



Title	癌悪性度進展の分子基盤の解明
Author(s)	大塚, 勇太郎; Otsuka, Yutaro
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12987
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88958
Type	doctoral thesis
File Information	Yutaro_Otsuka.pdf



学 位 論 文

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

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

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
参考論文目録	2 頁
略語表	4 頁
序章	7 頁
第一章 -頭頸部扁平上皮癌の悪性度進展における Arf6 経路の利用-	
諸言	21 頁
材料と方法	24 頁
実験結果	28 頁
考察	44 頁
第二章 -MMTV-PyMT マウスの悪性度進展における Arf6 経路の利用-	
諸言	45 頁
材料と方法	48 頁
実験結果	54 頁
考察	73 頁
第三章 -上皮間充織転換におけるミトコンドリアダイナミクス-	
諸言	75 頁
材料と方法	79 頁
実験結果	82 頁
考察	96 頁
第四章 -古典統計学を超えた新規解析理論の必要性について-	
諸言	97 頁
考察	97 頁
総括および結論	101 頁
謝辞	103 頁
引用文献	105 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Otsuka Y, Sato H, Oikawa T, Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Fukunaga K, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H. High expression of EPB41L5, an integral component of the Arf6-driven mesenchymal program, correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma of the tongue. Cell Communication and Signaling. 14: 28, 2016.
2. Otsuka Y, Oikawa T, Yoshino H, Hashimoto S, Hashimoto A, Handa H, Yamamoto H, Sabe H. Frequent overexpression of AMAP1, an Arf6 effector in cell invasion, is characteristic of the MMTV-PyMT rather than the MMTV-Neu human breast cancer model. Cell Communication and Signaling. 16: 1. 2018.

本研究の一部は以下の学会および研究会に発表した。

1. 大塚勇太郎
「EMT 過程におけるミトコンドリアダイナミクス」
第9回シグナルネットワーク研究会
2016年6月9日-10日 横浜
2. 大塚勇太郎, 及川司, 佐邊壽孝
「MMTV-PyMT マウスは悪性度進展に Arf6 経路を利用する」
第3回北大・部局横断シンポジウム
2018年1月26日 札幌

なお、主に第三章の内容において未発表のデータを含む。

参考論文目録

以下の論文を参考論文として添える。

1. Menju T, Hashimoto S, Hashimoto A, Otsuka Y, Handa H, Ogawa E, Toda Y, Wada H, Date H, Sabe H.
Engagement of overexpressed Her2 with GEP100 induces autonomous invasive activities and provides a biomarker for metastases of lung adenocarcinoma.
PLoS One. 6: e25301, 2011.
2. Kinoshita R, Nam JM, Ito YM, Hatanaka KC, Hashimoto A, Handa H, Otsuka Y, Hashimoto S, Onodera Y, Hosoda M, Onodera S, Shimizu S, Tanaka S, Shirato H, Tanino M, Sabe H.
Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy.
PLoS One. 8: e76791, 2013.
3. Hashimoto S, Hashimoto A, Sugino H, Yoshikawa A, Handa H, Yoshino M, Otsuka Y, Sabe H.
ArfGAPs: not only for the termination.
In "Ras-superfamily small G-proteins: biology and mechanisms" Vol. 2 pp253-274. (Ed. F. Wittenghofer, Springer Pub.) 2014.
4. Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H.
P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance.
J Cell Biol. 213: 81-95, 2016.
5. Tanaka N, Kosaka T, Miyazaki Y, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Uhlén P, Suematsu M, Oya M.
Acquired platinum resistance involves epithelial to mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBXO32 dysregulation.
JCI Insight 1: e83654, 2016.

6. Oikawa T, Otsuka Y, Onodera Y, Horikawa M, Handa H, Hashimoto S, Suzuki Y, Sabe H.

Necessity of p53-binding to the CDH1 locus for its expression defines two epithelial cell types differing in their integrity.

Sci Rep. 8: 1595, 2018.

略語表

Arf	ADP-ribosylation factor
ACAP	ArfGAP with coiled-coil, Ankyrin repeat and PH domain
ADAP	ArfGAP with dual PH domains
AGAP	ArfGAP with GTPase domain, Ankyrin repeat and PH domain
AGFG	ArfGAP with FG repeats
Agt	angiotensinogen
AMAP1	a multiple-domain ArfGAP protein 1
ARAP	activation-dependent, raft-recruited ADAP-like phosphoprotein
ARNO	Arf nucleotide-binding site opener
ATCC	American type culture collection
ATP	adenosine triphosphate
BIG	Brefeldin A-inhibited GEF
BPB	bromophenol blue
BRAG	Brefeldin A-resistant Arf-GEF
B2m	β -2 microglobulin
Calca	calcitonine
CBB	coomassie brilliant blue
Cdc42	cell division control protein 42 homolog
CK8	cytokeratin 8
CYH	cytohesin
Cyp11a1	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDEF1	development and differentiation enhancing factor 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECL	enhanced chemi-luminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EFA6	exchange factor for Arf6
EGFR	epidermal growth factor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EMT-TF	epithelial-mesenchymal transition related transcription factor
EPB41L5	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
ER	estrogen receptor
ERM	ezrin, radixin, moesin

FBX	F-box protein
FERM	4.1 protein, ezrin, radixin, moesin
Fis1	fission 1
FOXO3	forkhead box O3
GAP	GTPase activating protein
GBF	Golgi Brefeldin A-resistant GEF
GDI	guanosine diphosphate dissociation inhibitor
GDP	guanosine diphosphate
GEA	guanine nucleotide exchange on Arf
GEF	guanine nucleotide exchanging factor
GEO	gene expression omnibus
GEP100	guanine nucleotide-exchange protein 100-kDa
GGA	Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding
GIT	GIT ArfGAP
GST	glutathione S-transferase
GTP	guanosine triphosphate
HE	hematoxylin eosin
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
IgG	immunoglobulin G
IQSEC1	IQ motif and Sec7 domain 1
IRES	internal ribosomal entry site
KLF8	Kruppel Like Factor 8
Mfn1/2	mitofusin 1/2
MMTV	mouse mammary tumor virus
MMP	matrix metalloprotease
MVP	mevalonate pathway
NB41L	novel band 4.1 like
NCBI	national center for biotechnology information
OCT	optimal cutting temperature
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
Opa1	optic atrophy 1
OXPHOS	oxidative phosphorylation
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAG2	PIP ₂ -dependent Arf1 GAP 2
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

PD-1	programmed cell death-1
PgR	progesterone receptor
PH	pleckstrin homology
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PTPH	protein-tyrosine phosphatase H
PyMT	polyomavirus middle T antigen
PVDF	polyvinylidene difluoride
PZA	PH domain, Zinc-finger, Ankyrin repeat
QOL	quality of life
Rab	Ras-related in brain
Ran	Ras-related nuclear protein
Ras	rat sarcoma
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rho	Ras homologous
RREB1	Ras responsive element binding protein 1
RT	reverse transcription
RTKs	receptor tyrosine kinases
SDS	sodium dodecyl sulfate
Sec7	secretory 7
shRNA	short hairpin ribonucleotide
SH3	Src homology 3
siRNA	short interference ribonucleotide
SMAP	small ArfGAP
TBS	tris-buffered saline
TBST	tris-buffered saline with Tween-20
TCGA	the cancer genome atlas
TCF3	transcription factor 3
TOP	terminal oligopyrimidine
UBP1	upstream binding protein 1
UTR	untranslated region
WB	western blotting
WT	wild type
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1

序章

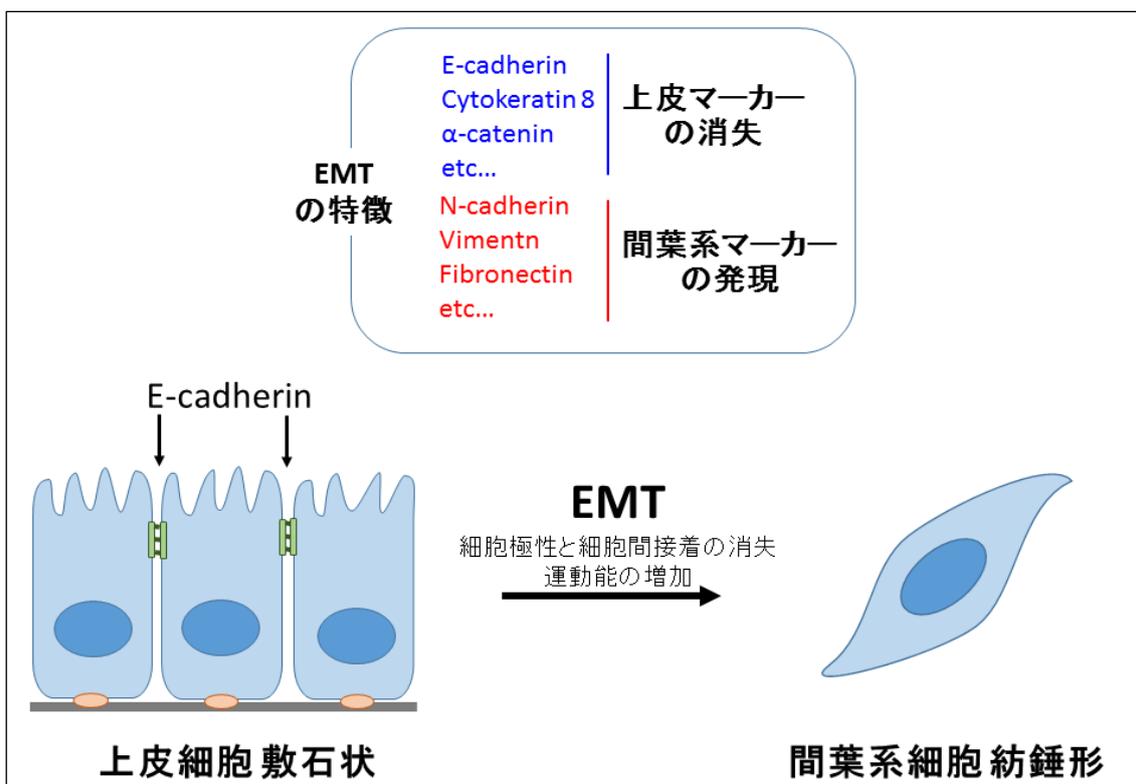
がんについて

がんは本邦における最大の死亡原因疾患である¹。全世界においても毎年 800 万人を超える人々が、がんにより命を落としており、特に先進国においては重大な死亡要因となっている²。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いる³。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。細胞が腫瘍化すると無秩序な増殖と脱分化が起こることが多く、病巣部分では正常組織が圧排もしくは変質することにより多彩な症状が現れる³。またホルモン分泌腫瘍など生理活性物質を分泌する腫瘍も知られており、これにより種々の症状が現れることもある³。細胞の腫瘍化に際しては遺伝子変異が重要であり、特に細胞増殖のアクセルとなるタンパク質の発現上昇もしくは異常活性化をきたし、同時に細胞増殖のブレーキとなるタンパク質の発現減少もしくは活性低下を伴うことによって無秩序な増殖が引き起こされる⁴。これにより正常細胞よりも高頻度で遺伝子異常の蓄積が起こり、細胞の性質が変質していく。この変質の過程で、細胞の幼若化が起こり、正常細胞としての機能を失うばかりか、本来上皮由来でほとんど運動能を持たないはずの細胞が強い運動能のみならず、局所浸潤能、足場非依存性増殖能、薬剤抵抗性、放射性抵抗性といった性質を次第に獲得していくと考えられている⁴。さらにそこに化学療法や放射線療法といった治療による「選択圧」がかかることにより、根治となれば問題はないが、悪性度の増した腫瘍細胞群が生まれ、それによる再発を起こす可能性が生まれてくると考えられる。

がんの悪性度進展

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。たとえば、特に乳癌においては、「発癌初期播種」という概念が提示され臨床的にも十分証拠立てられている⁵。これは、発癌の極初期段階であっても、腫瘍化細胞が脈管系を介して骨髄をはじめ全身性に浸潤・播種し、長年にわたる休眠期間を経て、その間に更なるゲノム変化を蓄積しながら転移部を形成するというものである。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⁶。EMTは正常な胚発生においてみられる現象で、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⁶。上皮由来の腫瘍細胞が浸潤能、転移巣形成能、治療抵抗性を獲得するためにこのEMTが重要であるという議論が古くからなされている。とはいえ、EMTが起こると運動能獲得に連動して細胞の幼若化や治療抵抗性が獲得されるとする論調や⁷、対してEMTは治療抵抗性の獲得にのみ関与し転移形成には影響を及ぼさないと主張するグループもあり^{8,9}、多くの議論を引き起こしている。例えば上皮マーカーであるE-cadherinと間葉系マーカーであるVimentinを同時に発現するような不完全なEMTを起こした細胞というのも頻りに観察され、こういった特徴をもってEMTを起こしたとするのが良いのか、また、連続的変化であるEMTがどの時点で起こったかを議論すること自体が非常に難しいという問題もこのような現状を生み出す原因と考えられる。そうした中、今後のより効果的ながんの予防・診断・治療、並びに、再発予防と再発部の治療法等の進展に大きく寄与するべく、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こそがん研究における大きな課題である。



図A 癌的EMTの模式図

癌的EMTの模式図を示した¹⁰。上皮由来の細胞が間葉系細胞の性質を獲得するEMTが癌の悪性度進展に関与することは古くから議論されている。

低分子量 G タンパク質 (Ras superfamily) について

低分子量 G タンパク質は 20-30kDa の GTP (guanosine triphosphate, グアノシン三リン酸) 結合タンパク質の総称である¹¹。GTP との結合で活性化し、GDP (guanosine diphosphate, グアノシン二リン酸) への加水分解によりその機能を果たし、さらにその GDP を GTP へと交換することにより再活性化する。この性質から低分子量 G タンパク質は細胞内シグナル伝達の分子スイッチとしてはたらくことが知られている¹¹。低分子量 G タンパク質は N-末端側に存在する G-box と呼ばれる領域によって GTP や GDP と強く結合するが、GTP の加水分解や GDP を GTP に交換するような活性は一般的に低い¹¹。ゆえに前者の過程では GAP (GTPase activating protein, GTP アーゼ活性化タンパク質) という因子が協調的にはたらき、後者の過程では GEF (guanine nucleotide exchanging factor, グアニンヌクレオチド交換因子) という因子が協調的にはたらき¹¹。GAP や GEF には作用する低分子量 G タンパク質に特異性をもっており、そのことが外部からの活性化刺激に際してどの種類のスイッチをリクルートし、どの経路を活性化させるのかという選択に寄与すると考えられる。代表的な低分子量 G タンパク質として、主要ながん遺伝子 *RAS* (Rat sarcoma から命名) の産物があることから、低分子量 G タンパク質は Ras superfamily とも呼称される¹¹。

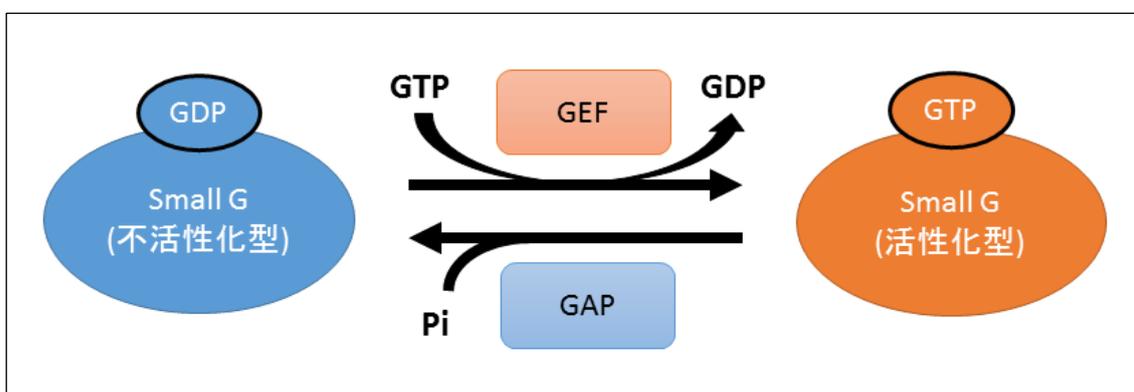


図 B 低分子量 G タンパク質の活性化-不活性化様式とその制御

低分子量 G タンパク質の活性化-不活性化サイクルの模式図を示した。低分子量 G タンパク質は結合するグアニンヌクレオチドによりその活性が制御されている。また活性調節に際しては GDP を GTP に交換する GEF と GTP 加水分解を促進する GAP が協調的に作用する。

Ras superfamily の下位分類

Ras superfamily はその機能や構造に基づいて、大きく Ras family, Rho (Ras

homologous) family, Ran (Ras-related nuclear protein) family, Rab (Ras-related in brain) family, Arf (ADP-ribosylation factor) family の 5 グループに分類される¹¹. Ras family には MAPK カスケードのスタートとなる K, H, N-Ras やその下流で活性化する Ral など細胞増殖を制御するシグナル系に関わるタンパク質が属している^{11,12}. Rho family には RhoA, Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) や Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) など細胞骨格のリモデリングや細胞極性の形成に関わるタンパク質が属している^{11,13}. Ran family には Ran のみが属しており、核-細胞質間の物質輸送に関与している^{11,14}. Rab family と Arf family には小胞輸送に関与するタンパク質が属しており、これら低分子量 G タンパク質同士が協調してはたらく例もよく知られている^{11,15,16}. ここでは代表的な機能を列挙したが、Ras superfamily に属するタンパク質は多機能性を持つことが多く、細胞内のあらゆるシグナルネットワークに関与していると考えられる。

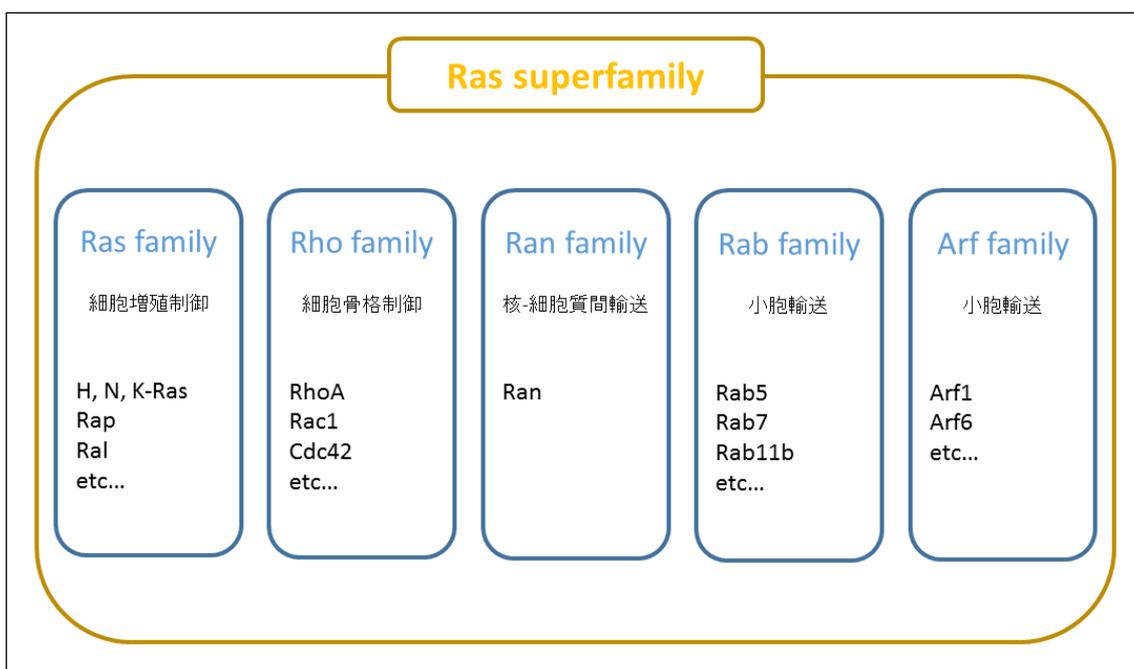


図 C Ras superfamily の下位分類

Ras superfamily の下位分類とそれぞれの family の代表的機能と代表的なタンパク質を示す。

Arf6 について

Arf6 は、Arf ファミリータンパク質の一つで、細胞の膜輸送、クラスリン依存/非依存のエンドサイトーシス、アクチンリモデリングを介した膜の突出、小胞のリサイクリングなど細胞内の多彩な機能を制御する^{11,16}. Arf ファミリータン

タンパク質は比較的古いグループで酵母においても見出される¹¹. Arfファミリータンパク質は、ヒトにおいては class I Arf (Arf1,3), class II Arf (Arf4,5), class III Arf (Arf6) に細分され、それぞれに持つ役割や局在が異なっている^{11,16}. Class I Arf と Class II Arf は主にゴルジ体周辺に存在して膜構造の維持に関与し, class III Arf は主に細胞膜上や早期エンドソームに存在し, 上述のような機能をもつ. Arf タンパク質は N 末端部のミリスチル化修飾を受けたグリシン残基とそれに続く疎水性ヘリックス構造により細胞膜や小胞膜に突き刺さる^{11,16}. この疎水性領域と, GDP/GTP サイクルによって構造変化を起こす“スイッチ領域”が他の Ras superfamily タンパク質よりも近接しているため, 膜のごく近傍で起こる変化を制御することができる. GDP 結合型 Arf では N 末端周辺が内側に折りたたまれており, 膜との結合能は低いが, GTP 結合型では N 末端が飛び出すような構造変化を起こし, ひとたびここにミリスチル化修飾を受けると以降の膜結合能が上昇する^{11,16}. Arf1 や Arf3 では GTP を加水分解して GDP 結合型となると一旦膜から離れるが, Arf4, Arf5, Arf6 においては膜に結合したままであることが知られている^{11,16}. この明確なメカニズムは明らかとなっていないが, GTP 結合型の時には Arf1 と Arf6 で構造がほとんど同一であるのに対し, GDP 結合型では Arf1 と Arf6 の構造が大きく異なることから, 何らかのタンパク質との相互作用により膜付近に係留されているという可能性が示唆されている¹⁶. また Arf6 が膜から離れるためには Mg^{2+} の存在が必要であるという文献¹⁷ もあり, 複雑な制御機構の存在が伺える. Arf タンパク質は他の Ras superfamily タンパク質と違って GDI (guanosine diphosphate dissociation inhibitor, GDP 乖離阻害タンパク質) を持たず, その GDP/GTP サイクルは ArfGEF と ArfGAP によって制御されている^{11,16,18}. ヒト組織内における Arf6 タンパク質発現状況を図 E に示す.

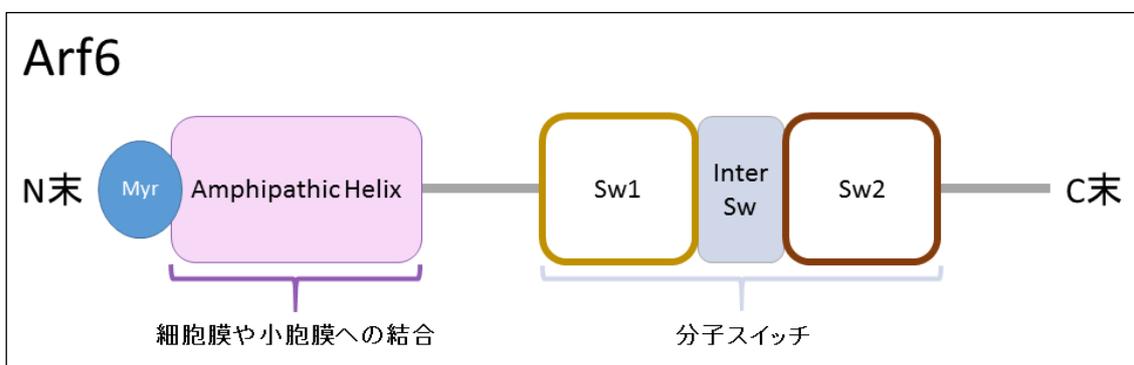


図 D Arf6 の主なドメイン構造

Arf6 タンパク質のドメイン構造を模式図で示した¹⁶.

