



|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 皮膚有棘細胞癌におけるミトコンドリア分裂関連分子Drp1の機能に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                     |
| Author(s)           | 北村, 真也                                                                                                  |
| Description         | 配架番号 : 2520                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第14056号                                                                                                |
| Issue Date          | 2020-03-25                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/78284">https://hdl.handle.net/2115/78284</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | Shinya_Kitamura_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    北 村 真 也

### 学 位 論 文 題 名

皮膚有棘細胞癌におけるミトコンドリア分裂関連分子Drp1の機能に関する研究  
(Studies on the function of Drp1 in cutaneous squamous cell carcinoma.)

【背景と目的】近年, nivolumab・pembrolizumab などの免疫チェックポイント阻害剤をはじめ, BRAF 阻害剤の dabrafenib・encorafenib, あるいは MEK 阻害剤の trametinib・binimetinib といった低分子標的薬などの新薬が登場したことで, 悪性黒色腫を筆頭に一部の悪性新生物では治療方法や予後が劇的に変化している. しかしながらその一方で, 悪性黒色腫以外の皮膚悪性腫瘍については, 悪性黒色腫のような飛躍的な進歩には乏しい現状がある. その原因としては, 皮膚悪性腫瘍の殆どが稀少癌であることや, セルラインが確立された癌種に限られていることなどが主な理由である. よって, 臨床的マーカーや新薬の開発などの臨床的・基礎的な研究開発が大きな課題である. 一般的に, 皮膚悪性腫瘍は多くは紫外線が誘引となり, 高齢化の進行とともに今後の発症増加が予想されている. 皮膚有棘細胞癌 (Squamous cell carcinoma, 以下 SCC と略す) は表皮由来の皮膚悪性腫瘍であり, 低悪性度のうちは, 外科的切除で根治が期待できるが, 遠隔転移を伴うような進行例になると, 化学療法にしばしば抵抗性を示し, 治療に難渋することが少なくない. 治療選択肢が限定的である本疾患は, 高齢化の進行とともに今後の発症数のさらなる増加が見込まれており, 新規の治療開発が急務である. 近年, ミトコンドリア分裂関連分子の1つである dynamin-related protein 1 (以下 Drp1 と略す) が, 肺癌や甲状腺癌などの悪性新生物において, 細胞の増殖や細胞周期などを調整することで, 悪性腫瘍にとって有利にはたらく分子であることが報告されている. 本研究では, この Drp1 に注目し, 皮膚有棘細胞癌における機能について解析することで, 新規治療ターゲット分子としてなりうるかを検討した.

【対象と方法】皮膚有棘細胞癌の細胞株である A431 および DJM1 に, RNA 干渉ベクター (siRNA, shRNA) をトランスフェクションして Drp1 ノックダウン細胞をそれぞれ作成し, in vitro および in vivo での細胞増殖や細胞周期などについて解析をおこなった. In vitro の実験系においては, 培養細胞の増殖能を cell viability assay, direct cell count, コロニー増殖アッセイを用いてそれぞれ評価した. 細胞周期については, fluorescence-activated cell sorting (以下 FACS と略す) を用いて細胞核の DNA 含量を分析して評価した. ミトコンドリアの形態学的解析には, Mito-tracker でミトコンドリアの蛍光染色を行い, ミトコンドリアネットワークの形状を可視化し, 画像解析ソフトを用いて定量化し評価した. また, 増殖シグナル経路の評価として, mitogen-activated protein kinase 経路 (以下 MAPK 経路と略す) シグナル関連分子について免疫ブロット法にて評価した. In vivo の実験系においては, 免疫不全マウスであるヌードマウスに DJM1 細胞 (Drp1 のノックダウン細胞株およびコントロ

ール細胞)を異種皮下移植して xenograft model を作成し、経時的に腫瘍の動態を観察した。さらに、Drp1 阻害剤を腫瘍部に局所注射することで、Drp1 阻害剤の抗腫瘍効果について検討した。摘出した腫瘍は、病理組織学的な観察に加え、Ki-67 および TUNEL 染色によりそれぞれ細胞増殖・アポトーシスについて評価した。臨床検体を用いた実験系としては、北海道大学病院皮膚科で切除した SCC 30 症例について Drp1 の免疫染色を行い、Drp1 の発現量を検討した。また、Drp1 免疫染色のスコアリングを行うことで、Drp1 発現量を定量化した後、臨床情報との相関関係について統計学的な解析を行った。

【結果】細胞増殖能の解析では、Drp1 ノックダウン細胞はコントロールに比べて細胞増殖能が有意に低下していた。細胞周期については、Drp1 の欠失によって分裂直前の G2/M アレストに誘導されることが分かった。ミトコンドリアの形態学的解析では、Drp1 ノックダウン群では長い融合したミトコンドリアネットワークが観察された。シグナル経路の解析では、MEK 阻害剤の添加により ERK および Drp1 のリン酸化が阻害され、Drp1 は MAPK 経路の下流でリン酸化することで機能することが示された。また、ヌードマウスに異種移植した xenograft モデルの解析では、Drp1 ノックダウン細胞はコントロールに比べて有意に増殖が遅く、Ki-67 陽性細胞の低下、TUNEL 陽性細胞の増加が認められた。臨床検体の解析では、SCC では正常皮膚に比べて Drp1 の発現量が亢進していた。また、転移リンパ節ではさらに発現量が亢進していた。Drp1 の発現量と臨床情報の相関解析を行ったところ、年齢、腫瘍のサイズとは相関関係を認めなかったが、臨床病期と正の相関関係を示した。また、分化度とは負の相関傾向を示した ( $P=0.08$ )。

【考察】本研究により、Drp1 は MAPK 経路の下流に位置しており、リン酸化されることで活性化し、他の癌種で報告されているのと同様に、皮膚有棘細胞癌における細胞増殖、細胞周期などを調整する重要な分子として機能していることが判明した。また、SCC においてもミトコンドリアの分裂を調整し、Drp1 のノックダウンにより長いミトコンドリアネットワークが観察された。Drp1 は予後規定因子としても有用であることが報告されているが、SCC においても Drp1 の発現量が臨床病期と正の相関関係にあり、既報告と合致した。また、皮膚有棘細胞癌は低分化であるほど予後が悪いことが知られている。本研究では Drp1 の発現量が分化度とは負の相関関係を示したが、これらの結果は予後規定因子としての有効性を示唆するものであった。

【結論】Drp1 は皮膚 SCC において、細胞増殖や細胞分裂を制御する分子として機能しており、SCC における新規治療ターゲット分子候補となりうると考えられた。