



Title	がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	堀川, 芽衣
Description	配架番号 : 2727
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14980号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85858
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HORIKAWA_Mei_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 堀川 芽衣

学位論文題名

がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明

(Studies on the effect of cancer cells on the tumor microenvironment and its mechanisms)

【背景と目的】がん細胞では糖代謝が異常に亢進しており、それに伴い微小環境は糖が枯渇し酸性化する。腫瘍内の糖枯渇と酸性化は免疫逃避や薬剤・放射線への耐性を惹起し、がん治療の奏功を妨げる。一方、これらの厳しいストレスに対し、がん細胞は様々な応答を介して生存性を維持するが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では、がん細胞の生存性を抑制すると同時に腫瘍微小環境を治療に望ましい条件に適正化する方法の導出を目的として、がん細胞の糖枯渇および酸性化への耐性メカニズムの解明を試みた。

糖代謝で生じた乳酸などの代謝産物は微小環境を酸性化する。がん細胞は様々な分子により内部 pH を維持するが、このうち Carbonic Anhydrase IX (CAIX) は細胞膜に局在する腫瘍特異的酵素であり、悪性度や予後不良のマーカーとして用いられる。CAIX が細胞内のアルカリ化に寄与することで、がん細胞は生存や増殖を続けながら細胞外をより酸性化する。CAIX の転写が HIF-1 に制御されることは知られているが、CAIX の局在制御に関する知見は得られていない。CAIX は細胞表面で機能することを考慮すると、その局在制御機構の解明は腫瘍微小環境の酸性化を是正するための方法論に繋がると期待される。以上の背景から、本研究では小胞輸送による CAIX の局在制御について解析した。

また、腫瘍内では血管からの距離の違いやがん細胞の糖代謝亢進により糖濃度の不均一性が生じ、深部ではしばしば糖が枯渇する。培養環境下での糖枯渇はがん細胞を短期間で死滅させることから、腫瘍内の糖欠乏細胞は何らかの仕組みにより生存すると推測される。他の細胞の代謝産物を利用して生存性を維持する「代謝協調」は、糖を含む種々の栄養素の欠乏に対する腫瘍全体の応答として近年注目されているが、メカニズムの全容は不明である。糖枯渇は免疫細胞の機能を減弱させることが知られており、薬剤や放射線の効果にも影響すると考えられている。上記と同様に、糖枯渇への応答機構の解明は、腫瘍の成長を抑制しながら微小環境を是正するための方法論の確立に必須である。以上の背景から、本研究では腫瘍内の糖枯渇が惹起する代謝協調の媒介因子を解析した。

上記の解析には、局所的な糖枯渇を培養系で再現する必要がある。そこで本研究では、細胞特異的に糖代謝を制御できる新たな実験系を確立した。これには 2 種類の遺伝子構築の導入を要するが、加えて種々の遺伝子の発現調節などを行う場合を想定すると、3 種類以上の遺伝子構築の導入が必要となる。それら全てが導入された細胞を高効率に選択するための手法が以降の解析に必須となると考え、ピューロマイシン耐性遺伝子 puromycin-N-acetyltransferase (PAC) に基づく「分割型薬剤耐性マーカー」の開発を試みた。

【材料・方法と結果】先行研究に基づき、 $\beta 1$ -integrin の輸送に関与する AMAP1 が CAIX の局在を制御する可能性を見出した。免疫沈降により AMAP1 が CAIX と同一の複合体に含まれること、siRNA による AMAP1 の発現抑制は CAIX の発現量を著明に減少させることを確認した。またビオチン標識試薬等を用いた解析から、AMAP1 の発現抑制は CAIX の

細胞表面量を顕著に減少させることも確認した。阻害剤を用いた解析から、AMAP1 の発現抑制は CAIX のリソソームへの輸送とタンパク質分解を誘導することが示唆された。AMAP1 による CAIX の輸送制御には PRKD2 が関与すること、また予想外の結果として、AMAP1 は PIAS3 と HIF-1 α を介して CAIX の転写を促進することが示唆された。以上の結果は複数の乳癌細胞株を用いた解析や、乳癌患者の遺伝子発現データベースの解析により支持された。

「分割型薬剤耐性マーカー」は複数の異なる split-intein によるタンパク質間スプライシングを利用して確立した。異なる箇所 PAC を分割して split-intein を付加し、赤色または緑色の蛍光タンパク質をバイストロニックに発現するベクターに組み込み、対となる N 末側/C 末側断片を細胞に同時導入してピューロマイシンで選択した。選択後の細胞で、赤色・緑色蛍光タンパク質の同時発現効率と、異なるピューロマイシン濃度下での増殖率を解析した。分割点の違いにより、前者に差異は無く、後者には大きな差異が見られた。

「最適分割点」は高濃度のピューロマイシン存在下で高い増殖率を示すものとした。以上を各 split-intein で解析し、各々の最適分割点を組み合わせて「多分割型 PAC 遺伝子」を作成した。これにより、最大 4 つの遺伝子構築について、全てが導入された細胞をピューロマイシン単独で選別することが可能となった。

細胞特異的な糖代謝制御は、哺乳類で代謝されない「グルコース前駆体」に特異的な輸送体と、その前駆体をグルコースに変換する代謝酵素を細胞に発現させることで可能となった。グルコース不含培地に当該前駆体を加えると、それらの輸送体・代謝酵素を発現する細胞のみが解糖系代謝を行う。このシステムを SIGHT (selective incorporation of glucose via hydrolysis after transport) と名付けた。これらの輸送体・代謝酵素を上述の新規薬剤マーカーを利用してがん細胞に高効率で発現させると、当該前駆体を含むグルコース不含培地で生存・増殖が維持された。SIGHT を発現しない親株細胞は、この条件下で死滅した。このシステムを用いて、単一の培養器具中で糖充足細胞と糖欠乏細胞を共存させると、後者の細胞も生存すること、すなわち「代謝協調」が再現できることを確認した。代謝産物解析から、後者の細胞では解糖系代謝が著しく抑制されるが、エネルギーや酸化還元状態は維持されることが示唆された。現在、糖充足状態の細胞に由来する (グルコース不含の) 馴化培地を用いて、糖欠乏状態の細胞が利用する代謝産物の同定を進めている。