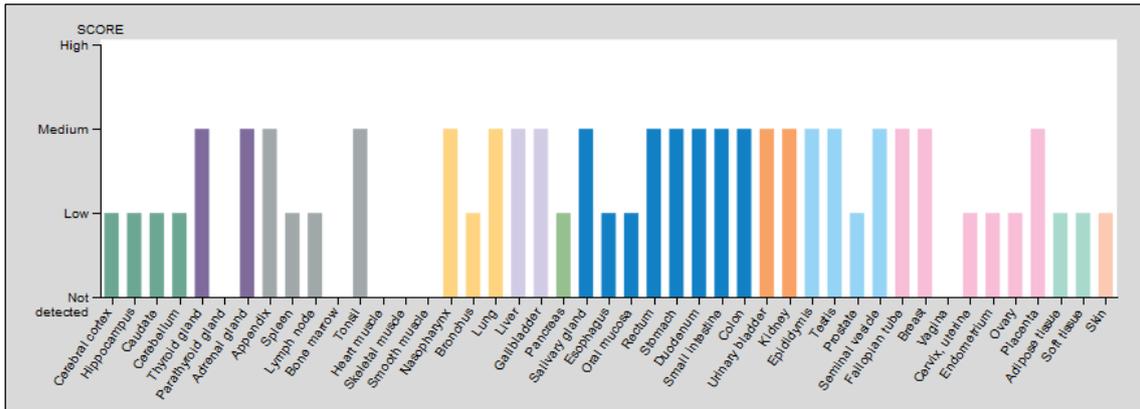


図 E ヒト各組織における Arf6 タンパク質の発現状況

Arf6 タンパク質のヒト各組織における発現状況を示した。The Human Protein Atlas¹⁹⁻²² の図 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165527-ARF6/tissue>) を転載した。広範な組織で低度のタンパク質発現を認める。

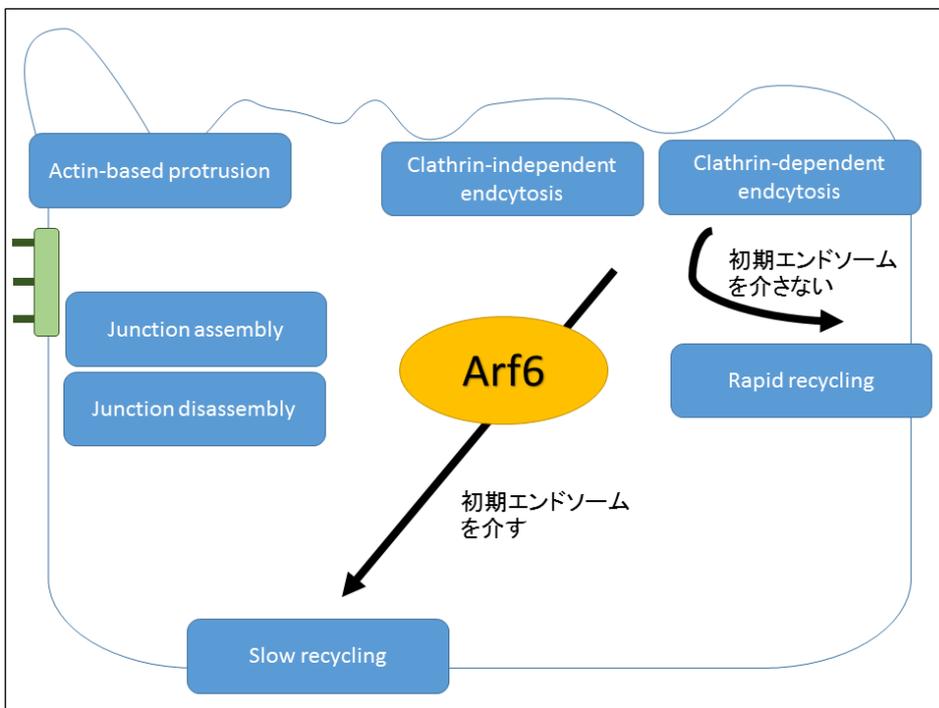


図 F 細胞内における Arf6 の主な機能

Arf6 の細胞内における機能を模式図で示した。エンドサイトーシスやリサイクリング、細胞骨格のリモデリングなど、多様な因子と共同して多様な機能を制御している¹⁶。

GEP100 について

哺乳類における ArfGEF は CYH (cytohesin), BIG (Brefeldin A-inhibited

GEF) /Sec7 (secretory 7), GBF (Golgi Brefeldin A-resistant GEF) / GEA (Guanine nucleotide exchange on Arf), BRAG (Brefeldin A-resistant Arf-GEF), EFA6 (exchange factor for Arf6), FBX (F-box protein) の 6 つの subfamily に分類され、ヒトにおいては 15 種類のタンパク質が知られている^{11,23}. その中でも Arf6 に高い特異性を示すのが BRAG2/IQSEC1 (IQ motif and Sec7 domain 1) / GEP100 (guanine nucleotide-exchange protein 100-kDa) と EFA6 と ARNO (Arf nucleotide-binding site opener) / CYH2 の 3 種類である^{11,23}. 本研究室ではこのうち GEP100 が乳癌の悪性度進展において重要な役割を担うことを報告してきた^{24,25}. GEP100 は Ca²⁺ 依存性にカルモジュリンと結合可能な両親媒性 7 回ターン α -ヘリックスを形成する IQ ドメイン (I はイソロイシン, Q はグルタミンの一文字表記), GEF 活性を有する Sec7 ドメイン, ホスホイノシチドに結合可能な β -シート構造を形成する PH (プレクストリン相同, pleckstrin homology) ドメインを持つ ArfGEF であるが, 高悪性度の乳癌細胞においては, 活性化した EGFR (上皮成長因子受容体, epidermal growth factor receptor) の自己リン酸化部位にこの GEP100 が PH ドメインを介して直接結合し, Arf6 を膜近傍にリクルート, 活性化することを示した²⁴. これにより外部刺激に反応して Arf6 以下のシグナル経路が形成されることとなる. なお GEP100 はヒトをはじめとする哺乳類, 鳥類, 魚類などで保存が確認されている²⁶⁻²⁸. ヒト組織内における GEP100 タンパク質発現状況を図 I に示す.

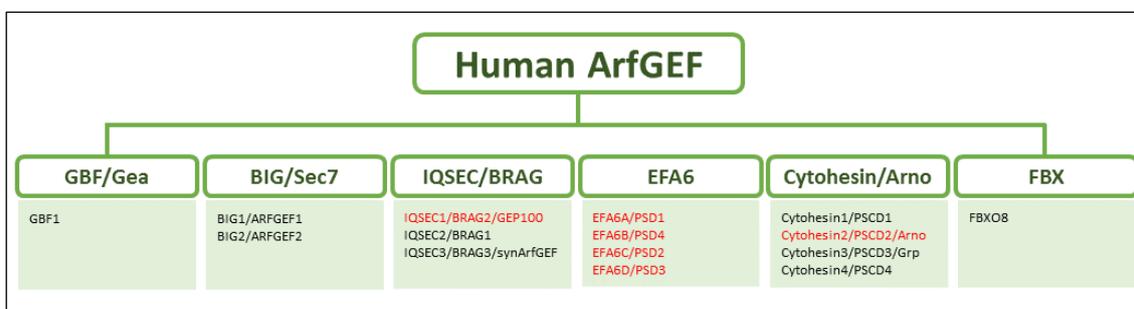


図 I *G ArfGEF* の分類

ヒトにおける *ArfGEF* は 6 つの *subfamily* に分類される. これまで報告のある 15 種類のうち, *Arf6* に特異性の高いものを赤字で示した.

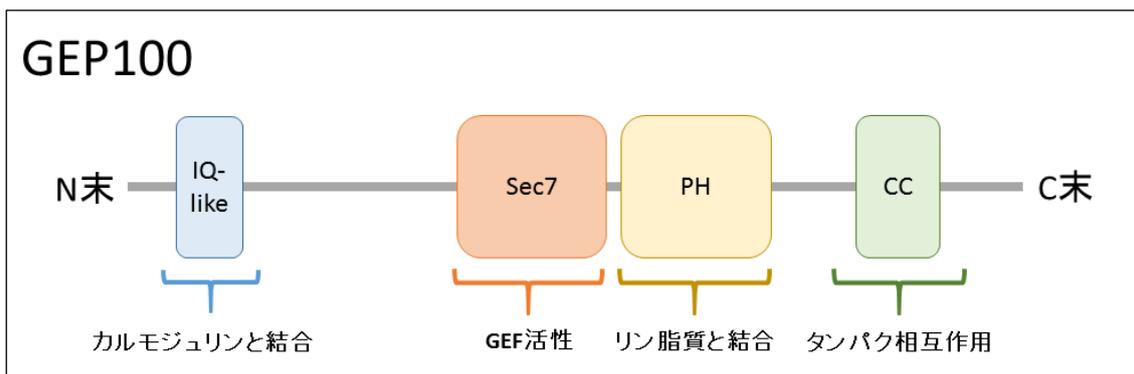


図 H GEP100 の主なドメイン構造

GEP100 タンパク質のドメイン構造を模式図で示した。

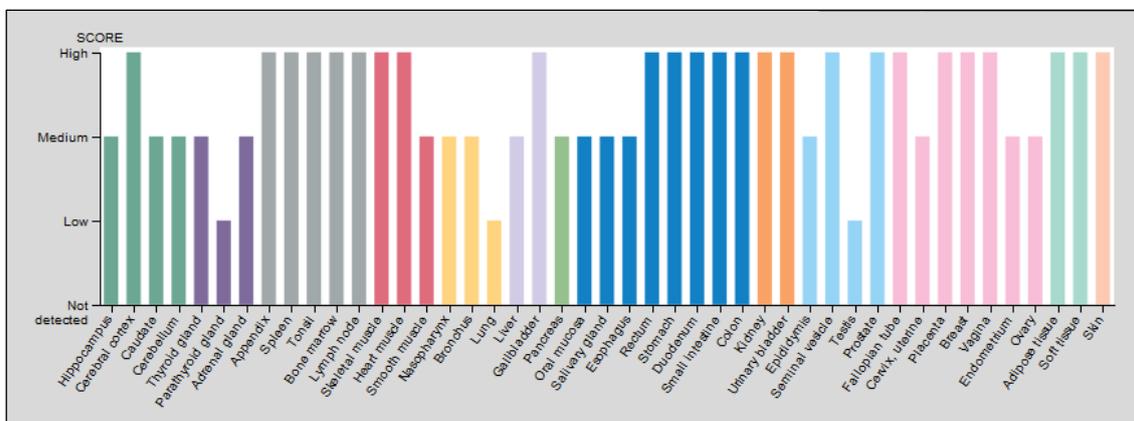


図 I ヒト各組織における GEP100 タンパク質の発現状況

GEP100 タンパク質のヒト各組織における発現状況を示した。The Human Protein Atlas¹⁹⁻²² の図 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000144711-IQSEC1/tissue>) を転載した。広範な組織で高度のタンパク質発現を認める。

AMAP1 について

AMAP1 (a multiple-domain ArfGAP protein 1) は ArfGAP の一種である^{11,16}。AMAP1 は様々な別称を持ち, ASAP1 (ArfGAP with SH3 domain, Ankyrin repeat and PH domain 1) / PAG2 (PIP2-dependent Arf1 GAP 2) / DDEF1 (development and differentiation enhancing factor 1) などと呼ばれる²⁹。ArfGAP はヒトにおいては ARFGAP1, ARFGAP2/3, SMAP (small ArfGAP), AGFG (ArfGAP with FG repeats), ACAP (ArfGAP with coiled-coil, Ankyrin repeat and PH domain), AGAP (ArfGAP with GTPase domain, Ankyrin repeat and PH domain), ADAP (ArfGAP with dual PH domains), GIT (GIT ArfGAP), ASAP, ARAP (activation-dependent, raft-recruited ADAP-like phosphoprotein) の 10 の subfamily に分類される^{11,16}。AMAP1 の ArfGAP ド

メイン内には進化的に高度に保存されたジンクフィンガーモチーフが存在する。このジンクフィンガーモチーフは近傍に存在する PH ドメイン、アンキリン反復配列とともに AMAP1 の GAP 活性に必要とされる最小サブユニットである PZA (PH domain, Zinc-finger, Ankyrin repeat) モジュールを構成する³⁰。この配列も進化的によく保存され、植物や昆虫においても見出される。このことは、AMAP1 の GAP 活性が PH ドメインを介したホスホイノシチドの結合によって調整されていることを示唆する。一方で PIP₂ が Arf6 と相互作用することも知られており、ホスホイノシチドの存在、つまりは細胞膜や小胞膜の近傍にこれらのタンパク質が存在しているということは、Arf6 の活性調節に二重の役割を果たす³⁰。AMAP1 はこのように Arf6 の GAP としての機能を有するが、その活性は低く、むしろエフェクターとしての機能の方が重要であると考えられている^{11,16}。実際 AMAP1 は SH3 (Src homology 3) ドメインを有しており、様々なタンパク質と相互作用し、Arf6 の局在する細胞膜や小胞のごく近傍に足場を形成することが知られている。私の所属する分子生物学分野では、AMAP1 が SH3 ドメインを介して Cortactin や PRKD2、のちに詳述する EPB41L5 と相互作用することによって細胞の遊走能を上昇させることを明らかにした。ヒト組織内における AMAP1 タンパク質発現状況を図 L に示す。

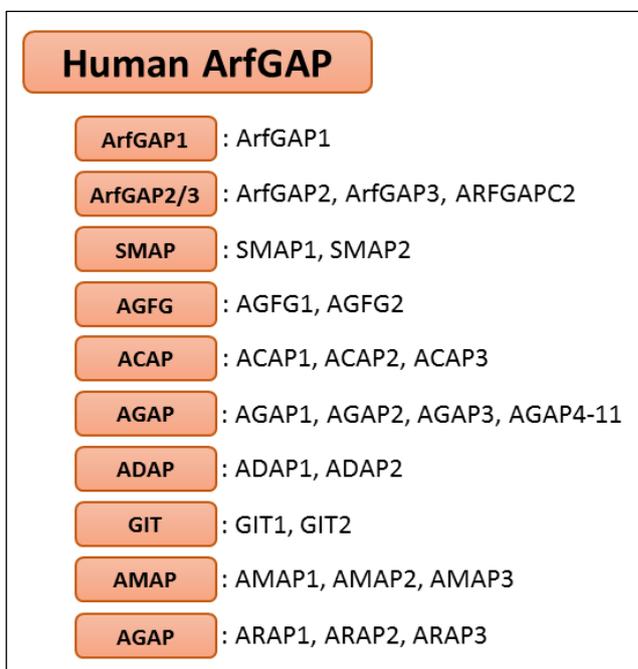


図 J ArfGAP の分類

ヒトにおける ArfGAP は 10 の subfamily に分類される。これまで報告のある 25 種類の代表的な名称を示した^{11,16}。

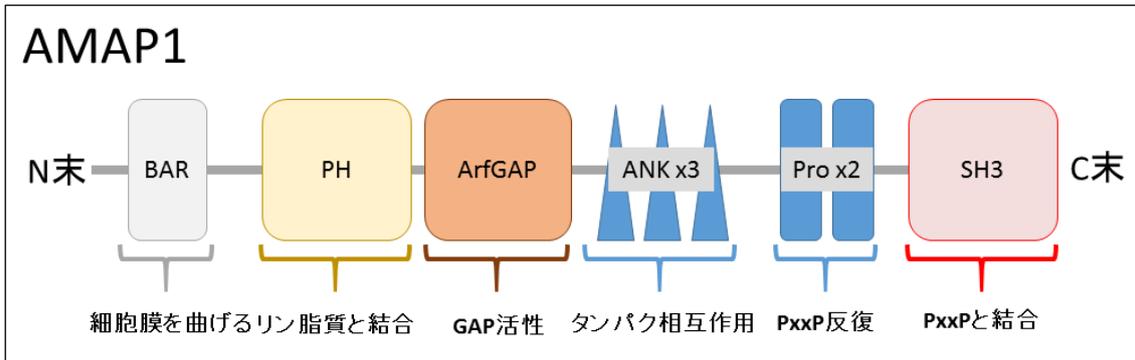


図 KAMAP1 の主なドメイン構造

AMAP1 タンパク質のドメイン構造を模式図で示した¹⁶.

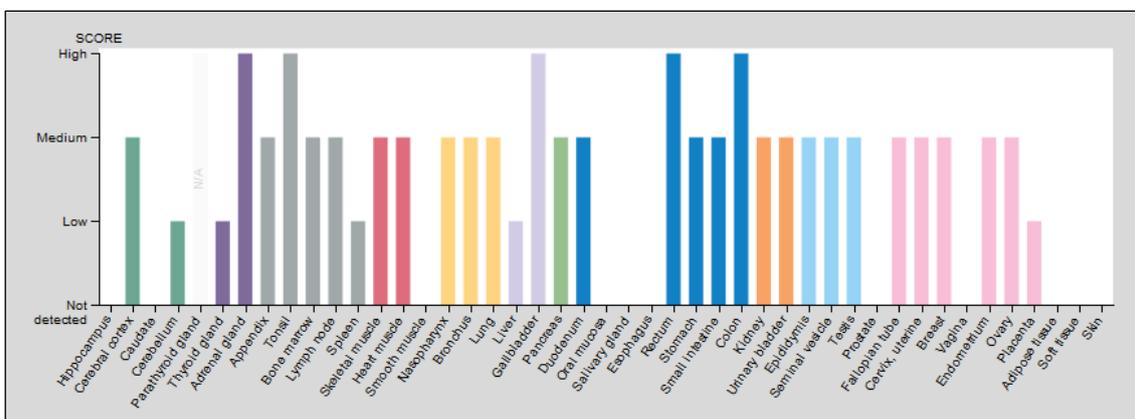


図 L ヒト各組織における AMAP1 タンパク質の発現状況

AMAP1 タンパク質のヒト各組織における発現状況を示した. *The Human Protein Atlas*¹⁹⁻²² の図 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153317-ASAP1/tissue>) を転載した. *Arf6* と似て, 広範な組織で低度のタンパク質発現を認める.

EPB41L5 について

EPB41L5 は N 末端側に FERM (4.1 protein, ezrin, radixin, moesin) ドメインを持ち, C 末端側にアクチン結合能を有することにより特徴づけられる Band 4.1 superfamily に属している^{31,32}. Band 4.1 superfamily に属するタンパク質は細胞膜のごく近傍において, 膜タンパク質と細胞骨格の双方に相互作用することが知られている³³. Band 4.1 superfamily はその C 末端の構造により Band 4.1, PTPH (protein-tyrosine phosphatase H), ERM (ezrin, radixin, moesin), talin, NB41L (novel band 4.1 like) の 5 種類の family に分けられる³¹. NB41L family タンパク質はアクチン結合領域が欠損した独特な C 末端を持つ. この

NB41L family はさらに EPB41L4a と EPB41L5 の family に細分され、EPB41L5 family には EPB41L5 以外に、EPB41L4b/Ehm2 も属している。EPB41L5 family に属するタンパク質は、脊椎動物においては EPB41L5 と EPB41L4b が保存されているが、ショウジョウバエにおいては Yurt と呼ばれる EPB41L5 のオルソログ 1 種類のみが存在する³⁴。これまでショウジョウバエの Yurt とゼブラフィッシュの Mosaic Eyes (いずれも EPB41L5 のオルソログ) が Crumbs のオルソログとの結合を介して上皮性維持に関与することが報告されている³⁴⁻³⁶。また、私の所属する分子生物学分野ではこれまで、マウス乳腺細胞やヒト乳癌細胞においてこの EPB41L5 が EMT 過程において発現上昇し、N 末端においては E-cadherin の裏打ちである p120 catenin と、C 末端においては接着斑の構成因子である paxillin と相互作用し、E-cadherin のエンドサイトーシスと integrin のリサイクリングに関与することを明らかにした³²。ヒト組織内における EPB41L5 タンパク質発現状況を図 N に示す。

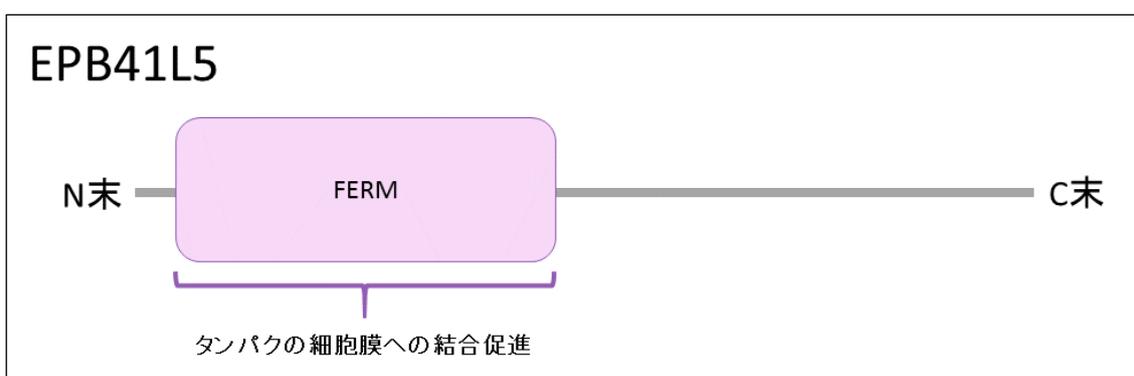


図 M EPB41L5 の主なドメイン構造

EPB41L5 タンパク質のドメイン構造を模式図で示した³²。

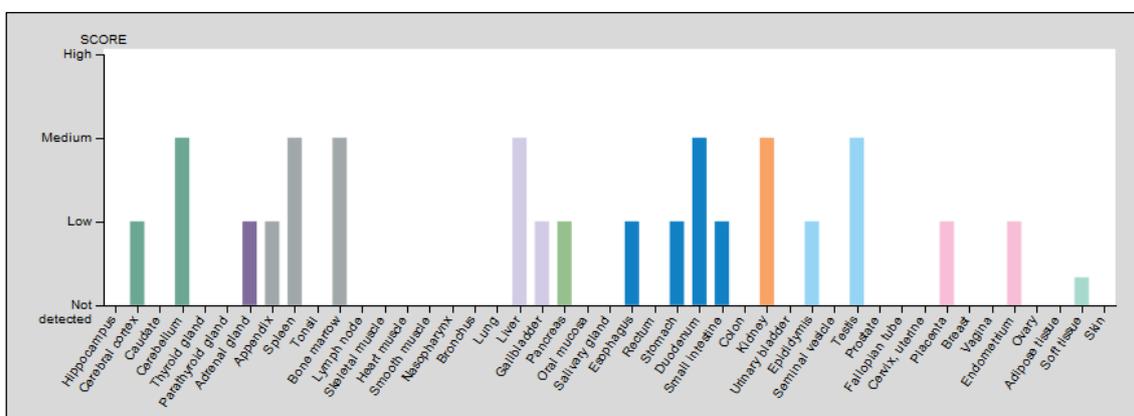


図 N ヒト各組織における EPB41L5 タンパク質の発現状況

EPB41L5 タンパク質のヒト各組織における発現状況を示した。The Human

Protein Atlas 19-22 の図 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115109-EPB41L5/tissue>) を転載した。散発的に低度のタンパク質発現を認める。

腫瘍細胞における Arf6 経路活性化と悪性度進展

RTKs (receptor tyrosine kinases)-GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 を主要な構成要素とするシグナル経路を Arf6 経路と称する。私の所属する分子生物学分野ではこれまで、この Arf6 経路が腫瘍細胞の浸潤形質獲得に根幹的な役割を果たすことを示してきた^{24,25,32,37-49}。乳癌や肺腺癌においては、EGFR 刺激により GEP100 がリクルートされ、Arf6 が活性化され、以下 ArfGAP として分類される AMAP1 をエフェクターとして EPB41L5 や PRKD2 といった分子が相互作用し、E-cadherin のエンドサイトーシスや β 1-integrin のリサイクリングを促進する^{24,25,32,37-40,43,47}。この経路の形成は、TGF β 受容体や HGF の受容体である c-Met などでも引き起こされることを報告している^{25,47}。腎淡明細胞癌においては、RTKs の代わりに G タンパク質共役型受容体である LPAR (lysophosphatidic acid receptor, リゾホスファチジン酸受容体) が、GEP100 ではなく Arf6 特異的 GEF の一種 EFA6 をリクルートし Arf6 経路を活性化することも報告している⁴⁸。また、AMAP1 は接着斑を形成する paxillin や Actin remodeling に関与する cortactin といったタンパク質とも相互作用し、間葉系の形質を担保することに寄与している^{39,40}。間葉系タンパク質の EPB41L5 は乳癌においては、いわゆる EMT-TF (上皮間充織転換誘引転写因子, EMT-transcription factor) の一つである ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) によって発現が制御されており、EMT と Arf6 経路の活性化は密接に関係していることがわかる^{32,47}。機能獲得性変異 p53 が引き起こす EMT においては、変異 p53 の下流でコレステロール生合成経路であるメバロン酸経路が活性化し、Rab11b のゲラニルゲラニル化が促進されることが契機となって Arf6 経路が形成されることを明らかにした²⁵。Arf6 経路が駆動された細胞は、高い運動能・浸潤能・薬剤抵抗性を示し、このことががんの悪性度進展の一端を担うことを報告している。

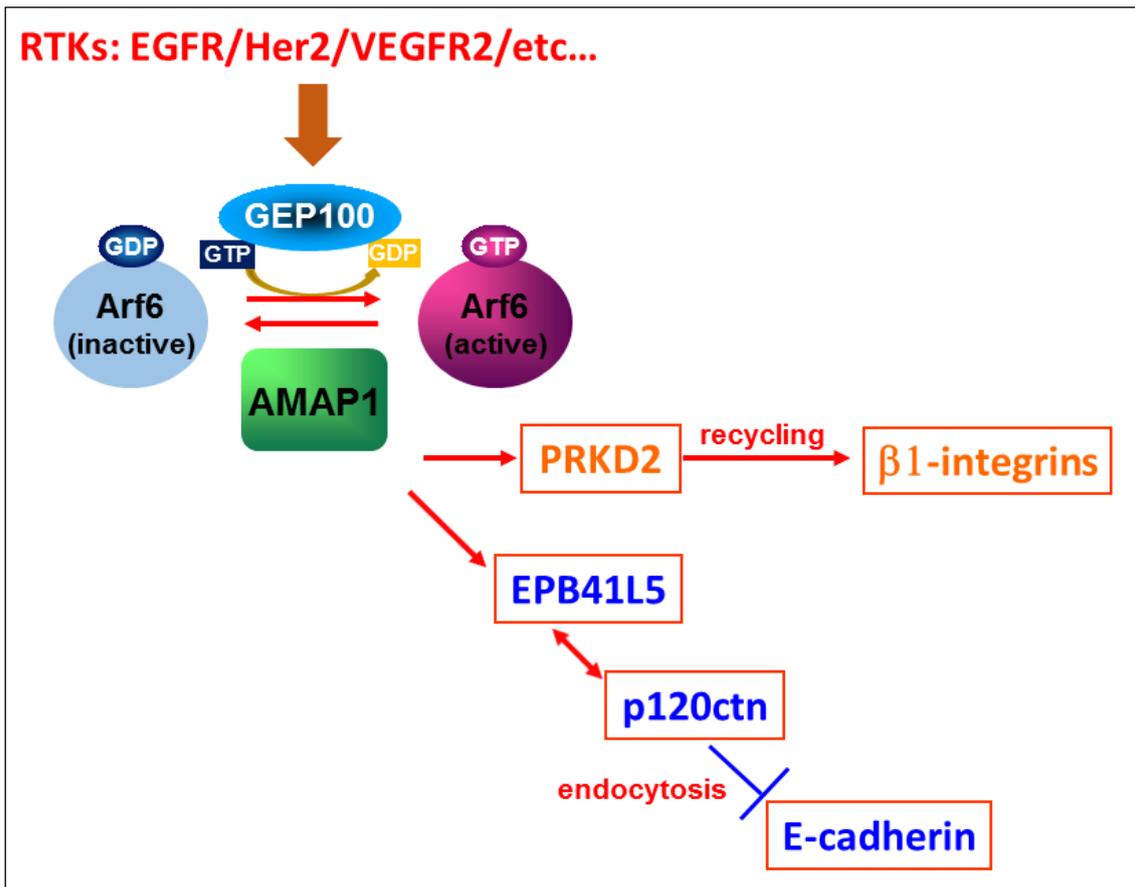


図 O Arf6 経路の模式図

Arf6 経路の模式図を示した. 活性化 RTKs の自己リン酸化部位を認識して Arf6 の GEF である GEP100 がその PH ドメインにより直接結合し, Arf6 をリクルートして活性化する. Arf6 の GAP として同定された AMAP1 は細胞内ではほとんど GAP 活性を示さず, エフェクターとして機能し, EPB41L5 や PRKD2 の足場となり E-cadherin のエンドサイトーシスや β1-integrin のリサイクリングを促進する 24,25,32,37-40,43,47.

