



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	癌悪性度進展の分子基盤の解明 [全文の要約]
Author(s)	大塚, 勇太郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2366 他
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/2115/70815
Type	doctoral thesis
File Information	Yutaro_Otsuka_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

癌悪性度進展の分子基盤の解明

(Molecular Bases of The Cancer Malignancy
Development)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

大塚 勇太郎

Yutaro Otsuka

学 位 論 文 (要約)

癌悪性度進展の分子基盤の解明

(Molecular Bases of The Cancer Malignancy
Development)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

大塚 勇太郎

Yutaro Otsuka

【序章】

がんは本邦における最大の死亡原因疾患である。全世界においても多数の人々が、がんにより命を落としている。がんはその致死性のみならず、患者の QOL (quality of life, クオリティ・オブ・ライフ) を著しく阻害することも臨床的に大きな問題となっており、そのため腫瘍細胞に有効かつ特異性の高い治療法を開発することが医学における最重要課題の一つである。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。治療や診断における医療技術が高度に進歩した現在において、手術をはじめ十分に効果的な初期治療がなされた後でさえなお、がんは頻々として再発する。近年のがん研究の大きな主題の一つは、がん悪性度進展の契機と時間的順序の解明ともいえる。癌の悪性度進展に際して重要な現象として癌的 EMT (epithelial-mesenchymal transition, 上皮間充織転換) が知られている。EMT は正常な胚発生においてもみられ、上皮系細胞がその接着因子や上皮性マーカーを失い、高い運動能を獲得し、間葉系の性質を示すようになる現象である。分子生物学教室ではこれまで、膜小胞のリサイクリングやエンドサイトーシスを制御する低分子量 G タンパク質である 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。

【第一章】

第一章においては、Arf6 経路構成タンパク質である EPB41L5 の高発現が頭頸部扁平上皮癌の患者予後不良と相関することを示した。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 の発現量と舌癌の予後不良の相関」に着目し、舌癌細胞株 SCC-9 と 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、同時に細胞浸潤能も高いことを見出した。このとき、SCC-9 細胞の EPB41L5 遺伝子発現を siRNA 処理によって抑制することで細胞浸潤能と、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について解析ソフトウェア R を用いた TCGA (The Cancer Genome Atlas) 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。

【第二章】

第二章においては、悪性度進展に Arf6 経路を利用する自然発癌転移性乳癌モデルマウスの同定を行った。古くから確立され幅広く研究に用いられている乳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。先行研究によりこれらマウスが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。これまでヒト細胞株や臨床検体の解析では、AMAP1 の過剰発現が EMT を伴うが AMAP1 の発現量は主に翻訳の段階で制御されており mRNA 量に相関は見られないことを報告しており、今後 MMTV-PyMT マウスを用いた解析を行う際にはこれら知見を考慮する必要がある。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ジョンアッセイ、ゼラチンザイモグラフィー、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。

【第三章】

第三章においては、EMT 過程において細胞のミトコンドリア形態に変化がみられることを報告した。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 を引き起こすタン

パク質である 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。

【第四章】

第四章では、これまでの研究についての考察を延長し、これからの生命科学においては、希少かつ再現困難な現象に対する解析理論の構築が不可欠であることを述べた。解析機器の発達に伴い、「一個体レベル」や「一細胞レベル」のデータを扱うときに、現状の統計学的手法では限界が来るのではないかと考えたためである。さらには、現在では非科学的として議論できない事象の中にも、このような理論を構築することで科学の場に持ち込むことが出来る事象が含まれている可能性がある。具体的なアイデアはまだ持っていないが長い時間をかけ広い視点から考えていきたい問題であるとして取り上げた。

【結論】

本研究において、これまで乳癌をはじめとする腺癌で明らかとなっていた癌悪性度進展における Arf6 経路の役割を組織系の異なる頭頸部扁平上皮癌や動物種の異なるマウスへ拡張して検討することができた。Arf6 経路が活性化する細胞内外の状況に違いはあっても、ひとたび Arf6 経路が形成されると細胞が運動能や浸潤能、治療抵抗性が増強され、癌の悪性度進展に寄与することを明らかにした。また、EMT 過程において細胞内代謝を司るミトコンドリアの形態に大きな変化が起こることも見出した。このミトコンドリアダイナミクスと Arf6 経路活性化の関係を検討していくことが求められる。今後はこれらの結果を基盤として、新たな分子生物学的な研究課題を設定していくことが重要となる。