、フローサイトメトリーによって、DUSP4 抑制下での細胞増殖、アポトーシス、細胞周期を解析した。また、マイクロアレイ法による発現解析を行い、DUSP4 の抑制が影響を与えるシグナル伝達系の有無を分析した。CRISPR/CAS9 システムにより、TP53 を欠損させた細胞株でも同様の実験を行った。</p>			
【結果・考察】			
<p>RNAi により、DUSP4 の発現は抑制された。DUSP4 発現が抑制された状態では、細胞増殖は抑制され、アポトーシスと細胞周期停止が誘導された。また DUSP4 抑制下では p53 の過剰発現および p53 により誘導される分子の発現が認められた。マイクロアレイ法による解析により、DUSP4 の発現抑制により、p53 経路が活性化していることが確認された。TP53 を欠損させた状態の細胞では、DUSP4 抑制の効果が検出できなかった。</p> <p>DUSP4 の発現低下により、アポトーシス、細胞周期停止が誘導され、細胞増殖が抑制された。これらの効果は p53 経路を介していると考えられたが、TP53 に変異のある細胞でも DUSP4 発現抑制により細胞増殖が抑制された。DUSP4 が過剰発現している癌細胞では、DUSP4 は tumor suppressor としてではなく、オンコジーンとして機能していると考えられた。</p>			
<p>本研究は、DUSP4 の過剰発現がアポトーシスや細胞周期停止を抑制し、細胞増殖を刺激することを示し、DUSP4 が新たな治療戦略の対象となる可能性を示したものである。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第646号	氏名	RATSADA PRAPHASAWAT
審査委員会委員	主査氏名	駒阿勉	
	副査氏名	波多野豊	
	副査氏名	千景政一	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. DUSP4を過剰発現と評価するのに際し、何を基準としたのか。</li> <li>2. p53に突然変異がある細胞株では、DUSP4の抑制によりp53の発現が抑制されているが、なぜか。その意義は何か。</li> <li>3. DUSP4が過剰発現している細胞において、DUSP4の発現を誘導している機構は何か。</li> <li>4. 各細胞株のオリジンの癌組織でもDUSP4の発現は亢進していたのか。</li> <li>5. DUSP4の発現レベルに影響を与える因子は何か。</li> <li>6. トランスフェクションの実験における細胞回収時期はどのように決めたか。</li> <li>7. DUSP4の発現はsiRNAの導入により低下しているがこのレベルは正常細胞と比較してどうか。</li> <li>8. DUSP4の発現レベルが高い癌細胞と低い癌細胞があり、同一病変においても異なる。DUSP4の異常な発現をどのように治療応用するのか。</li> <li>9. 同じ癌組織の中にDUSP4が高い細胞と低い細胞がある場合、DUSP4抑制を目的とした治療が困難になると思われる。DUSP4が高い場合は、DUSP4を抑制するとがん管理が改善されるが、DUSP4が低い場合は、DUSP4の誘導または回復によりがん管理が悪化すると考えられるからであるが、そもそも同じ癌組織にDUSP4への操作が癌管理上正反対の結果となる細胞が同居しているという症例はあるか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Ratsada Praphasawat

論 文 題 目

DUSP4 is involved in the enhanced proliferation and survival of DUSP4-overexpressing cancer cells

(DUSP4 高発現癌細胞において DUSP4 は増殖能および生存能の亢進に関与する)

要 旨

**Introduction:** Dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4), a MAP kinase phosphatase, has been regarded as a tumor suppressor by inactivating ERKs which play a central role in MAP kinase signaling pathway. Thereby, downregulation of DUSP4 has been frequently observed in several cancers. Recently, we reported that constitutive activation of MAP kinase accompanied by downregulation of DUSP4 contributes to the cancer progression in pancreas and colon. However, in certain cases of pancreatic cancer and colorectal cancer, we unexpectedly found that DUSP4 was overexpressed in cancer cells. Therefore, we attempt to investigate the functional significance and molecular mechanism of DUSP4-overexpressing cancer cells.

**Materials and Methods:** We performed knockdown of DUSP4 by using small interfering RNAs in DUSP4-overexpressing cancer cells including HCT116, SNU-1, AGS, SNU-C2A, and SNU-C5.

After confirming the efficacy of DUSP4 silencing by quantitative PCR and western blot, we determined the effect of DUSP4 downregulation on cell proliferation, apoptosis and cell cycle by MTS assay, cell death assay and flow cytometry analysis, respectively. Moreover, the expression analysis using microarray was performed to clarify the aberrant signaling pathways caused by DUSP4 downregulation. Finally, we established p53-deleted cells using CRISPR/Cas9 system and further confirmed the role of DUSP4 in the p53 signaling pathway.

**Results:** We showed that downregulation of DUSP4 suppressed the proliferation of DUSP4-overexpressing cancer cell lines by inducing both apoptosis and cell cycle arrest at G2/M phase. Pathway analysis using the results of expression array revealed that downregulation of DUSP4 activated the p53 signaling pathway. Aberrant accumulation of p53 and induction of p53 downstream target genes were further investigated. In p53-deleted cells, the growth suppression following downregulation of DUSP4 was markedly attenuated.

**Discussion:** Our findings indicate that downregulation of DUSP4 remarkably inhibits cell proliferation through inducing apoptosis and cell cycle arrest. In cancer cells possessing wild-type p53 including HCT116, SNU-1 and AGS, downregulation of DUSP4 results in an activation of p53 signaling pathway. However, in cancer cells harboring mutant p53, such as SNU-C5 and SNU-C2A, the cell proliferation was similarly reduced by downregulation of DUSP4 through undefined signaling pathways. These results strongly suggest that DUSP4 may function as an oncogene rather than a tumor suppressor gene in DUSP4-overexpressing cells.

**Conclusion:** The constitutive expression of DUSP4 in cancer cells contributes to enhanced proliferation through escape from apoptosis and cell cycle arrest. We propose that DUSP4 could be a novel therapeutic target for cancers overexpressing it.