本研究について

本研究においては一貫して, 癌悪性度進展と EMT および Arf6 経路との関わりを大きなテーマとして解析した. まず, これまで乳癌や腎臓明細胞癌, 肺腺癌など腺癌細胞において悪性度進展との関わりを論じてきた Arf6 経路に対し, 別の組織系である扁平上皮癌においても同様のはたらきがみられるのか検討した結果を第一章に述べる. この内容の一部はすでに英文科学雑誌上にて公開されている. 第二章では Arf6 経路を浸潤転移に利用している乳癌自然発癌モデルマウスを新たに同定したことを報告する. この内容の一部は現在, 英文科学雑誌に投稿し, 校正を行っている段階である. 第三章では Arf6 経路が活性化する

EMT という過程に着目して細胞内代謝状況の変化とミトコンドリアダイナミクスと細胞機能の変化がどのような関係性を示すかについて述べる。この内容は取り組み始めたばかりのテーマでありまだ論文投稿には不十分ではあるが、2016年に理化学研究所横浜キャンパスにおいて開催されたシグナルネットワーク研究会で口頭による学会発表を行った。第四章においては、実験データは提示しないが、博士課程大学院生として基礎的に学んできたこととこれからの自分の研究の興味・方向付けに関して述べる。

第一章

頭頸部扁平上皮癌の悪性度進展における Arf6 経路の利用

【諸言】

頭頸部扁平上皮癌の臨床的特徴

・疫学

頭頸部扁平上皮癌は世界で毎年新たに約 60 万人が罹患する悪性疾患であり², 本邦においても年間 1 万 5000 人を超える人々が新規に罹患していると推定されている⁵⁰. 現在, 頭頸部扁平上皮癌に対しては, 手術療法, 放射線療法, 分子標的薬や抗癌剤を利用した薬物療法を組み合わせた集学的治療が行われているが, ここ数十年間で決定的な予後の改善は見られていないのが現状である^{51,52}. この治療耐性の分子基盤を明らかにすることが, より有効な治療法の確立と予後評価に有用であることは自明である. 頭頸部扁平上皮癌は高齢男性に多く, 飲酒歴や喫煙歴との相関が指摘されている⁵². また, 中咽頭癌においては HPV (human papilloma virus, ヒト乳頭腫ウイルス) との関連も報告されている⁵². 頭頸部は摂食, 呼吸, 発話をはじめ人間の生命維持に重要な役割を担う部位であり, 頭頸部扁平上皮癌の発症や治療により著しく患者の QOL が阻害される可能性が高い.

・診断, 分類, 治療

頭頸部扁平上皮癌の診断は臨床症状と組織診断により行われる. 特徴的な臨床症状としては腫瘍, 疼痛, 咯血, 呼吸困難, 嚥下困難などが挙げられる. 発生母地としては舌, 口腔底, 歯茎, 上・中・下咽頭, 喉頭, 副鼻腔などである. 組織診断では典型的な扁平上皮癌の特徴を示し, 癌真珠の形成などをみる. 病期分類は TNM 分類に準拠する. T は腫瘍の大きさ, N はリンパ節転移, M は遠隔転移を表すファクターであり, 詳しくは図 1-A に示す. 病期により手術療法, 放射線療法, 薬物療法やそれらを組み合わせた療法, といった治療方針が決定される⁵³. よく使用される抗癌剤としては白金製剤のシスプラチンが挙げられる^{54,55}.

TNM分類

T因子	特徴
T0	原発腫瘍なし
Tis	上皮内癌
T1	最大径 2 cm以下
T2	最大径 2 cmをこえ4 cm以下
T3	最大径 4 cmをこえる
T4a	皮質骨, 舌深層の筋肉 / 外舌筋(オトガイ舌筋, 舌骨舌筋, 口蓋舌筋, 茎突舌筋), 上顎洞, 顔面の皮膚に浸潤する腫瘍
T4b	咀嚼筋間隙, 翼状突起, または頭蓋底に浸潤する腫瘍, または内頸動脈を全周性に取り囲む腫瘍
TX	評価不能

N因子	特徴
N0	所属リンパ節転移なし
N1	同側の単発性リンパ節転移で最大径 3 cm以下
N2a	同側の単発性リンパ節転移で最大径 3 cmをこえ6 cm以下
N2b	同側の多発性リンパ節転移で最大径 6 cm以下
N2c	両側あるいは対側のリンパ節転移で最大径 6 cm以下
N3	最大径 6 cm をこえるリンパ節転移
NX	評価不能

M因子	特徴
M0	遠隔転移なし
M1	遠隔転移あり

病期分類

	T 因子	N 因子	M 因子
0期	T is	N 0	M 0
I 期	T 1	N 0	M 0
II 期	T 2	N 0	M 0
III 期	T 1 / 2	N 1	M 0
	T 3	N 0 / 1	M 0
IV A期	T 1 / 2 / 3	N 2	M 0
	T 4a	N 0 / 1 / 2	M 0
IV B期	T 4b	NIに關係なく	M 0
	TIに關係なく	N 3	M 0
IV C期	TIに關係なく	NIに關係なく	M 1

図 1-A 舌癌の TNM 分類と病期分類

本章の研究に取り組んだ当時の TNM 分類基準を示す。日本癌治療学会ホームページ 53 を参考とした。国際対がん連合による TNM 悪性腫瘍の分類第 7 版 56 に準拠し作成。

頭頸部扁平上皮癌における基礎研究

- ・頭頸部扁平上皮癌の悪性度進展に関するこれまでの研究

頭頸部扁平上皮癌においては 90%以上の症例で EGFR が過剰発現することが報告されており, ヒト化モノクローナル抗体薬であるセツキシマブ (商品名: アービタックス) の使用を検討した臨床試験においてある程度の有効性が示されている 57,58. また cortactin や integrin といった細胞接着因子の高発現が放射線抵抗性を高めることが報告されている 59,60. さらには 2016 年, 免疫チェックポイント分子である PD-1 (programmed cell death 1) のヒト化モノクローナル抗体薬ニボルマブ (商品名: オプジーボ) の頭頸部扁平上皮癌への適応が本邦において認可され 61, 免疫監視の視点からも多くの研究がなされることと思われる。

- ・今後の課題

種々の臨床研究，基礎研究が行われているが，頭頸部扁平上皮癌の決定的な予後改善が見られないことが最大の問題である．全例に共通のとは言わないまでも，何らかの薬剤や放射線療法が著効するポピュレーションをマーカーの発現状況等により提示することが急務であることは明確である．

本研究の意義

- ・頭頸部扁平上皮癌と Arf6 経路

頭頸部扁平上皮癌と Arf6 経路の関係については，本研究室にて行われた北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科分野（当時）所属の佐藤宏紀博士の研究に詳しい⁴⁵．この研究によって Arf6 経路の構成タンパク質である AMAP1 の発現量と頭頸部扁平上皮癌の患者予後との関連が示されている．また佐藤博士の学位論文においては，Arf6 経路の構成タンパク質の一つである EPB41L5 と患者予後との関連が報告されている．

- ・本章における研究内容

本章においてはまず，佐藤博士が学位論文として報告した，「頭頸部扁平上皮癌における EPB41L5 高発現が患者の無病生存率と全生存率とを低下させること」のメカニズムを明らかにすべく，*in vitro*での細胞浸潤性と化学放射線療法抵抗性に関する実験を行った．また，乳癌細胞においては EMT-TF である ZEB1 が EPB41L5 の発現を上昇させることから⁴⁷，EPB41L5 高発現を引き起こす細胞内要因が組織系によって異なるかどうかを検討するため TCGA⁶² (the cancer genome atlas, 現在 genome data commons に統合) データベースに登録されている遺伝子発現データを用いて，腺癌と扁平上皮癌の遺伝子発現状況を対比した．なお本研究においては，発生母地による多様性を減弱することを目的として舌癌に注目して検討を行った．

【材料と方法】

細胞培養

ATCC (American type culture collection) より購入した舌癌由来細胞株 SCC-9 および SCC-25 を *in vitro* 条件下での実験用細胞株として用いた. 両細胞株は 2mM L-グルタミン, 1.2 g/L 重炭酸ナトリウム, 0.5mM ピルビン酸ナトリウムが添加された DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, ダルベッコ変法イーグル培地) と Ham's F12 培地の 1:1 混合培地 (Sigma) に 10% FBS (fetal bovine serum, 非働化ウシ胎児血清, Hyclone) および 400 ng/mL ハイドロコルチゾンを添加した培地を用いて 37°C, 5% CO₂ の条件下で維持した. 細胞の剥離時の培地除去には 1% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸) を含む PBS (phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水, pH 7.4) を使用し, 剥離時には 0.25% トリプシンを添加した 1% EDTA/PBS を用いた. トリプシン活性の停止処理には FBS 添加培地を用いた. 使用したバッファー等の組成を以下に列挙する.

PBS:

140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄

抗体および試薬

購入元を明記していない試薬は全て Sigma-Aldrich もしくは和光純薬より購入した. 本章において使用した抗体を以下に列挙する.

抗 EPB41L5 抗体 (ウサギ, ポリクローナル, 樹立 47)

抗 β -actin 抗体 (マウス, モノクローナル, EMD Millipore)

Peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体 (ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

RNA 干渉

EPB41L5 を標的とした siRNA (small interfering RNA) を用いて EPB41L5 遺伝子サイレンシングを行った. 使用した siRNA の合成は日本バイオサービスに委託した. 配列は 5'-GAGAUGGAACUGGCUAUUUUU-3' および 5'-UUCAGAUUCGUGCCUAUUCAG-3' の 2 種類を用いた. コントロールとして スクランブル配列 (GE Healthcare) を使用した. siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用説明書に基づき使用した. 2×10^5 個の細胞を ϕ 6 cm ディッシュに播き込み, 終濃度 48nM の siRNA を導入した. siRNA 導入から 48 時間後に細胞を各アッセイに使用した.

病理組織と免疫組織染色およびスコア化

使用した病理組織は 1996 (平成 8) 年から 2012 (平成 24) 年までに北海道大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて外科手術を施行し、インフォームドコンセントを得た患者標本であり、本研究は北海道大学病院倫理委員会の承認 (研究番号: 012-0166) のもと行った。本章で使用した病理組織は北海道大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室の佐藤宏紀博士の学位論文に使用された標本群を再検討したものである。免疫組織染色は Morpho Technology 社への外注にて行った。具体的には、ホルマリン固定後パラフィンに包埋した標本を厚さ 3 μm で連続切片とし、キシレンと段階希釈したアルコールによって脱パラフィン化した。TBS (tris-buffered saline, pH 7.4) で洗浄したのち、Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution (pH 9.0) により抗原賦活化処理を行った。この処理は Dako PT Link を用いて 97 °C, 20 min の条件下で行った。抗 EPB41L5 抗体 (1:1,000) と 30 min 反応させ、Dako Envision FLEX system を用いて可視化した。発色の為に 5 min DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Dojin) と反応させた。ヘマトキシリン染色をカウンター染色として用いた。スコア化は上述の佐藤博士の学位論文と同様の方法で行った。染色度と陽性細胞の占める範囲から各患者の H-score を算出し、上位 33% を高発現群として定義した。標本評価は北海道大学病院病理部畑中佳奈子助教と学位申請者である大塚勇太郎を含む計 3 名の医師により行った。

使用したバッファー等の組成を以下に列挙する。

TBS:

10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl

生存解析

病理組織の免疫組織染色によるスコア化に基づき、二群間での無病生存率と全生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。観察期間の開始は外科的切除を行った時点とし、終了は無病生存率については疾患の増悪・再発の診断時点もしくは原因に関わらず死亡した時点、全生存率は死亡時点もしくは最近の follow-up 時点とした。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

培養細胞におけるタンパク質発現状況を確認するため、GGA (Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding) バッファーを用いて細胞を溶解し、サンプルバッファーを用いてタンパク質濃度 80 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ の細胞抽出液を作成し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel

electrophoresis , SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法) および WB (western blotting, ウェスタンブロッティング法) により検出した. SDS-PAGE は目的のタンパク質の分子量に応じて 8-15% 分離ゲルと 5% 濃縮ゲルを用いて Running バッファー中で等電流電気泳動 (ゲル一枚あたり 150 V, 25 mA, 100 W, 1 h 45 min) を行った. 泳動後のゲルは transfer バッファー中で等電圧電気泳動 (50 V, 150 mA, 100 W, 2 h) を行い, PVDF (ポリフッ化ビニリデン, polyvinylidene difluoride) メンブレン上に転写した. メンブレンの洗浄には TBST (tris buffered saline with 0.1% Tween-20) を用いた. 抗体添加の前に室温, 1 h のブロッキングを行った. ブロッキング液は抗体に応じて 5% BSA (bovine serum albumin) /TBST もしくは 5% スキムミルク/TBST を使用した. 一次抗体を添加したブロッキング液中で 4°C, オーバーナイト, 二次抗体を添加したブロッキング液中で室温, 1 h 反応させたのち, ECL (enhanced chemiluminescence) WB 検出キット (GE healthcare) を用いて検出した. 使用したバッファー等の組成を以下に列挙する.

GGA バッファー:

1% Triton X-100, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 5 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 3 µg/ml pepstatin A

サンプルバッファー:

50 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% BPB (bromophenol blue), 100mM DTT (dithiothreitol)

Running バッファー:

25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0.1% SDS

Transfer バッファー:

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.01% SDS, 20% メタノール

TBST:

10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 0.1% Tween-20

マトリゲル インベージョンアッセイ

マトリゲルインベーションアッセイによって各細胞株や各条件における浸潤能を評価した. BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (24-well scale, 8 μ m pore, BD Bioscience) を使用した. 上部チャンバーには 2×10^5 個の細胞懸濁液を 500 μ L 入れ, 下部チャンバーには 10% FBS 添加培地 750 μ L を入れた. 水平, 37°C, 5% CO₂ の条件下で 12 h 維持し, 4% PFA (paraformaldehyde, 和光純薬) 固定後, 0.4% クリスタルバイオレット溶液 (0.4% クリスタルバイオレット, 10% エタノール) で染色し, 浸潤した細胞数を計測した.

細胞生存性アッセイ

Cell Titer 96® (Promega) を使用して細胞生存性アッセイを行った. 96-well ディッシュに 2×10^3 から 1×10^4 個の細胞を播き込み, 37°C, 5% CO₂ の条件下で 12 h から 24 h 培養したのち, 完全培地にて 5 倍希釈した Cell Titer 96® を加え, 同様の条件下で 90 min 維持した. プレートリーダー (Perkin Elmer Japan, ARVO MX) により波長 490 nm の吸光度を測定した.

TCGA 解析

TCGA⁶² に登録されている遺伝子発現データを用いて相関解析を行った. データセットは 2015 年 4 月に取得した. 取得した遺伝子発現データは log₂ 変換による正規化を行い解析に使用した.

化学放射線療法抵抗性アッセイ

コラーゲンコートした 48-well ディッシュに各条件で処理した 1.5×10^4 個の細胞を播き込み, 24 h 後に 50 nM cisplatin を添加, その 24 h 後と 48 h 後に 2 Gy の X 線を照射 (MBR-1520R-3 HITACHI, 150 kV, 0.5 mm aluminum filter) し, さらに 24 h 後の生存細胞数をカルセイン染色により計測した.

統計解析

全ての統計解析は excel (Microsoft) と R software を用いて行い, $P < 0.05$ を有意とした. 二群間の比較には Welch *t*-test を行った. Kaplan-Meier 曲線の有意性検定には log-rank test を行った. 相関分析には Spearman rank correlation test を行った.

【実験結果】

1-1 EPB41L5 の高発現は患者予後と相関する

1996(平成8)年から2012(平成24)年までに北海道大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて外科的手術を施行した患者標本を免疫組織化学によって染色し、EPB41L5の発現量に応じて群分けを行った。患者情報を表1-1-1とスコアの例を図1-1-1に示す。この群分けに応じて、EPB41L5の発現量と無病生存率、全生存率との相関をKaplan-Meier法を用いて解析した。図1-1-2に示す通り、無病生存率で $P = 0.0182$ 、全生存率で $P = 0.0312$ と有意差を示した。なお、本節のデータは佐藤宏紀博士の学位論文で発表されたデータを再検討したものである。

表 1-1-1 本研究に使用した患者標本の臨床情報

特徴		患者数 (%)
性別	男性	15/20 (75)
	女性	5/20 (25)
年齢	30-39	3/20 (15)
	40-49	2/20 (10)
	50-59	4/20 (20)
	60-69	6/20 (30)
	70-	4/20 (20)
原発部位	舌	20/20 (100)
T分類	T1	0 (0)
	T2	13/20 (65)
	T3	7/20 (35)

	T4	0 (0)
N 分類	N0	10/20 (50)
	N1	7/20 (35)
	N2	3/20 (15)
M 分類	M0	20/20 (100)
	M1	0/20 (0)
分化度	高度	12/20 (60)
	中等度	7/20 (35)
	低度	1/20 (5)
併用した治療	放射線療法単体	7/20 (35)
	化学療法単体	1/20 (5)
	化学放射線療法	2/20 (10)
	なし	10/20 (50)

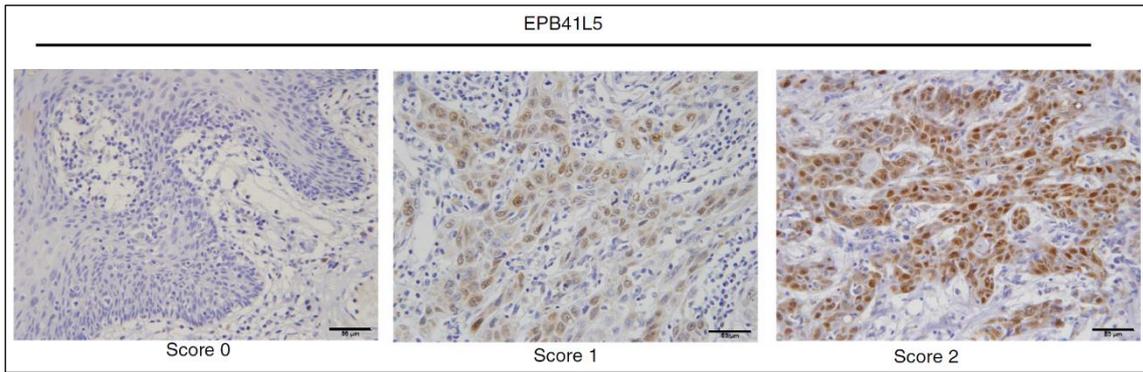


図 1-1-1 EPB41L5 発現量に応じたスコア

患者標本を免疫組織化学により染色し EPB41L5 の発現状況をスコアリングした, この発現スコアと専有面積から *H-score* を算出し, 上位 33%を高発現群, 下位 66%を低発現群とした. スケールバーは 50 μm を表す.

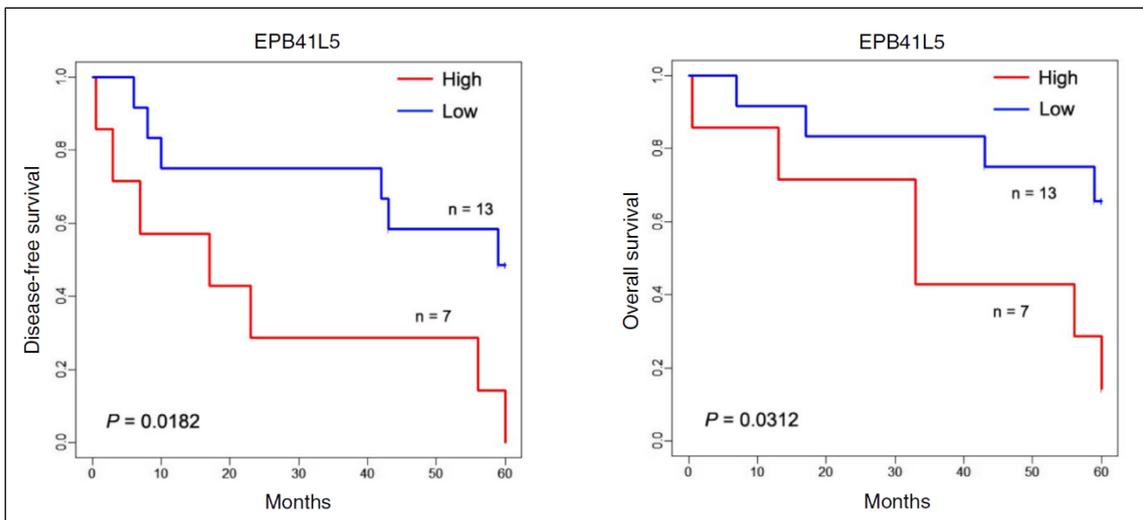


図 1-1-2 EPB41L5 発現量と予後の関係

EPB41L5 の発現量により群分けを行い, *Kaplan-Meier* 法により無病生存率と全生存率との相関を検討した. *logrank* 法により *P* 値を算出した.

