



Title	癌悪性度進展の分子基盤の解明〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	大塚, 勇太郎
Description	配架番号 : 2366
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12987号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70814
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yutaro_Otsuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 大塚 勇太郎

学位論文題名

癌悪性度進展の分子基盤の解明

(Molecular Bases of The Cancer Malignancy Development)

【背景と目的】がんは本邦における最大の死亡原因疾患であり、全世界においても重大な死亡要因である。がんの最大の脅威は再発であり、その基盤となるのは治療抵抗性と浸潤・転移能の獲得である。上皮由来の腫瘍細胞がこれら悪性形質を獲得するためには上皮間充織転換（EMT）を引き起こすことが必要と考えられている。本研究においては、この EMT という現象を中心として癌の浸潤・転移能獲得の分子機構とその駆動プロセスを明らかにすることを大きな課題として設定した。分子生物学教室ではこれまで、膜輸送に関与する低分子量 G タンパク質 Arf6 を中心とする経路が、乳癌をはじめとする腺癌において、EMT に伴って形成され、上記悪性形質の獲得に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。ここにおいて本研究では、①扁平上皮癌においても悪性度進展に際して Arf6 経路が駆動されるかの検討、②悪性度進展を Arf6 経路に依る乳癌自然発癌モデルマウスの同定、③EMT に伴う細胞内代謝変化とミトコンドリア形態の変化を明らかにすること、を目的とした。

【方法と結果】主に樹立された細胞株とモデルマウスを利用して細胞生物学的・生化学的解析を中心に実験を行った。①のテーマについては、以前得られていた知見である「ヒト臨床検体の解析による Arf6 経路構成タンパク質 EPB41L5 の発現量と頭頸部扁平上皮癌の予後不良の相関」に対し、頭頸部扁平上皮癌細胞株 SCC-9, SCC-25 を使用して EPB41L5 遺伝子発現抑制を行った際の細胞浸潤能・治療抵抗性の変化を検討し、細胞生物学的機序の説明を付け加えた。SCC-9 細胞では EPB41L5 の発現量が SCC-25 細胞に比較して高く、この EPB41L5 の遺伝子発現を抑制することにより細胞浸潤能と、部分的ながらも化学放射線療法抵抗性を減弱することを見出した。また、EPB41L5 発現亢進条件が組織系により異なる可能性をデータベース解析により検討したところ、腺癌においては EMT 関連転写因子である ZEB1 や TCF4 の発現量と EPB41L5 の発現量とが相関を示したのに対し、扁平上皮癌においてはこのような傾向は見られなかった。②のテーマについては、乳癌自然発癌モデルマウスである MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスを使用し、*in vitro*, *in vivo* 双方の実験を行った。これらマウスは互いによく似た遺伝子発現プロファイルを示す一方で悪性度進展の時間的経過に大きな差があることが先行研究により報告されている。まず両マウスにおける Arf6 経路構成タンパク質の発現状況をウェスタンブロッティングと免疫組織化学により比較した。これにより Arf6 経路構成タンパク質 AMAP1 の発現量に差があることを見出した。また RT-PCR や公開データベース中のマイクロアレイデータを解析することにより、この発現量変化が mRNA レベルから引き起こされていることを明らかにし、蛍光組織染色の結果から AMAP1 発現上昇が EMT と相関している可能性を指摘した。さらに詳細な検討を行うため、MMTV-PyMT マウスの腫瘍由来初代培養系を立ち上げた。この細胞を用いたトランスウェルインベーションアッセイ、ゼラチンザイモグラフィ、ライブ

セルイメージングといった *in vitro* の実験により, Arf6 や AMAP1 の遺伝子発現抑制によって細胞運動能が抑制され, 結果として細胞浸潤能が抑制されることを示した. またそのとき, 基底膜分解能に影響はないことも確認した. 最後に Arf6 経路活性化に必須なメバロン酸経路を阻害することにより MMTV-PyMT マウス由来の腫瘍細胞の悪性形質に変化が起こるかを検討した. メバロン酸経路の律速酵素 HMG-CoA 還元酵素の競合阻害剤のひとつ, アトルバスタチンで MMTV-PyMT マウス腫瘍由来細胞を処理することにより, 細胞浸潤能が抑制されることを示した. また MMTV-PyMT マウスの腫瘍形成時期にアトルバスタチンを腹腔内投与することによって肺転移巣形成能を抑制する可能性を見出した. このとき原発巣の腫瘍形成能には影響がないことも確認した. ③のテーマについては, TGF- β 刺激により 48 時間以内に EMT を引き起こす細胞株である A549 (ヒト肺腺癌細胞株) と NMuMG (正常マウス乳腺上皮細胞株) を用いて実験を行った. まず, Nikon の超解像顕微鏡 N-SIM を用いた観察により A549 と NMuMG 両細胞において EMT に伴ってミトコンドリア一つあたりの体積が減少することを見出した. またこのときの細胞形態変化と E-cadherin 発現量変化と OXPHOS 活性変化を継時的に調べ, NMuMG 細胞においてのみ細胞形態変化ののちに OXPHOS 活性が上昇していることを見出した (A549 細胞においては TGF- β 処理で OXPHOS は変わらないもののベースとして NMuMG 細胞より軽度高値を示していた). OXPHOS 活性を保ったままミトコンドリアが fission することの生物学的意義を調べるためミトコンドリアの fission を引き起こすたんぱく質である Drp1 の阻害剤として知られる Mdivi 1 を用いて検討を行った. Mdivi 1 処理により TGF- β 処理を行った際の細胞浸潤能と運動能が抑制されることを見出した. さらに狭路通過時の細胞の様子を共焦点顕微鏡により観察することで, ミトコンドリアの一部が移動先端に局在することが狭路通過時に有利になる可能性を見出した.

【考察と結論】 Arf6 をはじめ, Arf6 経路の構成タンパク質は多くの正常組織で発現が認められ, 進化的にも保存されており, 細胞の根幹的機能を担うと考えられる. Arf6 経路は受容体型チロシンキナーゼや G タンパク質共役型受容体の下流で, 様々なタンパク質のエンドサイトーシスやリサイクリングに関与している. しかし, ひとたび腫瘍細胞で Arf6 経路が活性化されてしまうと浸潤能や薬剤耐性といった悪性形質を獲得してしまう. 本研究においては組織系によって Arf6 経路の形成条件が異なる可能性を示した. このことは, いろいろな癌種においても Arf6 経路活性化が悪性度進展の引き金となる可能性を示唆する. 臨床応用に際しては Arf6 経路が活性化した細胞群を見分ける方法と Arf6 経路を遮断する方法を構築する必要がある. その点に関して Arf6 経路を利用する自然発癌モデルマウスを同定したことは大きな意義を持つ. これまでの解析は Arf6 経路が活性化した細胞とそうでない細胞の比較により行われてきた. 本研究により Arf6 経路が一つの系の中で悪性度進展とともに形成されていく様子を解析することが可能となった. 今後は発癌前から転移巣形成後にわたり Arf6 経路形成過程とその阻害効果を検討する必要がある. ミトコンドリア形態変化に関しては Drp1 の遺伝子発現抑制を含め, 多様な実験系による多角的な検証が必要とされるが, OXPHOS 活性を保ったままミトコンドリア fission が起こる事の細胞生物学的意義を明らかにできれば興味深いと考える.