1-2 リンパ節転移陽性の患者標本では EPB41L5 発現が高い

次に、同一の標本を用いてリンパ節転移陽性の患者標本とリンパ節転移陰性の患者標本にて EPB41L5 の H-score を比較した。図 1-2-1 に示す通り、リンパ節転移陽性群において EPB41L5 の発現量が有意に上昇していた。なお、本節のデータは佐藤宏紀博士の学位論文で発表されたデータを再検討したものである。

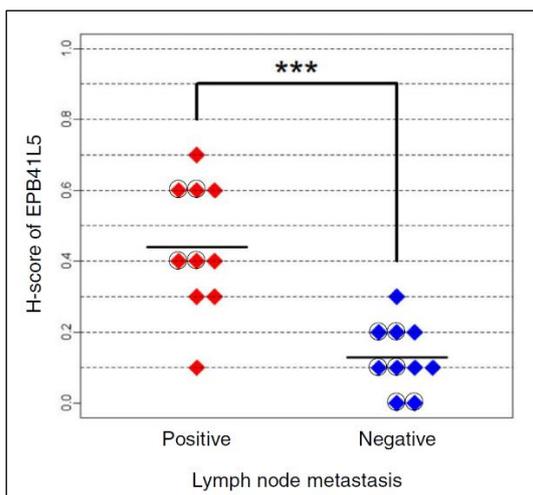


図 1-2-1 リンパ節転移を有する群と有さない群における EPB41L5 発現量比較
の囲いは手術療法のための患者を示す。群間比較には Welch t-test を施行した。

1-3 舌癌由来細胞株における EPB41L5 高発現と浸潤活性との関係

EPB41L5 を強く発現する舌癌由来細胞株 SCC-9 と EPB41L5 をほとんど発現しない舌癌由来細胞株 SCC-25 を用いてマトリゲルインベーションアッセイを行い、浸潤活性を比較した。図 1-3-1 で示す通り、SCC-9 は SCC-25 と比較し有意に高い浸潤活性を示した。また、この時の細胞生存性は図 1-3-2 に示すように両細胞株で差がなかった。SCC-9 と SCC-25 の EPB41L5 の発現量を図 1-3-3 に示す。

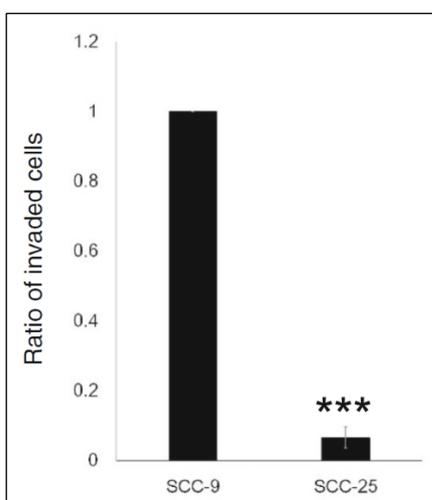


図 1-3-1 舌癌細胞株 SCC-9 と SCC-25 における浸潤活性の比較

マトリゲルインベーションアッセイにより下部チャンバーに移動した細胞の数を計測し、その比率を求めた。群間比較には *Welch t-test* を施行した。***は $P < 0.001$ を示す。

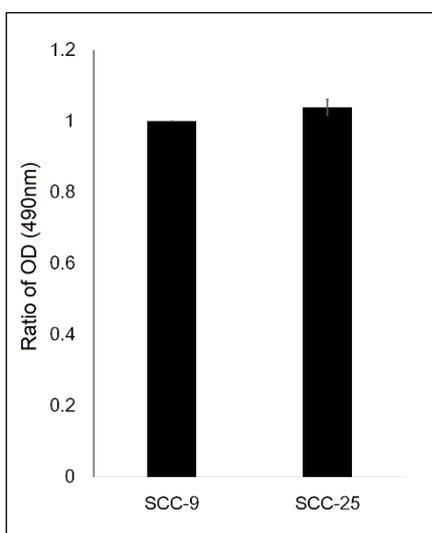


図 1-3-2 舌癌細胞株 SCC-9 と SCC-25 における細胞生存性の比較

細胞生存性アッセイによりインベーションアッセイに用いた細胞生存性を求めた。群間比較には *Welch t-test* を施行した。各群間に有意差は認めなかった。

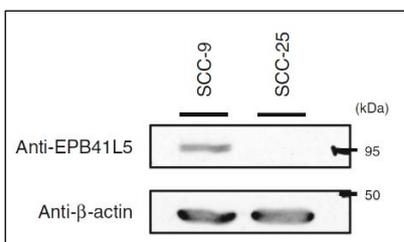


図 1-3-3 舌癌細胞株 SCC-9 と SCC-25 における EPB41L5 タンパク質発現量

WB により 2 種の細胞株における間葉系タンパク質 EPB41L5 の発現量を比較した。右端は明示した分子量のマーカ位置を示す。

次に SCC-9 細胞に EPB41L5 を標的とする siRNA を 2 配列と、スクランブル配列の siRNA を導入し、浸潤活性を比較した。図 1-3-4 に示す通り、EPB41L5 の発現抑制により有意に浸潤活性が低下した。この時、細胞生存性は図 1-3-5 に示す通り差がなかった。EPB41L5 の遺伝子発現抑制効率を図 1-3-6 に示す。なお、ここでの浸潤活性低下量は 40%-50%に留まっているが、EPB41L5 をほとんど発現していない SCC-25 の浸潤活性よりも高値であることから、SCC-9 においては EPB41L5 が主要な因子の一つではあるが、その他の因子も浸潤活性の担保に関与している可能性が示唆された。

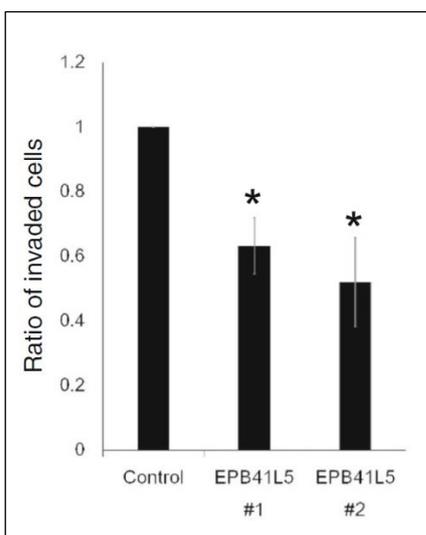


図 1-3-4 舌癌細胞株 SCC-9 において EPB41L5 を発現抑制した際の浸潤活性

マトリゲルインベーションアッセイにより下部チャンバーに移動した細胞の数を計測し、その比率を求めた。群間比較には *Welch t-test* を施行した。*は $P < 0.05$ を示す。

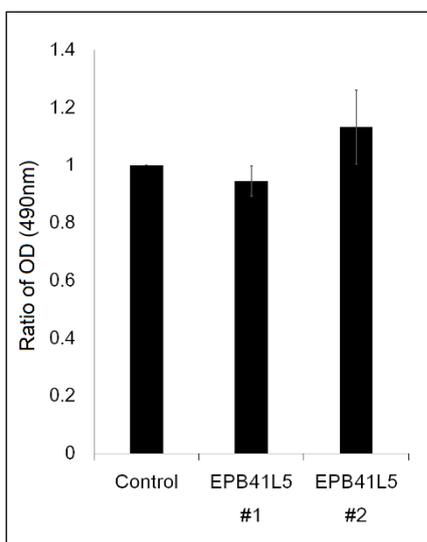


図 1-3-5 舌癌細胞株 *SCC-9* において *EPB41L5* を発現抑制した際の細胞生存性
細胞生存性アッセイによりインベーションアッセイに用いた細胞の生存性を
求めた。群間比較には *Welch t-test* を施行した。各群間に有意差は認めなかった。

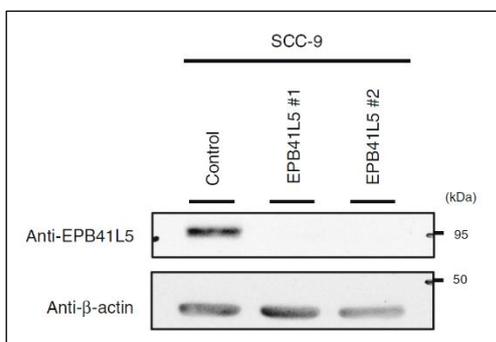


図 1-3-6 舌癌細胞株 *SCC-9* における *EPB41L5* 遺伝子発現抑制効率
siRNA による *EPB41L5* の遺伝子発現抑制効率を *WB* により確認した。右端
は明示した分子量のマーカー位置を示す。

1-4 舌癌由来細胞株における EPB41L5 高発現と化学放射線治療抵抗性との関係

現代の頭頸部扁平上皮癌に対する標準治療として化学療法と放射線治療の集学的療法が用いられている。本節では、SCC-9 をモデルとして、EPB41L5 が化学放射線治療抵抗性に寄与するかを検討した。50 nM の cisplatin を細胞に添加し、2 Gy × 2 回の X 線を照射した。図 1-4-1 に示す通り EPB41L5 の抑制は化学療法と放射線療法単体には影響を及ぼさないが、化学放射線療法への感受性は高くなる。ただし、ここで得られる感受性増強効果は有意であるものの 20% ほどの変動であり、細胞株として非常に高い治療抵抗性を保有しているものと思われる。

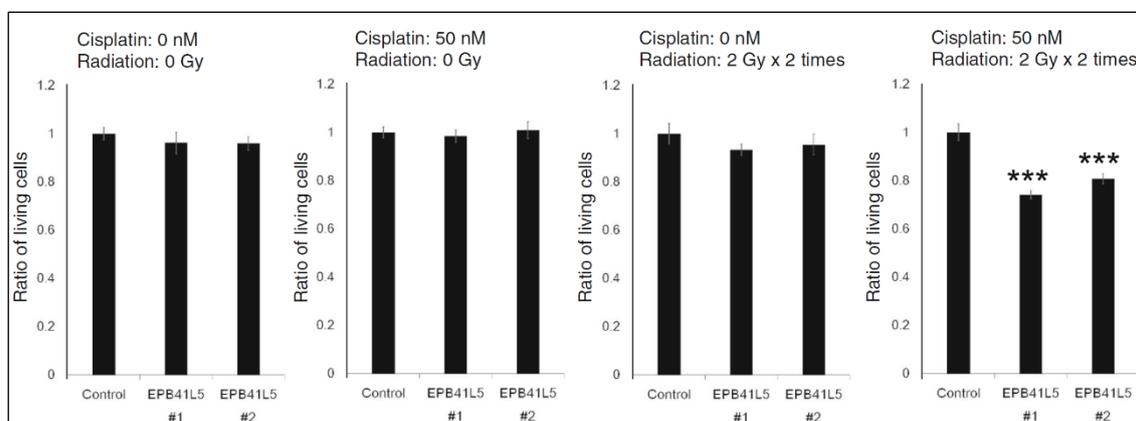


図 1-4-1 EPB41L5 遺伝子発現抑制による化学放射線治療感受性の変化

48-well ディッシュに siRNA 処理した細胞を播き込み、24 h 後に cisplatin を作用させ、そのさらに 24 h 後と 48 h 後に X 線を照射、さらに 24 h 後の生存細胞数を比較した。それぞれの条件における Control を基準とした割合を示した。群間比較には Welch t-test を施行した。***は $P < 0.001$ を示す。

1-5 頭頸部扁平上皮癌における EPB41L5 高発現条件の検討

TCGA⁶² に登録されている頭頸部扁平上皮癌の臨床データを利用して EPB41L5 の高発現に相関する EMT-TF を探索した。当研究室の橋本あり博士らにより、乳癌においては ZEB1 が EPB41L5 の発現を増強することが報告されていた⁴⁷ので、まずその関係を調べた。図 1-5-1 に示す通り、相関関係を見出すことはできなかった。なお、発生母地を SCC-9 と同じ舌に絞って場合の解析結果を図 1-5-2 に示すが、同様に相関関係を見出すことはできなかった。次に主要な EMT-TF との関係を網羅的に解析した。ここで代表的な EMT-TF として ZEB1/2, SNAIL, SLUG, TCF3/4 (Transcription Factor 3/4), KLF8 (Kruppel Like Factor 8), TWIST1, FOXO3 (Forkhead Box O3) を用いた⁶³。図 1-5-3 に示す通り、この解析により、頭頸部扁平上皮癌においては ZEB1 ではなく KLF8 や FOXO3 の関与が示唆された。このとき、JASPAR^{64,65}にてそれぞれのコンセンサス配列が EPB41L5 の遺伝子近傍 (転写開始点より 3000 塩基対: 3 kbps 上流と 1 kbps 下流) に存在するかを調べ、図 1-5-4 に示した。

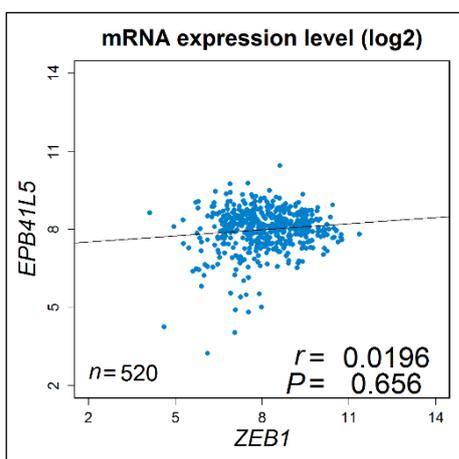


図 1-5-1 頭頸部扁平上皮癌における ZEB1-EPB41L5 遺伝子発現量の相関

TCGA に登録されている頭頸部扁平上皮癌の遺伝子発現データを用いて ZEB1 と EPB41L5 の遺伝子発現量の相関を検討した。全標本数は 520、青点は各患者の発現パターンを示す。mRNA 発現量は次世代シーケンサーの標準化されたコール値を \log_2 変換したものである。r 値と P 値の算出には Spearman rank correlation test を施行した。

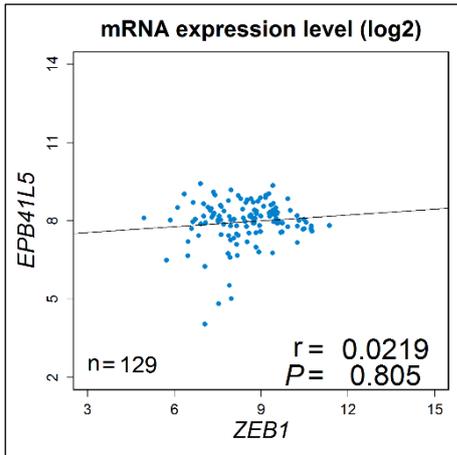


図 1-5-2 舌癌における ZEB1-EPB41L5 遺伝子発現量の相関

TCGA に登録されている舌癌の遺伝子発現データを用いて ZEB1 と EPB41L5 の遺伝子発現量の相関を検討した. 全標本数は 129, 青点は各患者の発現パターンを示す. mRNA 発現量は次世代シーケンサーの標準化されたコール値を \log_2 変換したものである. r 値と P 値の算出には Spearman rank correlation test を施行した.

TCGA Data Set Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

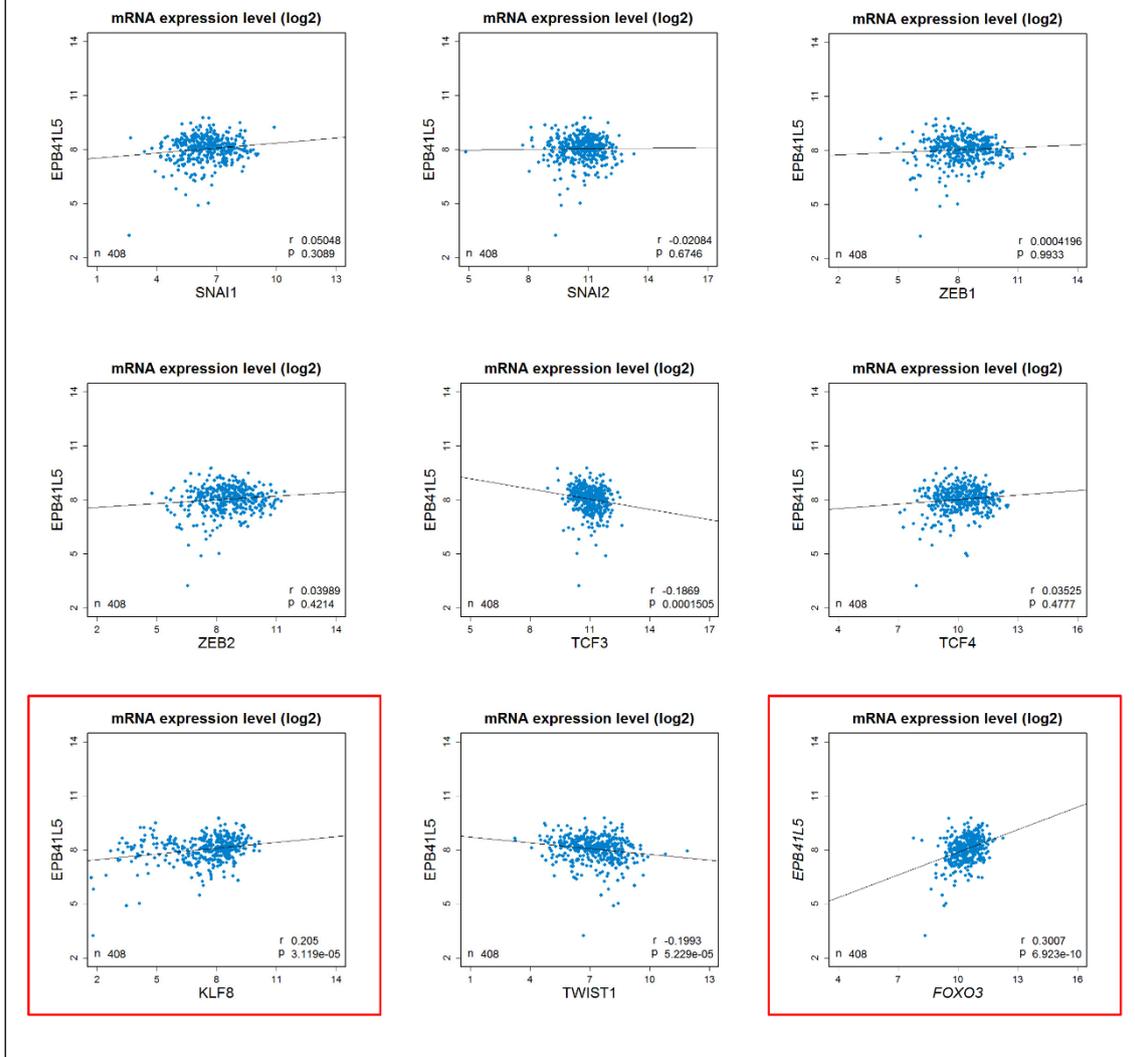


図 1-5-3 頭頸部扁平上皮癌における EMT-TF と EPB41L5 の発現相関解析

TCGA に登録されている頭頸部扁平上皮癌の遺伝子発現データを用いて EMT-TF と EPB41L5 の遺伝子発現量の相関を検討した。赤枠は有意に正の相関を示すもの。r 値と P 値の算出には Spearman rank correlation test を施行した。

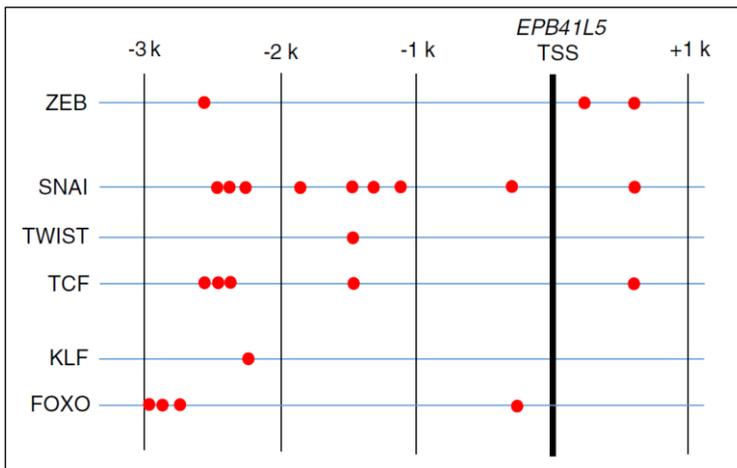


図 1-5-4 EPB41L5 遺伝子近傍の転写因子結合予測部位

JASPAR^{64,65}により EPB41L5 遺伝子の転写開始部位から上流 3kbps と下流 1kbps にわたり、表記の EMT-TF 結合予測部位をプロットした。TSS は transcription start site を表す。

1-6 TCGA 解析による腺癌と扁平上皮癌における EPB41L5 高発現条件の比較

最後に、腺癌と扁平上皮癌によって EPB41L5 の発現量と正に相関する EMT-TF の種類に違いがあるかを検討した。腺癌として、図 1-6-1 に乳癌、図 1-6-2 に膵癌、図 1-6-3 に腎臓明細胞癌のデータ解析結果を示す。扁平上皮癌として、図 1-5-3 の頭頸部扁平上皮癌の他に、図 1-6-4 に肺扁平上皮癌のデータ解析結果を示す。腺癌においては ZEB1 や TCF4 が EPB41L5 発現に相関するが、扁平上皮癌においては相関がみられないことが示された。

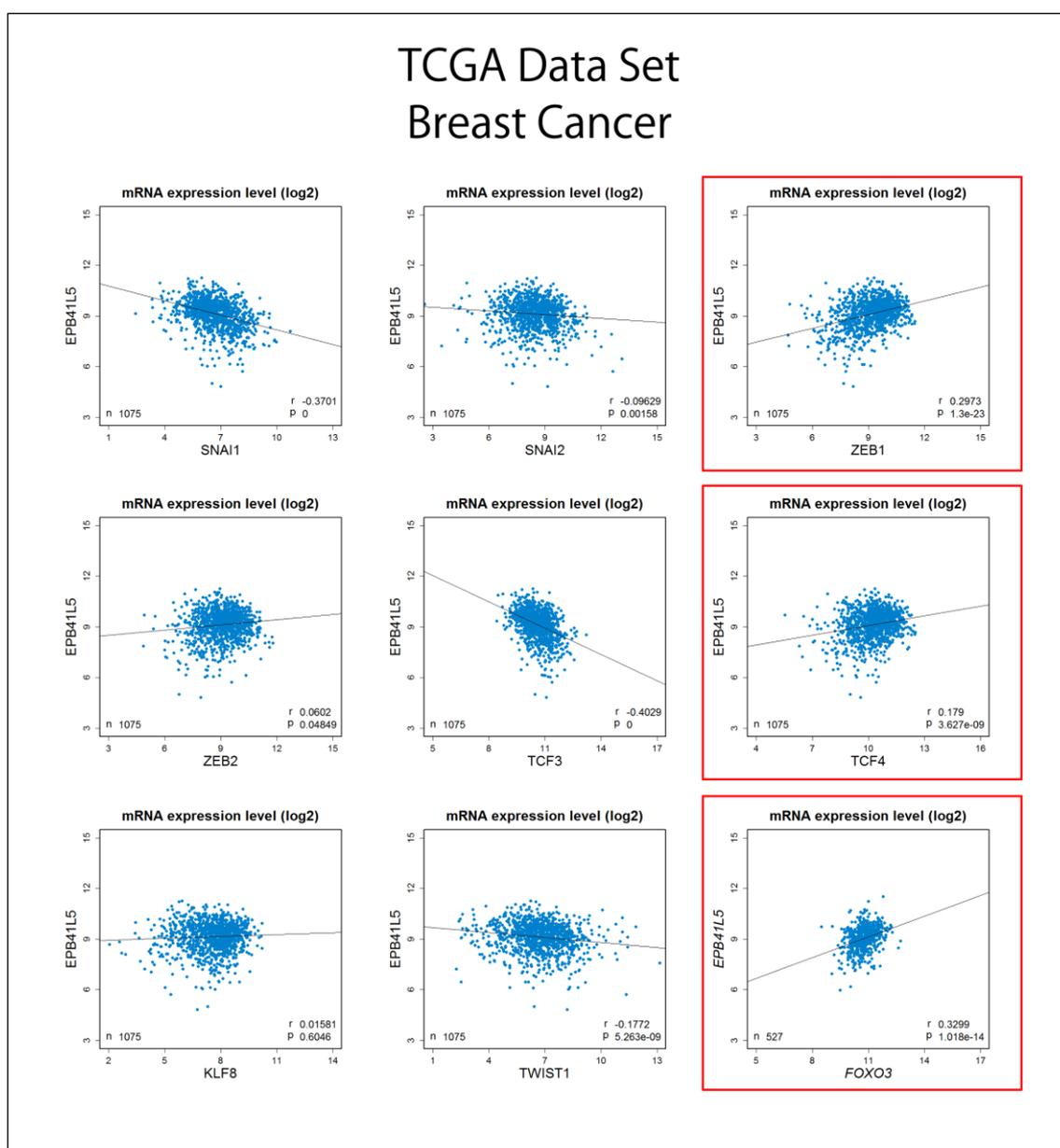


図 1-6-1 乳癌における EMT-TF と EPB41L5 との発現相関解析

TCGA に登録されている乳癌の遺伝子発現データを用いて *EMT-TF* と *EPB41L5* の遺伝子発現量の相関を検討した. 赤枠は有意に正の相関を示すもの. *r* 値と *P* 値の算出には *Spearman rank correlation test* を施行した.

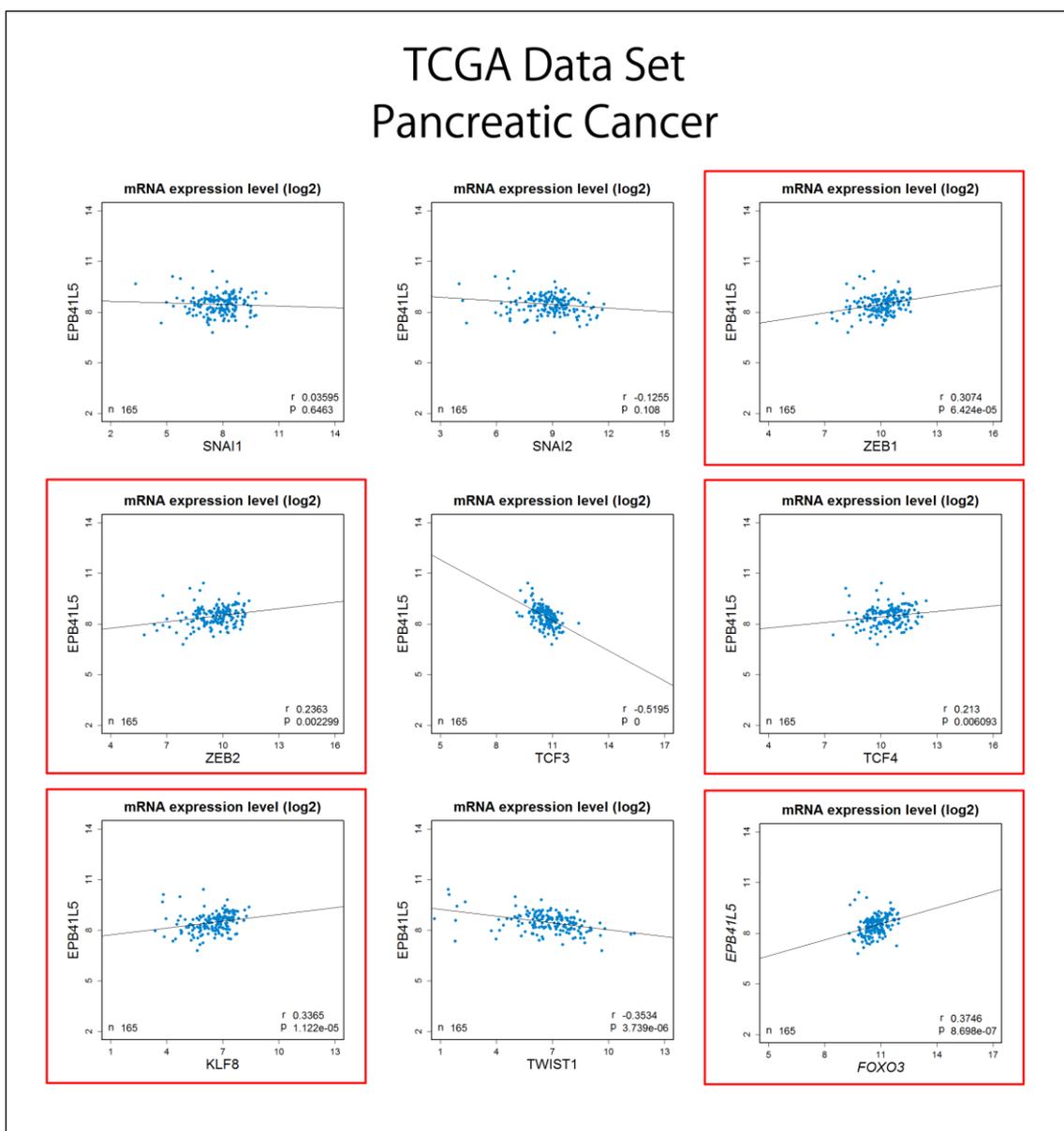


図 1-6-2 膵癌における *EMT-TF* と *EPB41L5* との発現相関解析

TCGA に登録されている膵癌の遺伝子発現データを用いて *EMT-TF* と *EPB41L5* の遺伝子発現量の相関を検討した. 赤枠は有意に正の相関を示すもの. *r* 値と *P* 値の算出には *Spearman rank correlation test* を施行した.

TCGA Data Set clear cell Renal Cell Carcinoma

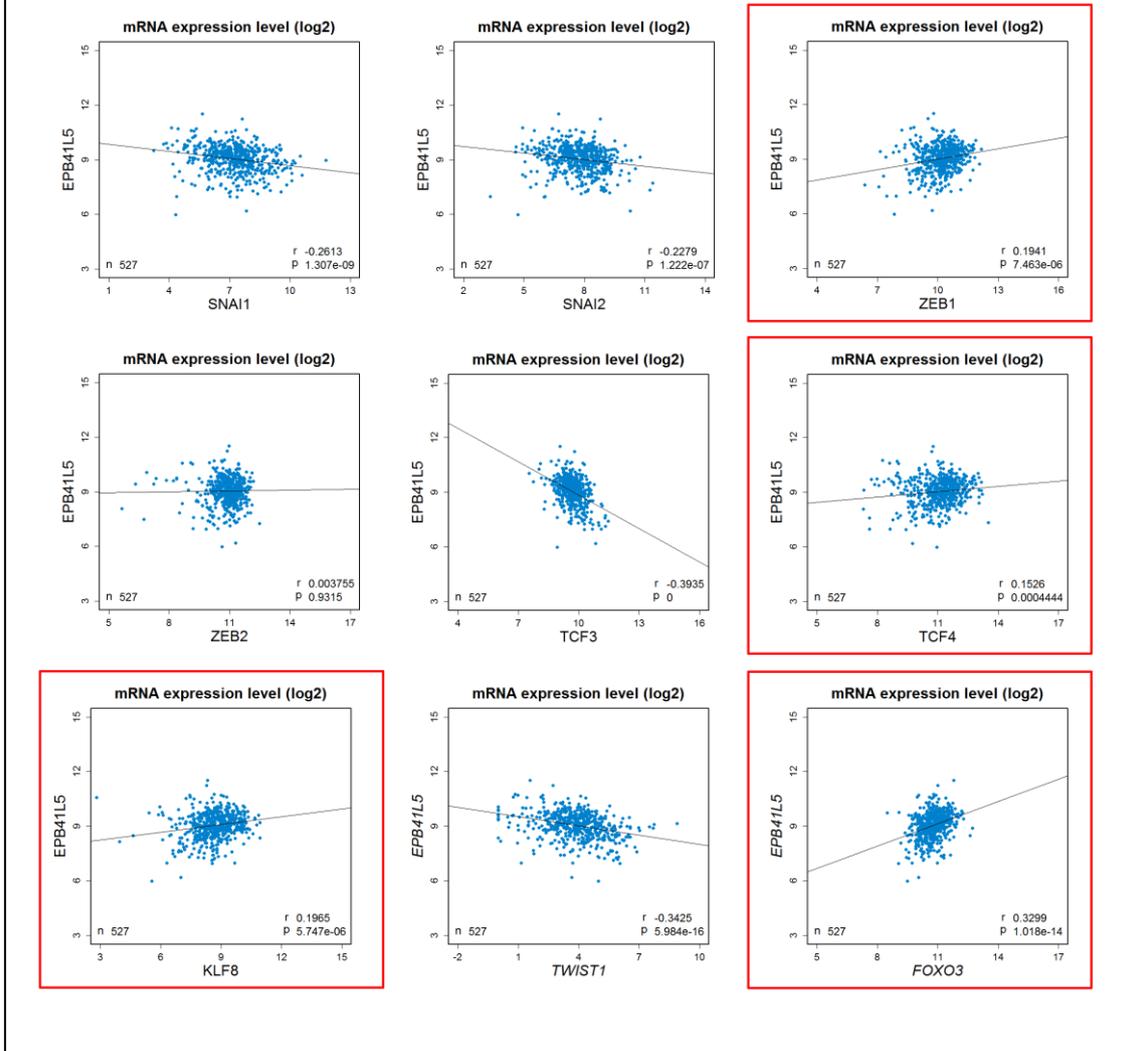


図 1-6-3 腎淡明細胞癌における EMT-TF と EPB41L5 との発現相関解析

TCGA に登録されている腎淡明細胞癌の遺伝子発現データを用いて EMT-TF と EPB41L5 の遺伝子発現量の相関を検討した. 赤枠は有意に正の相関を示すもの. r 値と P 値の算出には Spearman rank correlation test を施行した.

TCGA Data Set Lung Squamous Cell Carcinoma

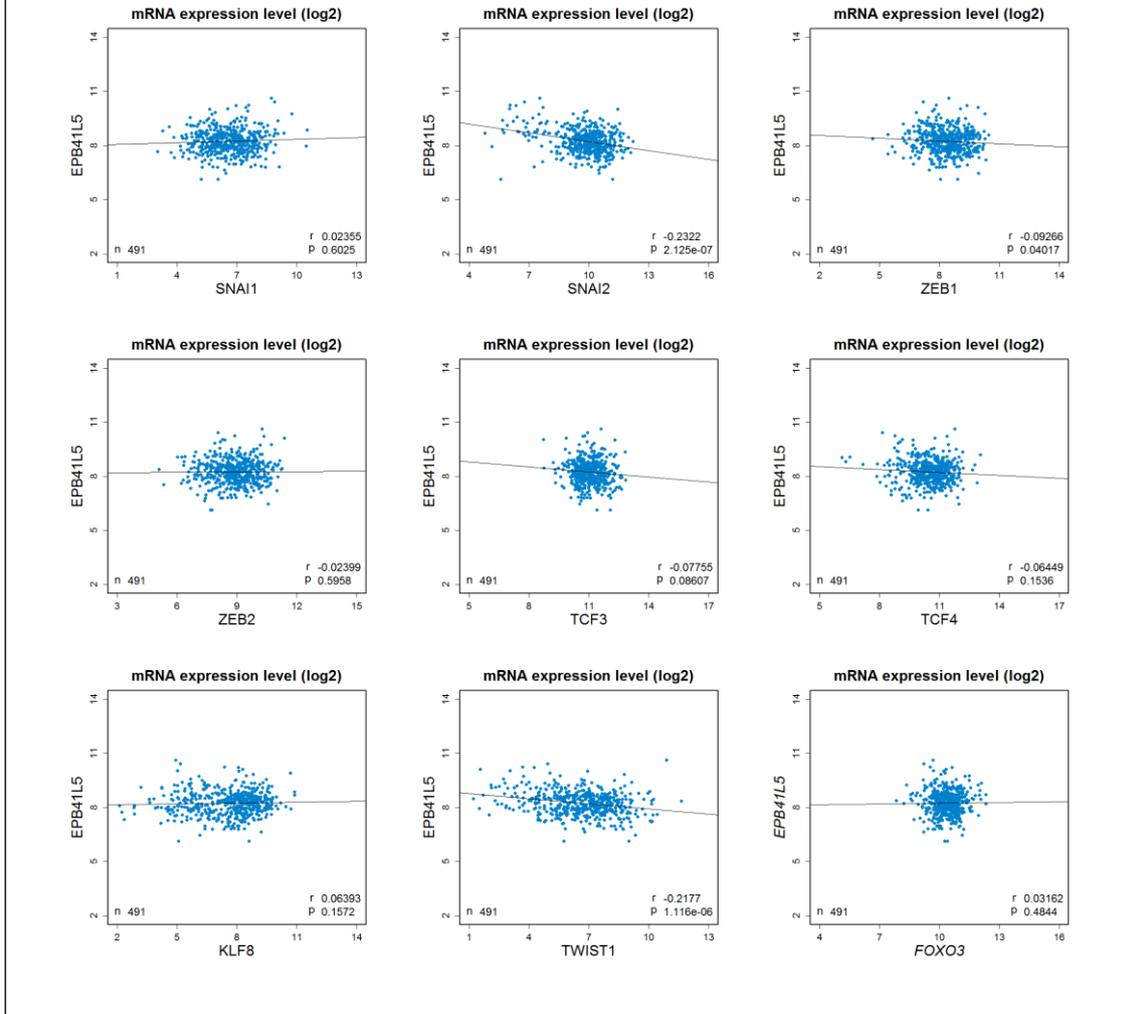


図 1-6-4 肺扁平上皮癌における EMT-TF と EPB41L5 との発現相関解析

TCGA に登録されている肺扁平上皮癌の遺伝子発現データを用いて EMT-TF と EPB41L5 の遺伝子発現量の相関を検討した. 赤枠は有意に正の相関を示すもの. *r* 値と *P* 値の算出には Spearman rank correlation test を施行した.

【考察】

本研究において、Arf6 経路の構成因子かつ間葉系特異的タンパク質である EPB41L5 が頭頸部扁平上皮癌において一定の割合で高発現し、患者予後不良と統計的有意差をもって相関していることを明らかにした。またその細胞生物学的機序として EPB41L5 が細胞の浸潤能の上昇と、部分的ながらも放射線化学療法に対する治療抵抗性の増強に寄与する可能性を指摘した。さらに、頭頸部扁平上皮癌の EPB41L5 高発現の上流因子が、乳癌や膵癌、腎臓明細胞癌といった腺癌とは異なる可能性を見出した。

頭頸部領域は生命維持に直結する機能を数多く有する部位であり、またそういった機能を持つ器官は、複雑かつ繊細な協調運動を必要とすることが多く、必然的に治療難度が高くなってしまふ。だからこそ、より有効性と特異性の高い治療法が必要とされており、本研究のように予後因子や治療標的となりうるタンパク質を同定、報告することは有意義だといえるだろう。一方で、図 1-4-1 に示した通り、EPB41L5 高発現が治療抵抗性に寄与する割合は限定的であり、さらなる因子の同定が必要となる。同時に、頭頸部扁平上皮癌では初期治療は著効するものの再発も問題となっていることから、腫瘍細胞の中に高い治療抵抗性を示すサブpopulationが一部存在することも考えられ、SCC-9 がそういう細胞株であった可能性も考えられる。いずれにしても、今回は *in vitro* の実験系として SCC-9 細胞を主に使用したが、同様の現象を他の細胞株もしくは患者由来の初代培養系などで追試することで頭頸部扁平上皮癌の悪性度進展の実態をより深く理解することが出来るだろう。

頭頸部扁平上皮癌はその発生母地や発生の契機となる因子（喫煙歴・飲酒歴・ウイルス感染など）が多様であり、実験におけるばらつきが大きくなることも研究を難しくしている要因の一つと考えられる。また、このような多様性が同一患者の腫瘍細胞間でも存在しているとも考えられ、このことが強い治療抵抗性獲得に寄与している可能性がある。

Arf6 経路の活性化は、細胞に高い運動能・浸潤能・薬剤抵抗性を付与するが、その上流が組織系によって異なるという知見は興味深い。裏を返せば、どの細胞種においても Arf6 経路が活性化するという「結果」が悪性度進展において必須要件の一つになっているということである。つまり、あらゆる癌種に対する実臨床においても、Arf6 経路が活性化した細胞を探し出すことと、Arf6 経路を遮断する治療を併用することが有効になる可能性がある。我々はこれまで、乳癌細胞において高脂血症治療薬として有名な HMG-CoA (hydroxymethylglutaryl-CoA) 還元酵素競合阻害剤スタチンが、Arf6 経路の遮断に有効であることを報告している²⁵。このスタチンの効果を頭頸部扁平上皮癌においても検討することが、喫緊の課題として挙げられる。

第二章

MMTV-PyMT マウスの悪性度進展における Arf6 経路の利用

【諸言】

乳癌の臨床的特徴

・疫学

乳癌は世界で毎年新たに約 170 万人が罹患する悪性疾患であり、本邦をはじめ先進国の女性における主要な死亡原因の一つである²。現在、乳癌に対しては、そのステージやホルモンレセプターの発現状況による組織系分類に応じて手術療法、放射線療法、ホルモン療法、分子標的薬や抗癌剤を利用した薬物療法などが行われており、また、多くの研究がなされているが、高い再発率が目下の問題となっている³。さらに罹患時期が他のがん比べて若年であり、手術療法により完治したとしても整容面における QOL が低下することも問題となっている³。

・診断、分類、治療

乳癌の診断は、臨床症状、マンモグラフィー、細胞診、組織診によって行われる。特徴的な臨床所見としては胸のしこり、皮膚のひきつれ、疼痛、乳頭からの分泌物などが挙げられる³。乳癌の分類については病期分類と免疫組織化学によるサブタイプ分類を詳述する。病期分類は TNM 分類に準拠する^{53,56}。T は腫瘍の大きさを示すファクター、N はリンパ節転移を示すファクター、M は遠隔転移を示すファクターであり、これら 3 つの要素を総合的に判断し病期を決定、それにより手術療法、放射線療法、薬物療法などの治療方針を決定する。免疫組織化学によるサブタイプ分類は、核内ホルモンレセプターの ER (estrogen receptor) と PgR (progesterone receptor)、そして膜貫通型タンパク質である Her2 (human epidermal growth factor receptor 2)、増殖性の度合いを示す Ki-67 の発現状況により行われ、主に Luminal-A, Luminal-B, Her2, Triple Negative に分けられる。最近では遺伝子発現解析により、これに Luminal-C, Claudin Low, Normal breast like という分類を加えることも検討されている^{66,67}。ER や PgR 高発現の Luminal タイプにはホルモン治療が有効であり、Her2 タイプでは世界初のヒト化モノクローナル抗体薬であるトラスツズマブ(商品名: ハーセプチン)が著効する可能性がある。Triple Negative は特に悪性度が高いと考えられている組織系であり、治療標的を定めにくく、シクロホスファミド、メトトレキサート、5-フルオロウラシルを併用する CMF 療法など、抗癌剤を使用するのが一般的である³。いずれの場合も乳癌は罹患年齢が比較的若いことや、治療後の再発率の高さなどから、多くの基礎研究が重ねられており、序章でも述べた通り

悪性度進展と EMT との関連や、発癌初期播種の概念が臨床的にも証拠立てられてきている^{5,7}.

本研究の意義

・乳癌と Arf6 経路

序章において述べたように、私の所属する分子生物学分野ではこれまで、ヒトもしくはマウス乳癌細胞において EGFR 活性化の下流で Arf6 経路が形成され、細胞の運動能、浸潤能、薬剤抵抗性の獲得に寄与することを明らかにしてきた。しかしながらその研究は悪性度の高い細胞株と低い細胞株において Arf6 経路の発現状況を比較したものであり、同一のモデルにおける経時的な観察には自然発癌モデルマウスの同定が必要であった。

・乳癌モデルマウスについて

乳癌モデルマウスは 20 系統程度存在し、そのうち癌の初期播種が起こる系統が幾つか報告されている。多くの系統では、思春期の乳腺特異的に遺伝子ノックダウンやノックインを可能にするためエストロゲン反応性の MMTV (mouse mammary tumor virus) プロモーターが利用されている。今回解析に利用した MMTV-PyMT マウスや MMTV-Neu マウスではそれぞれ polyomavirus middle T antigen とラットの Neu/Her2 遺伝子を発現するよう設計されたトランスジェニックマウスである。これらのマウスはともに発癌初期播種を引き起こす系統であり⁵、マイクロアレイの解析から遺伝子発現状況がよく似ていることが明らかになっている^{68,69}。免疫組織化学によるサブタイプ分類はともに、発癌初期にはヒトにおける luminal B type であり、末期には Basal type を示すことが報告されている^{68,69}。一方で、腫瘍の悪性度進展のタイムコースには大きな違いがあり、MMTV-PyMT マウスでは生後 10 週で乳癌原発巣を形成し、12 週で肺転移を起こすが、MMTV-Neu マウスでは生後 24 週で乳癌原発巣を形成し、36 週で肺転移を起こすことが報告されている^{5,70}。

・本章における研究内容

本研究においては、Arf6 経路を悪性度進展に利用する乳癌自然発癌モデルマウスの同定を第一義として解析を行った。現在までにこのようなモデルマウスは報告されておらず、Arf6 経路が活性化した細胞とそうでない細胞の比較は可能であっても、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は不可能であった。特に乳癌の高い再発率に関与すると考えられている発癌極初期段階での播種に Arf6 が関わる可能性を検討したいと考え、また将来的には発癌前の食事中的脂質・アミノ酸・糖質の含有量を調節し、

Arf6 経路依存的な悪性度進展がどのような変化を起こすかを解析したいと考え、研究を開始した。まず、MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウス由来の原発腫瘍の Arf6 経路構成タンパク質の発現量を比較した。興味深いことに、MMTV-PyMT マウスでは Arf6 経路構成タンパク質がいずれも高発現しているのに対し、遺伝的に近い系統である MMTV-Neu マウスでは AMAP1 の発現量が低く、悪性度進展において Arf6 経路に依存していない可能性が示唆された。次に初代培養の系を立ち上げ、MMTV-PyMT マウス由来腫瘍細胞について *in vitro* の実験系で Arf6 経路活性化が浸潤活性上昇を引き起こしていることを裏付けた。さらには Arf6 経路活性化に必須とされるメバロン酸経路の競合阻害剤であるスタチンが MMTV-PyMT マウスの肺転移巣形成能を抑制するかどうかを検討した。最後に、発癌初期播種細胞の検出に際しての知見と問題点を述べる。本研究の結果から MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスの悪性度進展のタイムコースの違いの一端が Arf6 経路活性化にある可能性が示唆された。

【材料と方法】

実験動物

MMTV-PyMT (FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J, stock no. 002374) マウスと MMTV-Neu (FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J, stock no. 002376) マウスを Jackson Laboratory から購入し、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて自由給餌・自由給水・12 時間明暗周期の条件下で飼育した。全ての動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認を受けたプロトコールによって行った (承認番号: 14-0056)。マウスの健康と行動に異常がないことを毎日の観察で確認し、実験の施行時には可能な限り苦痛を伴わないよう配慮した。マウスを安楽死させたのち、実験目的に応じて腫瘍原発巣、肺、骨髄、血液を摘出した。骨髄は両肢大腿骨を摘出し、両骨端を切断したのち 23 G の注射針と 10 mL シリンジを用いて PBS 中にフラッシュすることにより得た。

初代細胞培養

マウスから摘出した腫瘍を PBS で 2 回洗浄したのち、抗生物質 (100 U/mL ペニシリン, 明治製菓; 50 µg/mL ストレプトマイシン, 明治製菓; 50 µg/mL ゲンタマイシン, Sigma-Aldrich) を添加した HBSS (Hanks' balanced salt solution, Sigma-Aldrich) に浸した。φ 6 cm dish 中に 0.01% collagenase (Sigma-Aldrich) を添加した HBSS を 10mL 入れ、その中で腫瘍を 2 mm 片になるまでミンスした。腫瘍片を含む溶液を半分ずつ 100 mL フラスコに移し (0.01% collagenase/HBSS 計 50 mL にてディッシュに腫瘍片が残らないよう回収), 37°C 95 /min で振盪した。100 µm のセルストレイナー (Falcon) を通過させた後、80 g 5 min での遠心分離を計 3 回繰り返す、血球を除去した。10% FCS/DMEM にて 37°C, 5% CO₂ の条件下で維持した。

抗体

本章の実験において使用した抗体を以下に列挙する。

抗 Arf6 抗体 (マウス, モノクローナル, Santa Cruz Biotechnology)

抗 vimentin 抗体(マウス, モノクローナル, Cell Signaling)

抗 β-actin 抗体(マウス, モノクローナル, EMD Millipore)

抗 γ-tubulin 抗体(マウス, モノクローナル, Sigma-Aldrich)

抗 Cytokeratin 8 (CK8)抗体(ウサギ, ポリクローナル, Abcam)

抗 AMAP1 抗体(ウサギ, ポリクローナル, 樹立^{24,39})

抗 GEP100 抗体(ウサギ, ポリクローナル, 樹立^{24,39})

抗 EPB41L5 抗体(ウサギ, ポリクローナル, 樹立⁴⁷)

Peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体(ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体(ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

組織染色用抗 Arf6 抗体 (ウサギ, ポリクローナル, Aviva)

正常マウス IgG (Santa Cruz)

Cy3 標識抗マウス IgG 抗体(ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体(ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体(ヤギ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体(ヤギ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

試薬

Atorvastatin は LKT Laboratories から購入した. In vitro アッセイ前に 10 μ M の Atorvastatin を 24 h 作用させた. 購入元を明記していない試薬は全て Sigma-Aldrich もしくは和光純薬より購入した.

SDS-PAGE および WB

第一章において述べた方法により SDS-PAGE と WB を行った. 定量 WB については転写をセミドライ方式で行い, 検出はインフラレッドイメージングシステム (アロカ, Odyssey) を使用して行った. EPB41L5 については検出を ECL にて行い, 発色強度を画像処理ソフト Image J を用いて定量化した.

免疫組織染色

第一章において述べた方法を用いて Morpho Technology 社への外注にて, 免疫組織染色を行った. 相違点としては, 抗 Arf6 抗体 (1:100), 抗 AMAP1 抗体 (1:200), 抗 EPB41L5 抗体 (1:1,000), マウス正常 IgG (1:100) と 30 min 反応させた.

RT (reverse transcription) - PCR (polymerase chain reaction)

TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific) により細胞を溶解し, Direct-zol™ RNA Miniprepkit (ZYMO research) を用いて mRNA を抽出した. SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を作成した. GoTaq® Green (ProMega) システムにより PCR を行い, 1% agarose gel (TAE バッファーにて作成) を使用して TAE バッファー中で電

気泳動を行った後、ゲルを EtBr (ethidium bromide) 染色し、波長 260 nm の紫外線にて検出した。使用したプライマー配列を下に列挙する。 *Amap1* は Sawady に、 *Gapdh* は北海道システムサイエンスに合成を依頼した。

Amap1 forward 5'-ATGAGATCTTCAGCCTCCCGGCTCTCCAGTTTT-3'

Amap1 reverse 5'-AGAAAAGCTTGACAAAAGCGGTGCCAAGGTCAGG-3'

Gapdh forward 5'-TTCCGTGTTCTACCCCAATGTG-3'

Gapdh reverse 5'-ATGCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

使用したバッファーを以下に記す。

TAE バッファー:

40mM Tris, 40mM 無水酢酸, 1 mM EDTA

RNA 干渉

shRNA (short hairpin RNA) を発現する構築をレンチウイルスにより細胞に導入し RNA 干渉による遺伝子発現抑制を行った。ウイルスパッケージング用細胞 293FT (Invitrogen, 完全培地: DMEM, 10% FCS, 6mM L-Glutamine, 0.1mM MEMNEAA, 1mM Pyruvate) に pLKO.1-puro vector をバックボーンとした各種 shRNA 発現用 plasmid, エンベロープ発現用 plasmid の pMD2.G (Addgene #12259), ウイルスパッケージング plasmid の psPAX2 (Addgene #12260) を Lipofectamine LTX (Invitrogen) によりトランスフェクションし、ウイルスを作成した。トランスフェクションは 6-well dish scale で行い、500 uL の opti-MEM (opti- minimum essential media, Invitrogen) に 3 µg の DNA (pLKO:pMD2.G:psPAX2 = 8:1:3), 6 µL Lipofectamine LTX を混合し、室温で 25 min 静置した後 1.5 mL DMEM と共に細胞に加え、24 h インキュベートした。この操作を 40% コンフルエントの状態から 2 回行った。ウイルス感染は φ 6 cm dish scale で行い、ウイルスを発現している 293FT 細胞の培養上清を回収、3000 g で 5 min 遠心したのち、感染させたい細胞に polybrane (終濃度: 8 µg/mL) と共に 24 h 作用させた。ウイルス感染から 48 h 後、puromycin (終濃度: 1 µg/mL) にて selection を行い、各アッセイに細胞を使用した。用いた shRNA のターゲット配列は下に列挙する。

Arf6 5'-CCGGAAGGAGAGAAATCCAAA-3'

Amap1 #1 5'-GACCTGCTGCAGAACCTTATA-3'

Amap1 #2 5'-AGATGTGTGAATATCTCATTA-3'

Amap1 #3 5'-CCAGGGACTTACTTGCATTAA-3'

蛍光組織染色

摘出した腫瘍を OCT (Optimal Cutting Temperature) コンパウンドに包埋後液体窒素にて凍結し、厚さ 10 μm で切片化し、4% PFA を用いて室温 20 min の間固定した。抗 AMAP1 抗体 (1:200), 抗 EPB41L5 抗体 (1:1,000), 抗 CK8 抗体 (1:100), 抗 vimentin 抗体 (1:50), と 4 $^{\circ}\text{C}$, オーバーナイトで反応させた。PBS で洗浄したのち、Cy3 もしくは Alexa488 で標識された二次抗体と室温で 1h 反応させたのち、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 溶液を用いて核を染色した。試料は 50% glycerol/PBS にてマウントし、蛍光顕微鏡観察を行った。AMAP1, EPB41L5, CK8, vimentin 陽性細胞の数を計測しグラフ化した。10 か所以上, 100 個以上の細胞について検討を行った。

転移巣形成アッセイ

MMTV-PyMT マウスを 5 匹ずつの二群に分け、6 週令もしくは 8 週令から 14 週令の間毎日 10 $\mu\text{g/g}$ 体重の Atorvastatin と、コントロールとして 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) /PBS を腹腔投与した。通常多くのマウスが 1-6 つの腫瘍を形成するが、ある腫瘍の最大径が 20 mm に達した時点でマウスを安楽死させた。摘出した肺は 4% PFA で固定し、モルフォテクノロジー社に外注にて HE (hematoxylin eosin) 染色を行った。顕微鏡下で肺転移巣の数を計測した。二群間の比較には Welch *t*-test を用いた。人道的エンドポイントとして上述の最大腫瘍径 20 mm 時点を設定したが、これは給餌・給水・移動などマウスの活動状況を著しく阻害しない程度のものであった。

マトリゲル インベージョンアッセイ

第一章において述べた方法によりインベージョンアッセイを行った。24 h 間の血清飢餓状態に細胞を置いたあと、上部チャンバーに 1×10^5 個の細胞懸濁液を入れ、下部チャンバーには 10% FCS 添加培地を入れた。24 h 後に PFA により固定し、クリスタルバイオレット染色ののち細胞数を計測した。

細胞生存性アッセイ

第一章と同様の方法を用いて細胞生存性アッセイを行った。

GST (glutathione S-transferase) - GGA プルダウンアッセイ

Arf6 の活性を測定する為、GST-GGA プルダウンアッセイを行った。実験原理としては、活性化型 Arf 結合タンパク質の GGA1 由来ペプチドと GST との融合タンパク質を精製し、細胞溶解液と反応させたのち、グルタチオン-セファロースビーズにてプルダウンし、SDS-PAGE, WB にて抗 Arf6 抗体で検出することにより、Arf6 の活性化状態を評価するというものである。具体的には、細胞を

GGA バッファーで溶解し、遠心分離 (15,000 g, 10 min, 4 °C) により夾雑物を除く。タンパク質量 600 µg 分の細胞溶解液を 30 µg の GST-GGA ペプチドを結合させたグルタチオン-セファロースビーズ (GE Healthcare) に 4 °C , 30 min 作用させた。ビーズを 1 mL の GGA バッファーで 3 回洗浄し、30 µL の SDS サンプルバッファーで結合タンパク質を溶出した。プルダウンのサンプルとインプットのサンプルの Arf6 量を SDS-PAGE, WB で検出することにより、各処理における Arf6 の活性化率を検討した。

定量的リアルタイム PCR

RT-PCR の項で記した方法で cDNA を作成し、Premix Ex Taq™ (TaKaRa) により定量的リアルタイム PCR を施行した。検量線描出の為、TOPO PCR cloning (Thermo Fisher Scientific) システムを用いて、PyMT の対象配列を含む遺伝子領域を TOPO vector に cloning した。リアルタイム PCR データの検出は 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行い、絶対定量を行った。使用したプライマーを下に列挙する。リアルタイム PCR 用のプライマーは TaKaRa の、cloning 用のプライマーは Sigma-Aldrich の合成サービスを利用した。

Pymt forward 5'-TGCCTTAATGCAGGAATTGAACAG-3'

Pymt reverse 5'-CCACCCATCCGCATGTAGC-3'

Pymt probe 5'-AATGAATCTAGGAGGAACCGGCTTCCAGGT-3'

Pymt forward (cloning 用) 5'-CTGCTACTGCACCCAGACAA-3'

Pymt reverse (cloning 用) 5'-GCAGGTAAGAGGCATTCTGC-3'

2D 運動能アッセイ

細胞の運動能を評価する為 2D 運動能アッセイと顕微鏡下による細胞形態の観察を行った。φ 35 mm のガラスボトムディッシュに 50 µg/mL fibronectin/PBS を用いてコートした (37 °C , 2 h)。ガラス領域を中心に 1-4 × 10⁴個の細胞を播き込み、最短 10 h 後より、培地に 1/1000 量の Hoechst® 33342 solution (同仁化学研究所) を添加して核染色を 30 min 行った。その後共焦点顕微鏡 (Nikon, A1R) により 5 min 間隔で 6 h の間画像取得を行った。得られたデータは画像解析ソフト NIS-elements Advanced Research (Nikon) により解析した。

ゼラチン ザイモグラフィ

MMP (マトリックスメタロプロテアーゼ, matrix metalloproteinase) の活性を測定する為、ゼラチンザイモグラフィを施行した。細胞生存性アッセイ用

に用意した 96-well スケールの培養細胞の培養上清 100 μ L を非還元 SDS サンプルバッファー 100 μ L と混合し室温, 10 min 静置した. 1 mg/mL Gelatin (Sigma-Aldrich) を添加した 10%アクリルアミドゲル (pH 8.8) を作成し, 20 μ L のサンプルと MMP マーカー (コスモバイオ) を濃縮ゲル (5%アクリルアミド, pH 8.8) にアプライし, SDS-PAGE と同様の組成の Running バッファーにて等電流電気泳動 (125 V, 25 mA, 1 h 30 min) を行った. 泳動後 100 mL の 0.25% Triton X-100 水溶液にて室温, 30 min 振盪した. 次に 100 mL の Zymogram Developing バッファー (テフコ) にて室温, 30 min 振盪した. さらに Zymogram Developing バッファーを交換後, 37°C, オーバーナイトで振盪した. 反応後, ゲルを CBB (coomassie brilliant blue) 染色液 (0.25% CBB, 45.4% メタノール, 9.2% 酢酸) にて 10 min 染色し, 脱色液 (25% エタノール, 8% 酢酸) により適切なコントラストとなるよう調整した. 使用したバッファーを下に記す.

非還元 SDS サンプルバッファー:

53 mM Tris-HCl (pH6.8), 10% Glycerol, 2% SDS, 0.0025% BPB

統計解析

全ての統計解析は excel (Microsoft), R software, Graphpad Prism (GraphPad Software) を用いて行い, $P < 0.05$ を有意とした. 群間の比較には Student *t*-test, Welch *t*-test, Dunnett test を必要に応じて施行した.

【実験結果】

2-1 PyMT および Neu マウスにおける Arf6 経路関連タンパク質の発現量比較

MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスの原発巣を摘出, ホモジェナイズ, 可溶化し, WB によって Arf6 経路関連タンパク質である Arf6, GEP100, AMAP1, EPB41L5 の発現量を比較した. 図 2-1-1 にブロットを示す. WB により AMAP1 の発現量に差がある傾向を見出したことから, 定量的 WB を行った. 図 2-1-2 に示す通り, MMTV-PyMT における AMAP1 のタンパク質発現量が MMTV-Neu と比較して有意に高いことが明らかとなった.

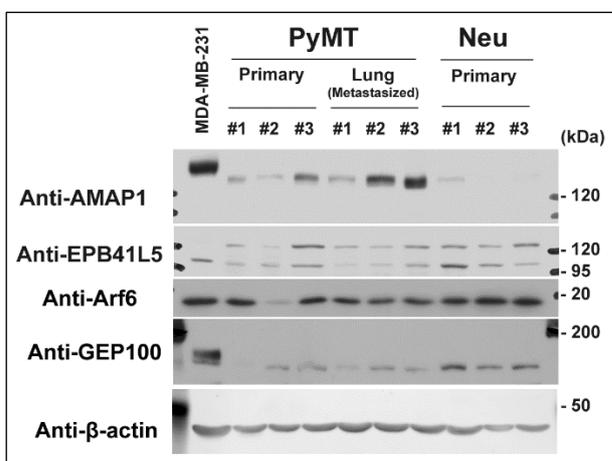


図 2-1-1 PyMT と Neu マウスにおける Arf6 経路関連タンパク質の発現量比較

ウエスタンブロッティングにより MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスにおける Arf6 経路関連タンパク質の発現量を比較した. #1-#3 はそれぞれ別の腫瘍を示す. ポジティブコントロールとして, Arf6 経路関連タンパク質を高発現していると報告されているヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞を用い, 最左端にブロットした. 右端は明示した分子量のマーカ位置を示す.

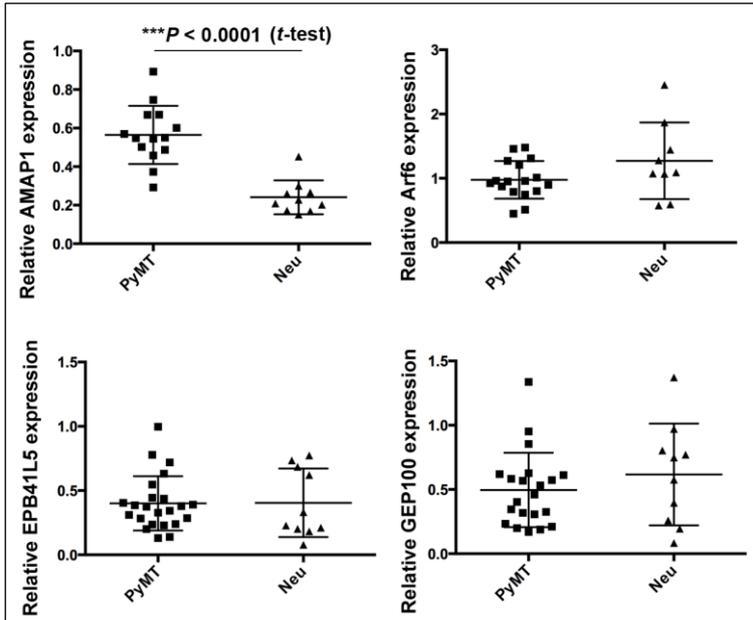


図 2-1-2 定量ウエスタンブロッティングによる *Arf6* 経路発現量の比較

定量ウエスタンブロッティング法により *MMTV-PyMT* マウスと *MMTV-Neu* マウスにおける *Arf6* 経路関連タンパク質の発現量を比較した。図中の一点が各腫瘍のタンパク質発現量を示す。タンパク質発現量は β -actin もしくは γ -tubulin の発現量により標準化した。***は $P < 0.0001$ を示す。

2-2 Arf6 経路関連タンパク質の組織内発現部位

AMAP1 の発現が正常間質細胞によるものである可能性を排除するため、免疫組織化学により組織中の発現部位を検討した。図 2-2-1 に示す通り、原発巣においては Arf6 経路関連タンパク質を間質の正常細胞ではなく、腫瘍細胞が主として発現していることがわかった。また、MMTV-Neu マウスにおいても肺転移巣においては AMAP1 タンパク質の発現が上昇してくる可能性を見出した。

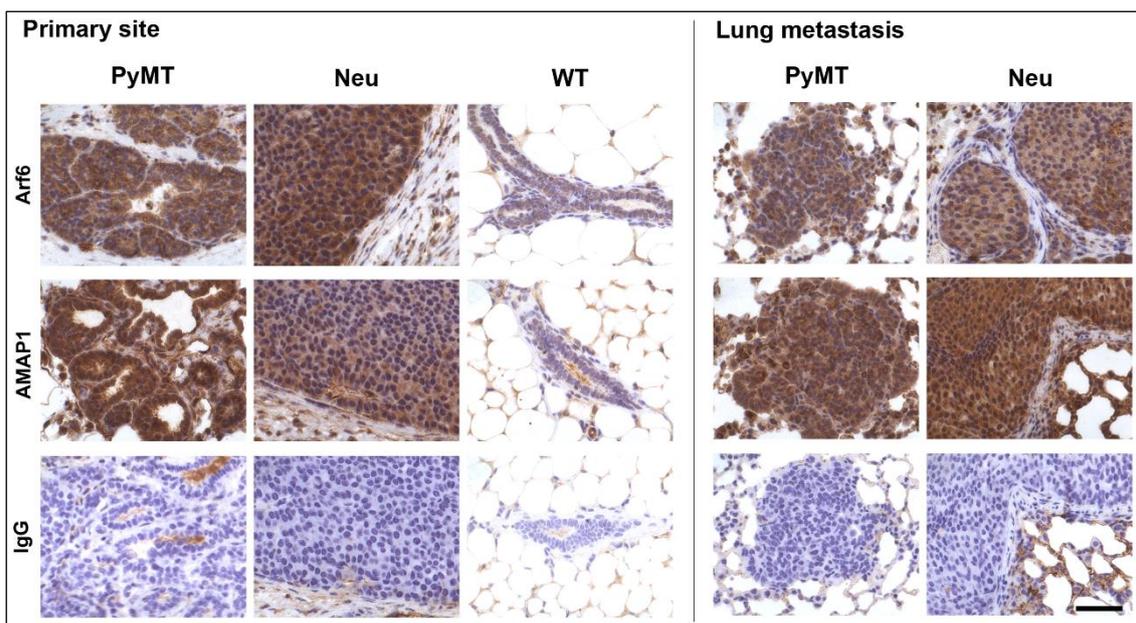


図 2-2-1 PyMT および Neu マウスにおける免疫組織染色

MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスの乳癌原発巣および肺転移巣を摘出し、免疫組織化学法により染色を行った。コントロールとして WT (wild type, ワイルドタイプ) マウスの乳腺組織についても同様の解析を行った。抗 Arf6 抗体, 抗 AMAP1 抗体, normal-IgG を用いた。スケールバーは 50 μm を表す。

2-3 PyMT マウスと Neu マウスにおける AMAP1 mRNA の発現量比較

私の所属する分子生物学分野ではこれまで、AMAP1 のタンパク質発現は転写後調節が主であり、タンパク質発現量と mRNA 発現量には相関がみられないことを述べてきた。MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスの比較においても、同様であるかを検討した。図 2-1-1 のプロットに用いたマウスと同個体の別腫瘍の mRNA を抽出し、RT-PCR により AMAP1 発現量を比較した。図 2-3-1 に示す通り、MMTV-PyMT マウスにおいて MMTV-Neu マウスよりも AMAP1 mRNA 発現量が高いことを見出した。次に、この傾向が一般的に見られるかを検討する為、すでに論文として公開されているマイクロアレイのデータを解析した。NCBI (national center for biotechnology information) の GEO⁷¹ (gene expression omnibus) に登録されている、乳癌モデルマウスの遺伝子発現プロフィールを比較したマイクロアレイデータ⁶⁸ (登録番号: GSE3165, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE3165>) を解析した。図 2-1-2 に示す通り、MMTV-PyMT マウスにおいて MMTV-Neu マウスよりも Amap1 mRNA 発現量が高かった。これらの結果から MMTV-PyMT マウスにおいては Amap1 mRNA の発現上昇により AMAP1 タンパク質高発現が引き起こされている可能性が示唆された。

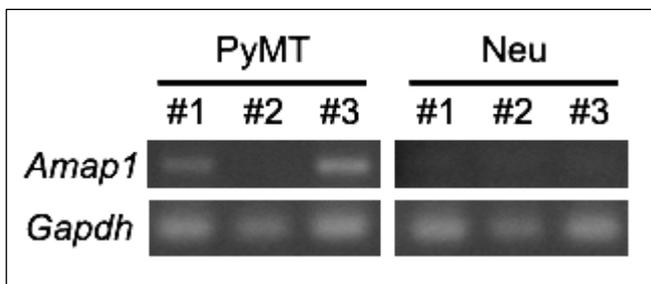


図 2-3-1 PyMT および Neu マウスにおける Amap1 mRNA 発現量比較

RT-PCR により MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスの Amap1 mRNA の発現量を比較した。図は同一のゲルのプロットである。

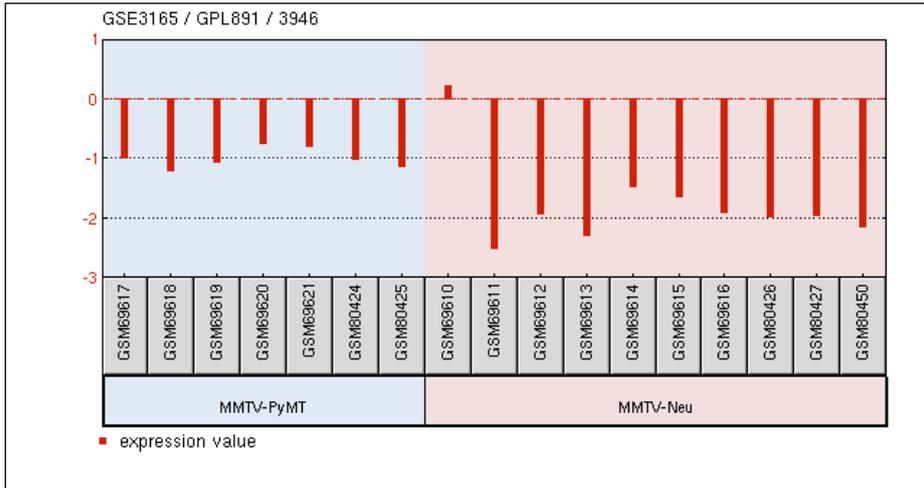


図 2-3-2 マイクロアレイデータ解析による *AMAP1* mRNA 発現量比較

GEO ⁷¹ に登録されているマイクロアレイデータ ⁶⁸ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE3165>) を独自に解析し、*MMTV-PyMT* マウスと *MMTV-Neu* マウスにおける *Amap1* mRNA 発現量を比較した。縦軸はシグナル値の \log_2 値を示す。

2-4 AMAP1 高発現と EMT マーカー

AMAP1 を高発現する細胞が EMT を経ているか否かについて検討を行った。まず、上皮性マーカーの CK8 と間葉系マーカーである vimentin について共染色を行ったところ、図2-4-1に示す通り、これら二種を共発現する細胞は少なく、互いに排他的に染色されているといえる。図 2-4-2 では Arf6 経路関連タンパク質であり、間葉系の形質を獲得した細胞で発現することが知られている EPB41L5 の発現と EMT ステータスを確認した。EPB41L5 発現陽性細胞では原発巣、転移巣ともに約 70%が vimentin 陽性、CK8 陰性であった。図 2-4-3 に示す通り、AMAP1 は原発巣においては間葉系マーカーである vimentin と共発現する細胞が 53%であり、転移巣においては 66%とこの傾向は増強されていた。CK8 陰性細胞は原発巣で 80%、転移巣で 72%といずれも高値を示した。以上より、Arf6 経路を強く駆動している細胞では EMT を経ている可能性が示唆された。

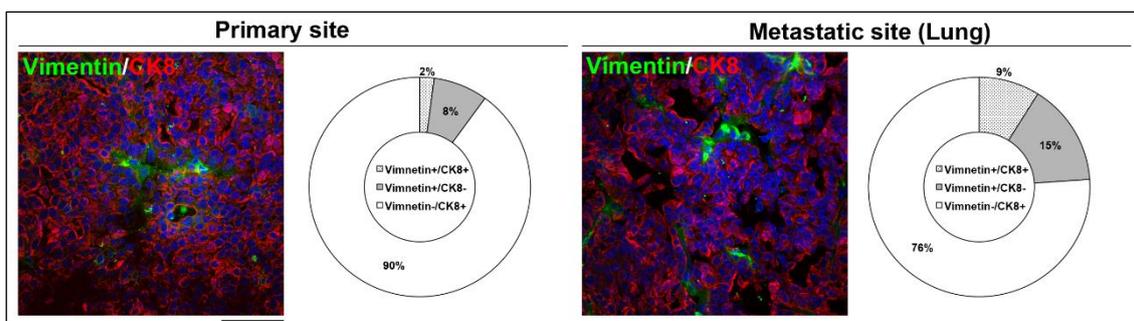


図 2-4-1 PyMT マウスにおける vimentin/CK8 の蛍光共染色

組織蛍光染色により間葉系マーカーである vimentin と上皮性マーカーである CK8 を発現する細胞の数を計測し、発現状況ごとの割合を求めた。10 視野 100 個以上の細胞を数えている。スケールバーは 50 μm を表す。

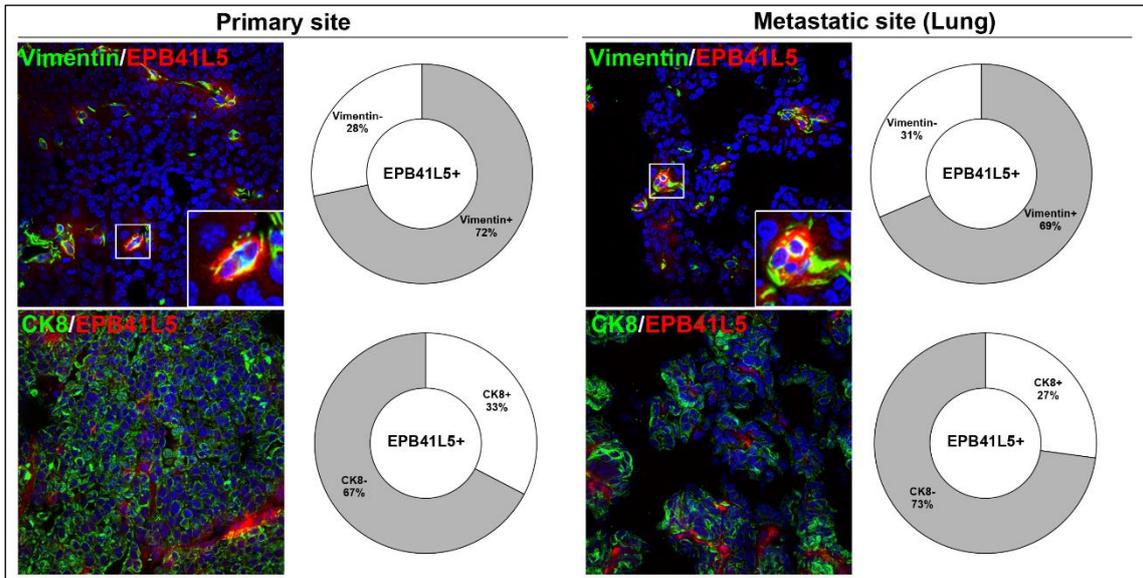


図 2-4-2 PyMT マウスにおける *vimentin* もしくは *CK8* と *EPB41L5* の共染色
 MMTV-PyMT マウスの原発腫瘍と肺転移巣において、組織蛍光染色により *vimentin* と間葉系タンパク質であり *Arf6* 経路の構成タンパク質の一つである *EPB41L5*, あるいは *CK8* と *EPB41L5* を発現する細胞の数を計測し、発現状況ごとの割合を求めた. 10 視野 100 個以上の細胞を数えている. 図 2-4-1 と同縮尺である.

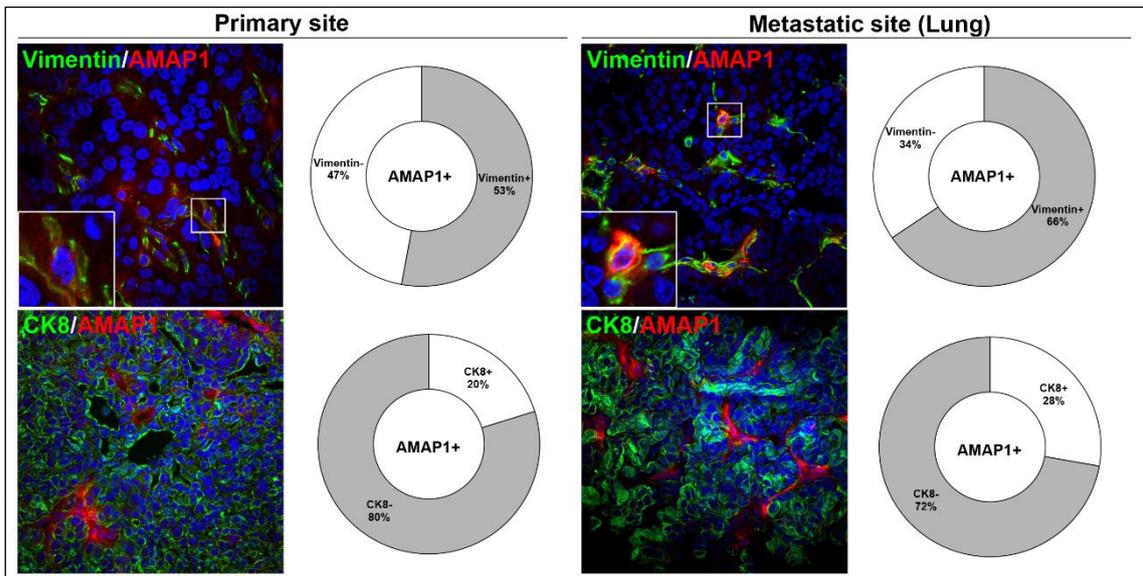


図 2-4-3 PyMT マウスにおける *vimentin* もしくは *CK8* と *AMAP1* の共染色
 MMTV-PyMT マウスの原発腫瘍と肺転移巣において、組織蛍光染色により *vimentin* と *Arf6* 経路の構成タンパク質の一つである *AMAP1*, あるいは *CK8*

と *AMAP1* を発現する細胞の数を計測し、発現状況ごとの割合を求めた。10 視野 100 個以上の細胞を数えている。図 2-4-1 と同縮尺である。

2-5 Arf6 と AMAP1 のノックダウンが細胞浸潤性に与える影響

Arf6 と AMAP1 の遺伝子発現抑制により細胞の浸潤能が変化するか検討を行った。MMTV-PyMT マウス由来の初代培養細胞にウイルスベクターを用いて shRNA を導入し、Arf6 と AMAP1 の遺伝子発現抑制を行うことで、細胞の浸潤能が変化するかをマトリゲルインベーションアッセイにて確認した。図 2-5-1 にその結果、図 2-5-2 にその際の細胞生存性、図 2-5-3 に遺伝子発現抑制の効率を示す。MMTV-PyMT マウス由来の初代培養細胞において Arf6 と AMAP1 の遺伝子発現抑制により有意に浸潤能が低下した。

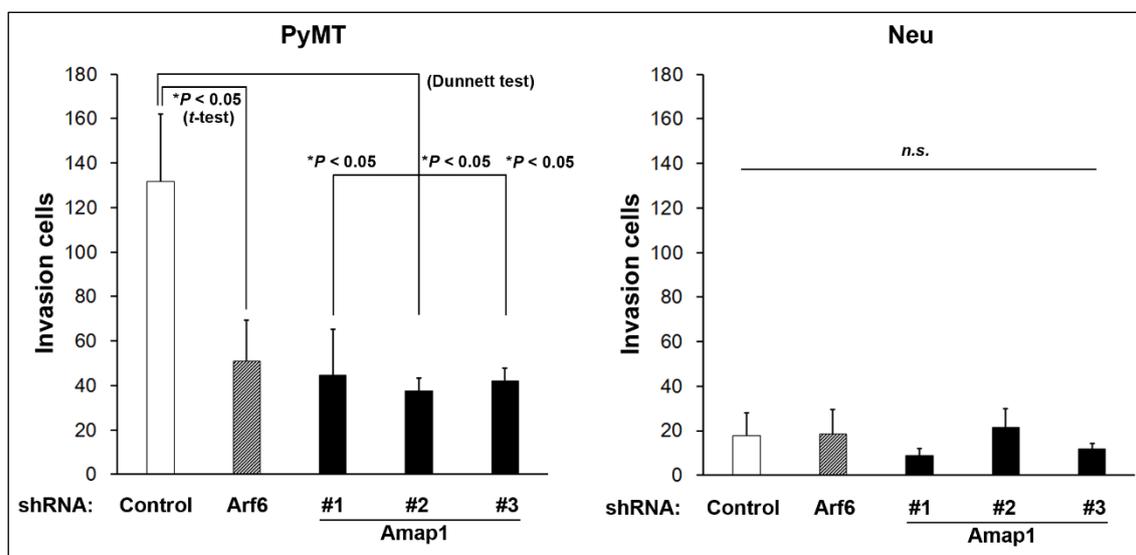


図 2-5-1 PyMT および Neu マウス由来初代培養細胞の浸潤活性

MMTV-PyMT および MMTV-Neu マウス由来の初代培養細胞を用いて、shRNA の強制発現により Arf6 および AMAP1 の遺伝子発現抑制を行った際の浸潤活性を測定した。マトリゲルインベーションアッセイにより下部チャンバーに移動した細胞の数を計測し、その個数を図示した。*は $P < 0.05$ を示す。

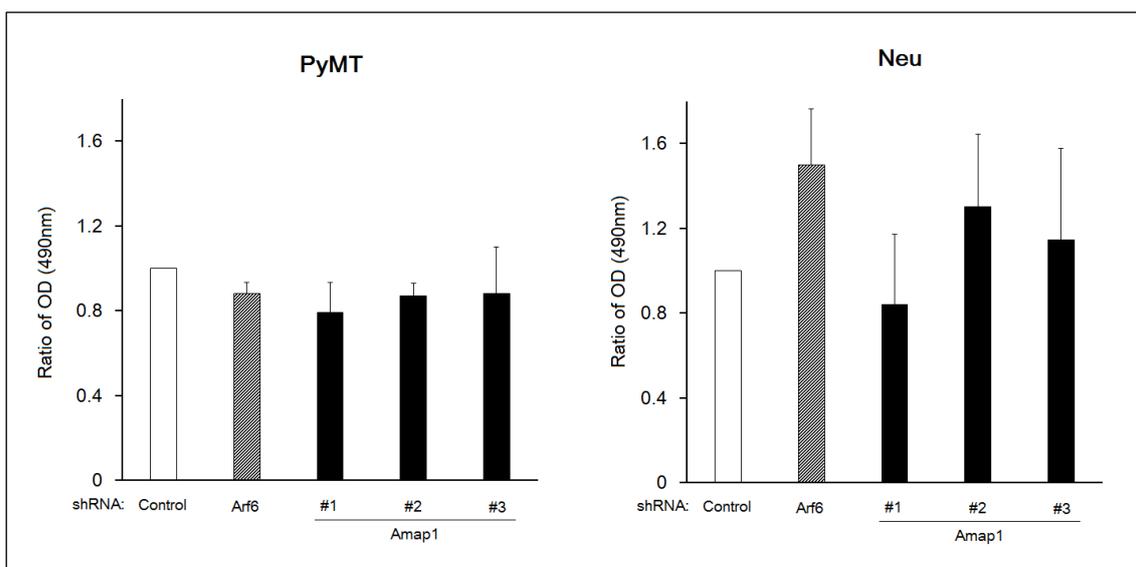


図 2-5-2 Arf6 と AMAP1 の遺伝子発現抑制による細胞生存性への影響

細胞生存性アッセイによりインベーションアッセイに用いた細胞の *viability* を求めた. 群間比較には *Welch t-test* を施行した. 各群間に有意差は認めなかった.

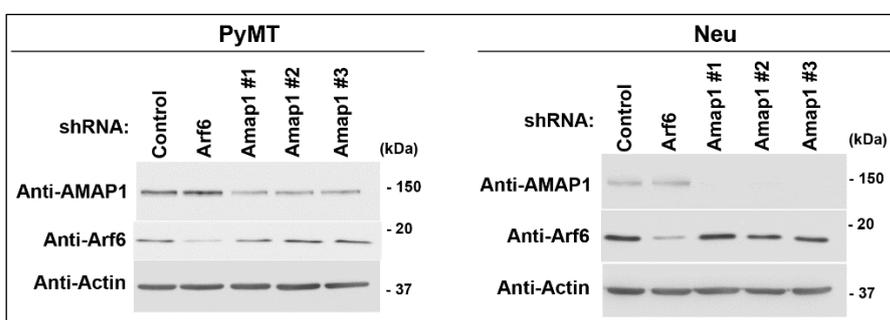


図 2-5-3 PyMT および Neu マウス由来初代培養細胞における遺伝子抑制効率

インベーションアッセイに用いた細胞群について Arf6 および AMAP1 の発現量と遺伝子抑制効率をウエスタンブロッティング法により調べた.

2-6 Arf6 と AMAP1 のノックダウンが細胞運動性に与える影響

前節で述べた, Arf6 と AMAP1 のノックダウンによる細胞の浸潤活性抑制に関して, 詳細な機序を検討した. 細胞が浸潤活性を示すには, 運動能と基底膜を突き破るための MMP 活性の上昇が必要である. まず, 細胞の運動能に Arf6 と AMAP1 のノックダウンが寄与するかを 2D 運動能アッセイにより検討した. 共焦点顕微鏡 (Nikon, A1R) により 5 分間隔で 6 時間画像を取得し, その観察期間における細胞の移動距離を算出した. 各処理あたり 10 細胞分のデータを図 2-6-1 に示す. Arf6 または AMAP1 の遺伝子発現抑制により, 細胞の運動能が減少することを見出した. また, この時の細胞の微分干渉像を図 2-6-2 に示す. 形態的にコントロール細胞においては移動方向にフィロポディアを形成しているのに対し, Arf6 もしくは AMAP1 をノックダウンした細胞においては, 細胞の辺縁がギザギザしたような形態を示し, フィロポディアをうまく形成できていない可能性が示唆された.

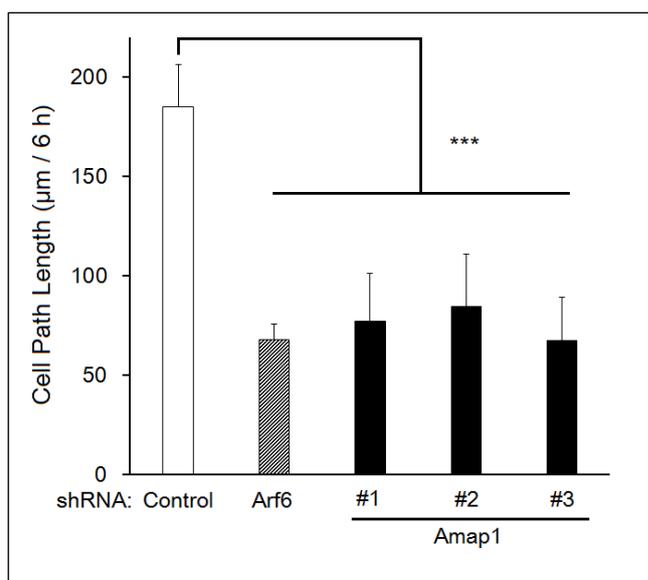


図 2-6-1 Arf6 と AMAP1 のノックダウンによる細胞運動能への影響

2D 運動能アッセイにより, 6 時間の観察期間で細胞が移動した積算距離 (μm) を図示した. 5 分間隔で 6 時間画像を取得し, 画像処理ソフト NIS-Element により積算距離を算出した. 各処理群あたり 10 の細胞の軌跡をトラックした. 群間比較には Welch *t*-test を施行した. ***は $P < 0.001$ を示す.

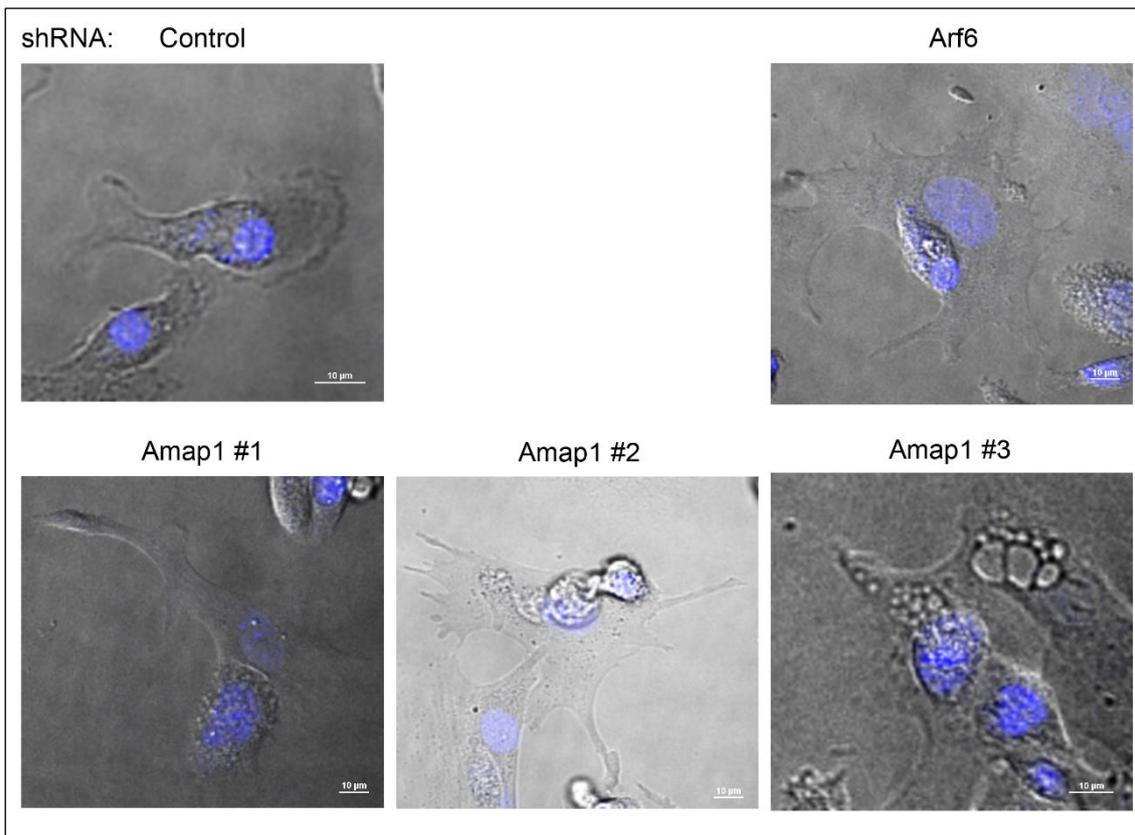


図 2-6-2 Arf6 と AMAP1 のノックダウンによる細胞形態の変化

2D 運動能アッセイに用いた細胞の形態観察を行った。共焦点顕微鏡による微分干渉像と *Hoechst@ 33342* による核染色像を重ねた画像を示す。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ を表す。

2-7 Arf6 と AMAP1 のノックダウンが MMP 活性に与える影響

次に MMP の活性を測定するためゼラチンザイモグラフィを行った。図 2-7-1 に示す通り、培養上清中の MMP 活性は Arf6 と AMAP1 のノックダウンによって影響を受けなかった。

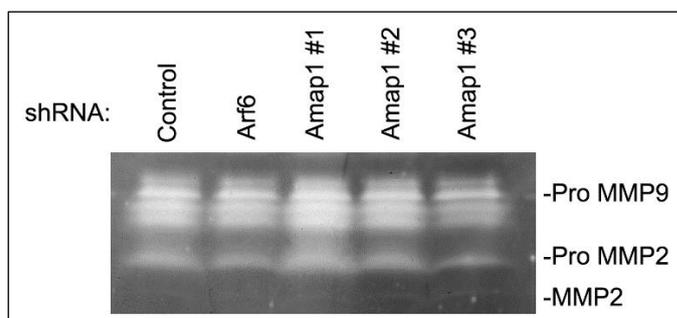


図 2-7-1 PyMT マウス由来細胞培養血清中の MMP 活性

ゼラチンザイモグラフィにより Arf6 または AMAP1 を遺伝子発現抑制した際の細胞培養上清中の MMP 活性を測定した。MMP 活性について明確な差異は認められなかった。

2-8 スタチンにより MMTV-PyMT マウスの転移巣形成を抑制できる

以前われわれは, Arf6 経路の活性化にはコレステロール生合成系であるメバロン酸経路の活性化が必須であることを見出しており, メバロン酸経路の律速酵素の競合阻害薬であり高脂血症治療薬のスタチンが, 乳癌の悪性度進展を抑えることを報告した²⁵. これに関連して, MMTV-PyMT マウスの転移巣形成能をスタチンが抑制するか検討を行った. まずは *in vitro* の系を用いて検討を行った. GGA-pull down assay により活性化型 (GTP 結合型) Arf6 の量を調べたところ, スタチンの処理により僅かながら減少傾向が見られた. 結果を図 2-8-1 に示すが, この実験は操作中の温度変化やタンパク質濃度などによる結果のブレが大きく, 確実な再現性を担保できていないことが課題である. また, これらの処理を行った細胞を用いて浸潤能を調べたところ, スタチン処理により浸潤能が低下した. この時の結果を図 2-8-2 に, 細胞の生存性を図 2-8-3 に示す. 次に *in vivo* での転移抑制実験を行った. 6-8 週令の PyMT マウスに 12 週令まで Atorvastatin を毎日投与し, 腫瘍が最大径 20 mm を超えるまでの期間と, その際の肺転移の数を記録した. 全生存率と体重増減を評価しなかった理由は, 腫瘍が発生する数, タイミング, 腫瘍増大のスピードが個体によって異なり, 評価したい事柄があいまいになることと実験動物に必要以上の苦痛を与える可能性を考慮したためである. ここでは, Atorvastatin が転移巣形成に抑制的であるかどうかを評価点とした. 図 2-8-4 に示す通り, 腫瘍が最大径 20 mm を超えるまでの期間はスタチン投与群とコントロール群において差はなかったが, 肺転移巣の数は有意にスタチンにより減少していた. この時の病理像を図 2-8-5 に示す. なお, 一匹のマウスが形成する腫瘍の数と大きさと発生時期に大きなばらつきがあることから, 体重の増減ではなく最大腫瘍径が 20 mm に達する時点の日数に差がないという観測事実を基に Atorvastatin による重大な副作用が発生していないことと腫瘍形成能自体を阻害する効果はないと考えた.

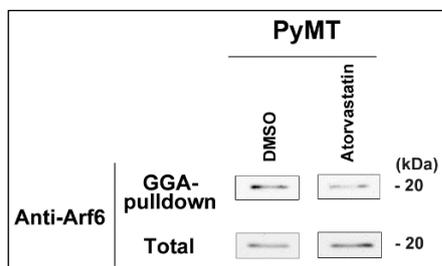


図 2-8-1 Atorvastatin 処理による活性化型 Arf6 の存在比の変化

GST-GGA プルダウンアッセイにより各処理群における活性化型 Arf6 の存在比を検討した. 上段の GST-GGA プルダウンのサンプルが活性化型 Arf6 量を, 下段の Total サンプルが全 Arf6 の量を表す. 活性化型 Arf6 の存在比は

Atorvastatin 処理によって僅かながら減少傾向がみられた。この実験は操作が非常に難しく、実験手技の向上が課題である。

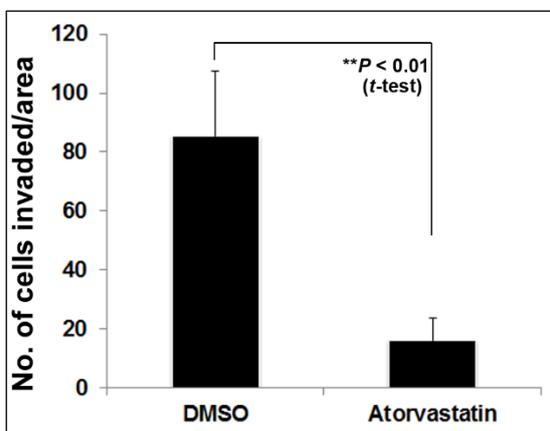


図 2-8-2 *Atorvastatin* の *PyMT* マウス由来初代培養細胞の浸潤活性抑制作用

MMTV-PyMT マウス由来の初代培養細胞を用いて、*Atorvastatin* 処理による浸潤活性変化を測定した。マトリゲルインベーションアッセイにより下部チャンバーに移動した細胞の数を計測し、その個数を図示した。*は $P < 0.05$ を示す。

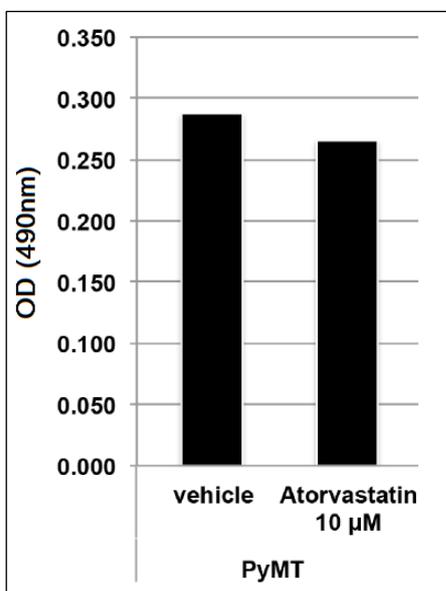


図 2-8-3 *PyMT* マウス由来細胞のスタチン処理による細胞生存性への影響

細胞生存性アッセイによりインベーションアッセイに用いた細胞の *viability* を求めた。群間比較には *Welch t-test* を施行した。各群間に有意差は認めなかった。

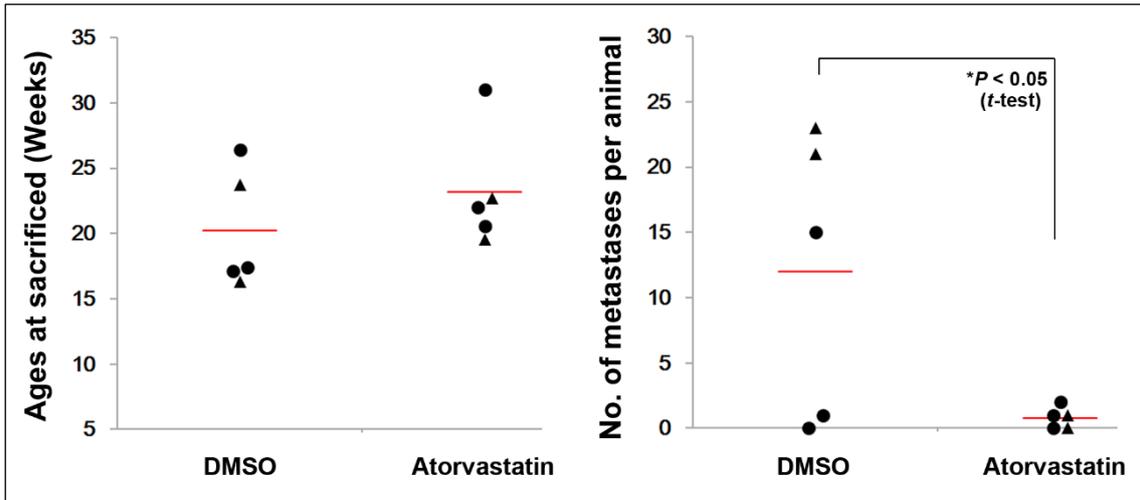


図 2-8-4 Atorvastatin の転移巣形成能抑制効果

MMTV-PyMT マウスにおいて 6 週令 (▲) または 8 週令 (●) から 14 週令まで毎日、腹腔内投与によりコントロール溶液 (DMSO/PBS) もしくは Atorvastatin を投与し、最大腫瘍径が 20 mm に達した時の肺転移巣の数を顕微鏡下に計測した。左のグラフは最大腫瘍径が 20 mm に達した時の各マウスの週齢を示す。両群間に有意差は認められなかった。右のグラフは各群マウスの肺転移巣の数を示す。左右両肺を正中で縦断し切片化, HE 染色のあと顕微鏡下に肺転移巣の数を計測した。グラフの値は左右肺の合計値。Welch t-test により有意差を認めた。

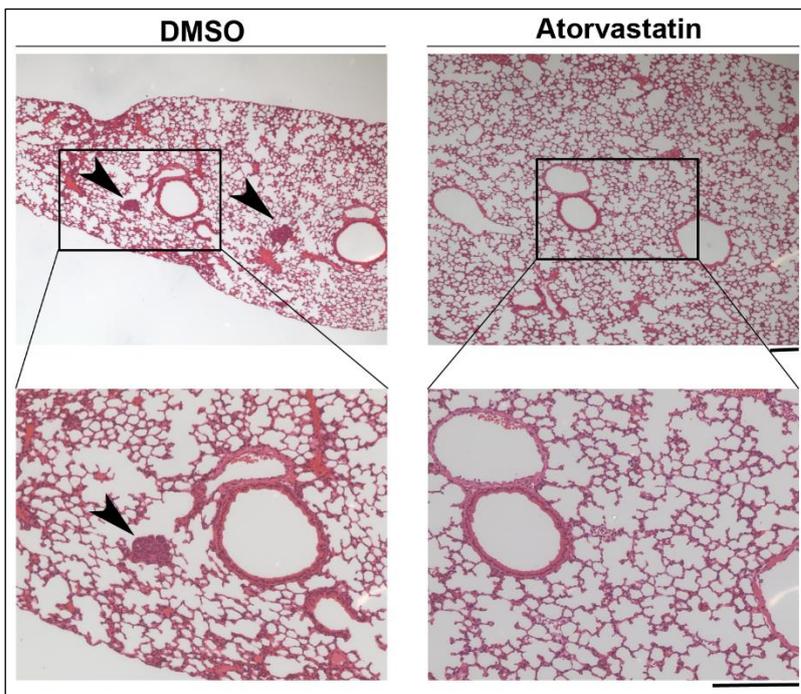


図 2-8-5 PyMT マウスにおける肺転移巣の病理像

DMSO 投与群と Atorvastatin 投与群の MMTV-PyMT マウスについて摘出した肺を PFA 固定したのち切片化, HE 染色を行い, 肺転移巣の数を数えた. その際の病理像を示す. 矢印が転移巣である. スケールバーは 50 μm を示す.

2-9 発癌初期播種細胞の検出について

PyMT タンパク質は膜表面に発現するタンパク質ではないため、血中もしくは骨髄中からごく少量存在するであろう発現細胞、つまり乳癌初期播種細胞を検出することが難しい。今回は最も可能性のある方法として、骨髄中の細胞における PyMT 発現量について定量 PCR を用いて比較検討した。その結果を図 2-9-1 に示す。WT マウスではシグナルが検出限界以下であった。MMTV-PyMT マウスにおいては、骨髄転移が始まるとされる 6 週令から 8 週令^{5,70}の間にシグナル値の変動が起こる事を予想したが、肺に複数の転移巣が確認された 24 週令の個体が飛びぬけて高い数値を示した他は、6 週齢以降ほぼ同じ値のシグナルが検出された。興味深いことに、オスの MMTV-PyMT マウスについても高いシグナル値を検出した。これは腫瘍細胞以外にもマウス骨髄中に PyMT を発現する細胞が紛れ込んでいる可能性を示唆している。実際、MMTV が唾液腺や性腺等で一部活性化することも報告されており⁷²、少なくとも現段階では腫瘍細胞のみを検出することは困難であると判断した。発癌のどこかの段階で蛍光を示すようなマウスとの掛け合わせにより、この問題は解決される可能性がある。

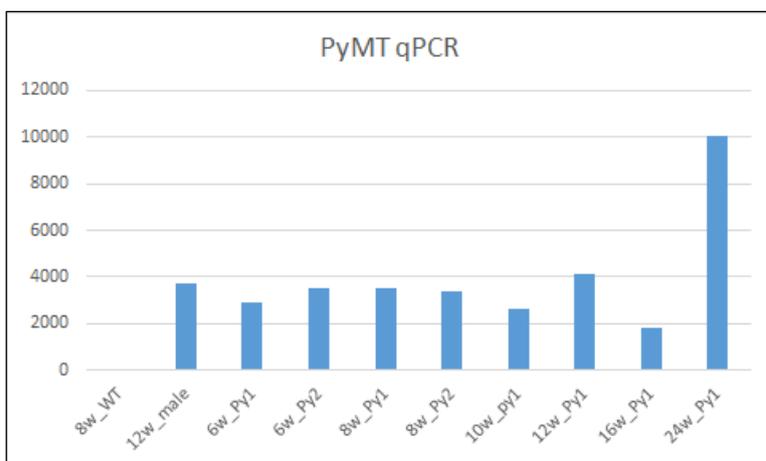


図 2-9-1 マウス骨髄中の PyMT mRNA 発現量

定量的リアルタイム PCR を用いてマウス骨髄中の PyMT mRNA 発現状況を調べた。縦軸は蛍光強度を示す。1 カラムごとに別のマウス個体を示している。

2-10 AMAP1 高発現が遺伝子発現状況を大きく変化させる可能性について

最後に、これまで述べてきた AMAP1 タンパク質の高発現が、細胞の遺伝子発現状況を大幅に変化させる可能性について検討した。まず北海道大学大学院医学院分子生物学分野所属の小野寺康仁講師が以前行った酵母ツーハイブリッド法により得られたデータ^{39,73}から、AMAP1 と直接的に相互作用する可能性のある TF を探索したところ、RREB1 (ras responsive element binding protein 1) と UBP1 (upstream binding protein 1) が挙げられた。これらの TF が制御する代表的な遺伝子を NCBI の OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) などのデータベース^{29,74}を用いて検索し、RREB1 は B2m (β -2 microglobulin), Agt (angiotensinogen), Calca (calcitonine) を、UBP1 は Cyp11a1 (cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1) を挙げた。これらの遺伝子の発現量を 2-3 節で用いたマイクロアレイデータ^{68,71}を利用して AMAP1 高発現の MMTV-PyMT マウスと低発現の MMTV-Neu マウスで比較検討した。図 2-10-1 に示す通り、B2m で大きな変動が見られた以外は有意な差を認めることは無かった。

また、これまでの観察から AMAP1 ノックアウトマウスが胎生致死でないことも確認しており、AMAP1 高発現が遺伝子発現プロファイルを大幅に変更する可能性は低いと判断した。このことから、AMAP1 の高発現は悪性度進展の「原因」であると同時に、細胞内あるいは細胞周囲の状況変化の「結果」であり、今後は Arf6 経路の活性化がマウス体内で起こってくる過程を明らかにすることが大きなテーマになると思われる。

Gene.symbol	logFC	上流因子と制御方向	P.Val
B2m	-3.64223	RREB1 ↑	8.34E-06
Agt	-0.04016	RREB1 ↓	9.64E-01
Calca	-0.00349	RREB1 ↑	9.96E-01
Cyp11a1	0.474586	UBP1 ↑	1.56E-01

図 2-10-1 AMAP1 と相互作用する可能性のある TF と制御遺伝子の発現量比較

AMAP1 と相互作用する可能性のある TF とその制御遺伝子を抽出し、MMTV-PyMT と MMTV-Neu のマイクロアレイデータから発現量を比較した。logFC (fold change の log₂ 値) が正の場合、MMTV-PyMT における発現量が MMTV-Neu に比べて高い。いずれにしても B2m 以外の遺伝子については発現量に有意な差はなかった。

【考察】

本研究において、Arf6 経路を悪性度進展に利用する自然発癌モデルマウスとして MMTV-PyMT マウスを同定した。同時に、遺伝子発現プロファイルが近い系統でありながら悪性度進展が緩徐である MMTV-Neu マウスとの対比により、Arf6 経路構成タンパク質である AMAP1 のタンパク質発現量が乳癌モデルマウスの悪性度進展に大きく寄与していることを示した。MMTV-PyMT マウスでは MMTV-Neu マウスに比べて AMAP1 の mRNA とタンパク質の発現量が高くなっており、MMTV-PyMT マウス由来初代培養細胞の Arf6 もしくは AMAP1 の遺伝子発現を抑制することにより、細胞の運動能が阻害され、引き続いて細胞の浸潤能が抑制されることを見出した。この効果はスタチンによっても見出され、MMTV-PyMT マウスにおける *in vivo* 転移実験からもその臨床的効果が示唆された。

AMAP1 の mRNA は複雑かつ長い 5' UTR (untranslated region) を持っている。その中には TOP (terminal oligopyrimidine) 配列と IRES (internal ribosomal entry site) が含まれ、複雑な転写後調節が行われていることが示唆される。実際、ヒト乳癌においては AMAP1 の mRNA 発現量とタンパク質発現量が相関しないことを見出している。本研究においては、MMTV-PyMT マウスと MMTV-Neu マウスにおいて、mRNA レベルで AMAP1 の発現変動が見られた。このことは新たな Arf6 経路の活性化機構の可能性を示唆するとともに、今後の解析の課題である。MMTV-Neu マウスの腫瘍においても、肺転移巣形成時には AMAP1 の発現量が上昇しているように見えることから、最終的には Arf6 経路を利用する可能性がある。いずれにしても、AMAP1 発現上昇の起こるタイミングと内部環境変化がこれらマウスの悪性度進展の速度の違いを生み出している可能性は高いと思われる。

スタチンによる転移巣形成能阻害効果を検討する実験については、n 数を増やす必要がある。また使用したスタチン濃度がヒトの使用濃度に比べ非常に高値である（高脂血症治療薬としての使用量の約 1000 倍）ことも考慮しなければならない。ヒトとマウスではスタチンの効能に大きく差が出るという報告もあり⁷⁵⁻⁷⁸、有害事象の検討と共に詳細な検証が必要とされる。

AMAP1 ノックアウトマウスは non-phenotype であることを当研究室にて確認しているが、今後は MMTV-PyMT マウスとの掛け合わせによってどのような影響が出るかを確認することも必要となると考えている。これにより、MMTV-PyMT マウス由来乳癌の悪性度進展における Arf6 経路の果たす役割をより詳細に検討できるとともに、Arf6 経路以外のシグナル経路との関与も検討することが出来るだろう。また、今回の実験は AMAP1 の発現抑制系についてのみ検討を行っているが、MMTV-Neu マウスを利用して、早期に AMAP1 を過剰発現す

ることにより腫瘍細胞の浸潤能にどのような影響が出るのかを検討する必要がある。

はじめこの章の研究をデザインした段階では、発癌初期播種に Arf6 経路が関与するかを検討することを最終的な目標としていた。しかしながら、PyMT が膜タンパク質でないことから、骨髄中や末梢血中に遊出した腫瘍細胞を特定することが非常に難しく、中断した状態である。最も可能性があるかと思われた骨髄中の PyMT mRNA 量の定量的リアルタイム PCR による比較も、オスの MMTV-PyMT マウスでの検出によって慎重な検討を余儀なくされた。このことは乳腺以外の組織でも MMTV が活性化する可能性により説明可能であるが、初期播種した腫瘍細胞の検出には蛍光タンパク質発現マウスとの掛け合わせ等を前提とした新たな実験デザインが必要になると思われる。とはいえ、MMTV-PyMT マウスはこれまで抗 PD-1 療法の検討を始め、乳癌の自然発癌モデルマウスとして様々な局面で広く利用されてきた系統であり⁷⁹、そのモデルマウスの癌悪性度進展の主要な経路を明らかにしたという点で、有用意義な研究であったと考えている。

第三章

上皮間充織転換におけるミトコンドリアダイナミクス

【諸言】

はじめに

細胞の機能変化, 形態変化, 遺伝子発現変化, および代謝状態の変化がどのような時系列で制御されているかは, 昨今の分子生物学における大きなテーマの一つである. 例えば Prives らのグループは「ゲノムの守護神」ともいわれる p53 タンパク質がコレステロール生合成経路であるメバロン酸経路の活性調節に関与することを示した⁸⁰. また Pearce らのグループは T cell の機能分化においてミトコンドリアの形態変化が酸化的リン酸化の活性を調節し, そのことが memory T cell と effector T cell への分化過程に先立つことを示した⁸¹. 本研究においては第二章まで, EMT という細胞の形態変化と機能変化の中で, Arf6 経路を構成する遺伝子の発現変化がどのように関連するかについて解析を行ってきた. それでは, EMT や Arf6 経路活性化と細胞内代謝状態の変化はどのように関連するのだろうか. 本章では, この EMT 過程において, 細胞内代謝の中心的オルガネラであるミトコンドリアの形態に大きな変化が起こることについて報告する.

ミトコンドリアの機能と形態

ミトコンドリアは好気呼吸を司る細胞小器官である⁸²⁻⁸⁴. 脂質二重膜でできたミトコンドリア内膜と外膜をもち, 内膜に存在する呼吸鎖複合体と呼ばれる巨大なタンパク質複合体が協調的にはたらくことにより膜間の H⁺濃度勾配を形成し, そのエネルギー差によって ATP を生成している⁸²⁻⁸⁴. これら一連の化学反応を OXPHOS (酸化的リン酸化, oxidative phosphorylation) とよぶ. ミトコンドリアはまた, Ca²⁺の貯蔵やアポトーシス経路の引き金となるチトクロム c (cytochrome c) の放出といった役割も担っている⁸²⁻⁸⁴. ミトコンドリアの起源としては細胞内共生説が有力視されており, リケッチアに近い原核生物が, 真核細胞に取り込まれてできたものと考えられている⁸⁵. ミトコンドリアに脂質二重膜が二枚存在することもこの説をサポートしている. 真核細胞が, 非常に効率の良いエネルギー産生システムと同時に, 自死の機構 (共生を起こす前はもちろん他者を攻撃するためのものだったと考えられる) を外生物から取り入れたとすれば, まさしく生命としての神秘である. ミトコンドリアの OXPHOS 活性は, クリステと呼ばれる内膜陥入部の構造やミトコンドリア自体の形態と関連することが報告されている⁸²⁻⁸⁴. OXPHOS 活性が高いミトコンドリアでは

クリステが密かつ管状のミトコンドリア形態を示し、OXPHOS 活性が低いミトコンドリアでは、クリステが疎かつ顆粒状のミトコンドリア形態を示す⁸²⁻⁸⁴。ミトコンドリアダイナミクスとも言われるこのトピックは、超解像顕微鏡など観察技術の飛躍的な向上に伴って研究が発展し、T cellをはじめ様々な細胞機能において重要であると考えられてきており、最近大きな注目を浴び始めている⁸¹。

ミトコンドリアの形態制御

ミトコンドリアの形態制御にはまだまだ未解明な部分も多いが、細胞膜の陥入とよく似た制御が行われていることが知られている。Drp1 (dynamin related protein 1, ダイナミン関連タンパク質 1) は G タンパク質の一種であり、ミトコンドリア膜の fission を引き起こす^{86,87}。Drp1 はリン酸化などの翻訳後修飾による制御も強く受け、非常にスピーディーな反応を引き起こす⁸⁶⁻⁸⁹。Fission 因子としてミトコンドリア外膜上にあり Drp1 をリクルートする因子 Fis1 (Fission 1) も報告されており、他に 3 種類の似たはたらきを持つ因子が同定されている^{86,87}。ミトコンドリアの fusion を制御するタンパク質としては Opa1 (Optic Atrophy 1) や Mfn1/2 (Mitofusin 1/2) などが存在する。これらは互いにホモ二量体を形成でき、別のミトコンドリア膜同士を近接させ融合させる^{86,87}。また、ミトコンドリア膜に特徴的に存在するリン脂質であるカルジオリピンがミトコンドリア膜の曲率維持や fusion-fission に重要であるという報告もあり⁹⁰、多角的な制御を受けていることが知られている。なお Drp1 の全身性遺伝子ノックアウトマウスは胎生致死であることが報告されている⁹¹。このことからミトコンドリアダイナミクスは生体の主要な機能に深くかかわっているものと推測される。

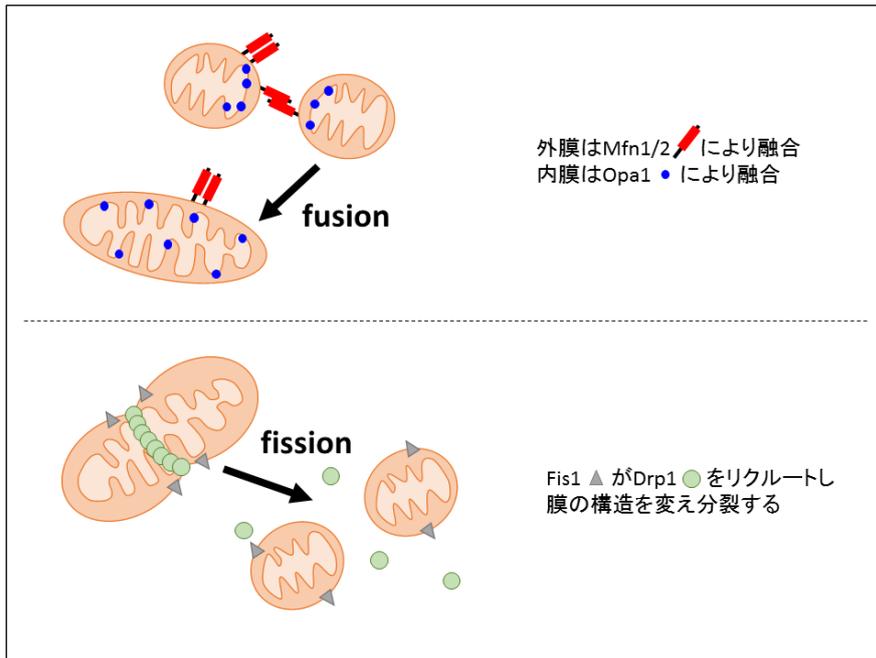


図 3-A ミトコンドリアダイナミクスの制御機構

ミトコンドリアの構造と、これまで報告されている形態制御因子を模式図に示した^{86,87}.

ミトコンドリアダイナミクスの生物学的意義

ミトコンドリアダイナミクスと細胞機能との関係は多くの例が報告されているがその解釈は複雑であり一定のコンセンサスはまだ得られていない。例えば、細胞周期によってミトコンドリアの形態が大きく変動し、G1/S期では fusion して管状に、M期では fission して顆粒状になるという報告もある^{88,89}。この解釈としては翻訳が行われるG1/S期にはエネルギーが大量に必要であることや、母細胞が二つの娘細胞に分裂するM期にスムーズにミトコンドリア分配が行われる必要があることが指摘できるが、代謝状態の変化が先か、ミトコンドリア形態変化が先か、という問題には答えられていない。上述した Pearce らの論文においては、effector T cell ではミトコンドリアが顆粒状、memory T cell においては管状であり、強制的に effector T cell のミトコンドリアを fusion させると細胞の OXPHOS 活性が上昇し、細胞自体も memory T cell 様の形質を示すようになることが明らかにされている⁸¹。このことから、ミトコンドリアダイナミクスは代謝状況の制御下ではなくむしろ主要代謝経路の選択や細胞の機能変化を引き起こす可能性があることが示唆されている。

EMT 過程におけるミトコンドリアダイナミクスと本研究の内容

EMT を経た細胞は高度な運動能を獲得する。細胞が運動するためには細胞骨格のリモデリングや細胞接着因子のリサイクリング、膜やタンパク質の輸送などにおいて多大なエネルギーを必要とする。そのエネルギーとは、ATP である。腫瘍細胞はワールブルグ効果としても知られるように解糖系が亢進しているとはいえ（異化代謝ではなくアミノ酸や核酸を生成するための同化代謝も担う）、エネルギー効率の高いミトコンドリア OXPHOS にもその ATP 産生を依存していることが知られている⁹²。ATP は高エネルギー物質であるため、必要となる場所に拡散によって運ばれるよりも、必要となる場所で産生するという「地産地消モデル」の方が効率の良いモデルであると考えられる。このことから、運動中の細胞においてはミトコンドリアが fission しているほうが有利であることが考えられる。実際、ヒト乳癌細胞株のうち浸潤能の高い MDA-MB-231 ではミトコンドリアが fission しており、浸潤能の低い MCF7 ではミトコンドリアが fusion していることが報告されている⁹³。しかしながら前述のとおり、ミトコンドリア fission させると OXPHOS 活性が低下する可能性がある。今回我々は EMT という現象に着目しながら、ミトコンドリア形態と機能と細胞機能との間にどのような関係性があるのかに興味を持ち解析を行った。本章で述べる内容は取り組み始めたばかりのテーマであり、データとして不十分な部分もあるが、これまで明らかになったことと今後の課題を交えて報告したい。

【材料と方法】

細胞培養

正常マウス乳腺上皮細胞株 NMuMG およびヒト肺腺癌細胞株 A549 を ATCC より入手し, *in vitro* 条件下での実験用細胞株として用いた. NMuMG は 10% FBS および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリンを添加した DMEM, A549 は 10% FBS 添加 DMEM にて 37°C, 5% CO₂ 条件下で維持した. NMuMG の継代に際し, 培地除去には 1% EDTA/PBS を使用し, 細胞剥離時には 0.25% トリプシン/1% EDTA/PBS を用いた. A549 の継代に際し, 培地除去には PBS を使用し, 細胞剥離時には 0.025% トリプシン/1% EDTA/PBS を使用した. いずれの細胞株においても, トリプシン活性の停止処理には FBS 添加培地を用いた.

抗体および試薬

Recombinant human TGF- β 1 は PeproTech より, Mdivi 1 はケイマンケミカルより購入した. 使用濃度はそれぞれ 5 ng/mL と 10 μM とした. Gemcitabine は Sigma-Aldrich より購入した. 購入元を明記していない試薬は全て Sigma-Aldrich もしくは和光純薬より購入した. 本章において使用した抗体を以下に列挙する.

抗 E-cadherin 抗体 (マウス, モノクローナル, BD bioscience)

抗 β -actin 抗体 (マウス, モノクローナル, EMD Millipore)

Peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体 (ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

抗 β -tubulin 抗体 (マウス, モノクローナル, Sigma-Aldrich)

Alexa488 標識抗 Tomm-20 抗体 (ウサギ, モノクローナル, abcam)

抗 ATP5A 抗体 (ウサギ, ポリクローナル, abcam)

Cy3 標識抗マウス IgG 抗体 (ロバ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ, Jackson ImmunoResearch Laboratories)

SDS-PAGE および WB

第一章と同様の方法を用いて SDS-PAGE および WB を行った.

蛍光顕微鏡観察

24-well ディッシュに $\phi 12$ mm のカバーガラスを敷き, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のコラーゲンでコートした (37°C, 2 h). 2×10^4 個の細胞を播き込み, 48 h の TGF- β と

Mdivi 1 処理を行い, 2% formaldehyde/完全培地で 37°C, 10 min 反応させたのち, メタノールを-20°C, 5 min 作用させて固定した. 0.1% Triton X-100/PBS で室温, 5 min 透過処理をし, 1% BSA/PBS で室温, 30 min ブロッキング後, 一次抗体液と反応させた (1% BSA/PBS, 1/500 β -tubulin, 1/1000 Tomm-20 もしくは 1/200 ATP5A, 室温, 1 h). ブロッキング液で洗浄したのち, 蛍光色素標識の二次抗体液に作用させ(いずれも 1/1000, 室温, 30 min, 遮光), TO-PRO-3 液 (Thermo Fisher Scientific) で核染色を行った後, マウント液 (ProLong® Diamond, Thermo Fisher Scientific) にて封入, 超解像顕微鏡 (Nikon, N-SIM) もしくは共焦点顕微鏡 (Nikon, A1R) により観察を行った. 北海道大学大学院医学研究科細胞生理学教室との共同研究として, 画像解析ソフト metamorph (molecular devices) によりミトコンドリア一つあたりの体積 (単位 voxel) を算出しバイオリンプロットによりグラフ化した.

トランスウェル運動能アッセイ

トランスウェルマイグレーションチャンバー (Polycarbonate membrane, 8 μ m pore, Corning) を用いて接着誘因性運動能アッセイを行った. アッセイに先立ち, 上部チャンバーの底面にコラーゲンコートをした (10 μ g/mL, 37°C, 2 h). 上部チャンバーに 1×10^4 個の細胞を 100 μ L の完全培地に懸濁しアプライした. 下部チャンバーには 600 μ L の完全培地をアプライした. 37°C, 3 h のインキュベーションののち, 4% PFA/PBS により固定, クリスタルバイオレット液により染色し遊走した細胞数を計測した. また, 一部サンプルを同様に固定後, 蛍光顕微鏡観察の項と同様の方法を用いて共焦点顕微鏡にて 3D 画像を取得した.

2D 運動能観察

平面上での細胞の運動と核, ミトコンドリアの位置関係を観察する為, 共焦点顕微鏡 (Nikon, A1R) によるライブイメージングを行った. コラーゲンコートした ϕ 35 mm のガラスボトムディッシュに 1×10^5 個の細胞を播き込み, TGF- β と Mdivi 1 の処理を 48 h 行い, 500 nM MitoTracker® Red (Thermo Fisher Scientific) と 1/1000 量の Hoechst® 33342 solution (同仁化学研究所) を加えて画像を取得した.

OXPHOS 測定

北海道大学大学院医学院循環病態内科学教室との共同研究として, OROBOROS 社の Oxygraph-2k を用い, 細胞の OXPHOS 活性を計測した. ϕ 6 cm ディッシュに 2×10^5 個の細胞を播き込み, 48 h の間 TGF- β と Mdivi 1 処理

を行った。それらの細胞をトリプシン処理によりディッシュから剥がし、500 μ L の MiR05 バッファーに懸濁し、細胞数を計測した。上記細胞懸濁液と 2.5 mL MiR05 バッファーを Oxygraph-2k のチャンバーにアプライし、Digitonin (終濃度 25 μ g/mL, Fluka) を添加し細胞膜を透過処理した。OXPHOS の基質として malate (2 mM, Sigma-Aldrich), L-glutamate (10 mM, Sigma-Aldrich), pyruvate (10 mM, Sigma-Aldrich), ADP (5 mM, Calbiochem), $MgCl_2$ (3 mM, Scharlau), succinate (10 mM, Sigma-Aldrich) を順次添加し、呼吸鎖複合体 I + II による OXPHOS 量を単位時間・細胞あたりの酸素消費量として測定した。測定中 cytochrome c (10 μ M, Sigma-Aldrich) を添加し、ミトコンドリア膜傷害の有無を評価し、酸素消費量が 10%以上上昇したサンプルは破棄した。使用したバッファーの組成を以下に記す。

MiR05 バッファー:

0.5 mM EGTA (Sigma-Aldrich), 3 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), 60 mM Lactobionic acid (Sigma-Aldrich), 20 mM Taurine (Sigma-Aldrich), 10 mM KH_2PO_4 (Merck), 20mM HEPES (Sigma-Aldrich), 110 mM Sucrose (Roth), BSA (Sigma-Aldrich) 1 g/L

薬剤感受性アッセイ

ϕ 6 cm ディッシュに 2×10^5 個の細胞を播き込み、48 h の間 TGF- β と Mdivi 1 処理を行った。それらの細胞を 96-well plate に 1.5×10^3 個ずつ播き込み、gemcitabine を 0.001-10 μ M の範囲で段階希釈し、72 h 作用させた。その後細胞生存性アッセイと同様の方法を用いて細胞生存性を計測し、グラフ化した。

マトリゲル インベージョンアッセイ

第一章と同様の方法で解析を行った。A549 細胞の浸潤活性測定に際して上部チャンバーには 1×10^5 個の細胞を 500 μ L の完全培地に懸濁しアプライした。使用する細胞は 11 h の間血清飢餓処理を行った。

統計解析

全ての統計解析は表計算ソフトの Excel (Microsoft) と統計ソフト R により行った。 $P < 0.05$ を有意差として考慮した。群間の比較には Welch *t*-test を施行した。

【実験結果】

3-1 EMT 誘導によるミトコンドリア体積の変化

ヒト肺腺癌細胞株 A549 とマウス乳腺上皮細胞株 NMuMG を用いて, TGF- β にて EMT を誘導した際のミトコンドリア動態を超解像顕微鏡 (Nikon, N-SIM) にて観察した. これらの細胞を実験に使用したのはどちらも比較的短時間 (48 h) で TGF- β により EMT が誘導される細胞として報告されているからである^{94,95}. 実際の超解像顕微鏡像を図 3-1-1 と図 3-1-2 に, 画像解析ソフト metamorph によりミトコンドリア一つあたりの体積 (単位 voxel) を算出しプロットしたグラフを図 3-1-3 に示す. A549, NMuMG の両細胞において EMT に伴いミトコンドリア一つあたりの体積が有意に減少していた. このデータは本章の研究において基盤となるデータなので, 今後の課題として解析法自体の評価や他の染色法を用いた場合との比較など, 多角的な検討を行っていく必要がある.

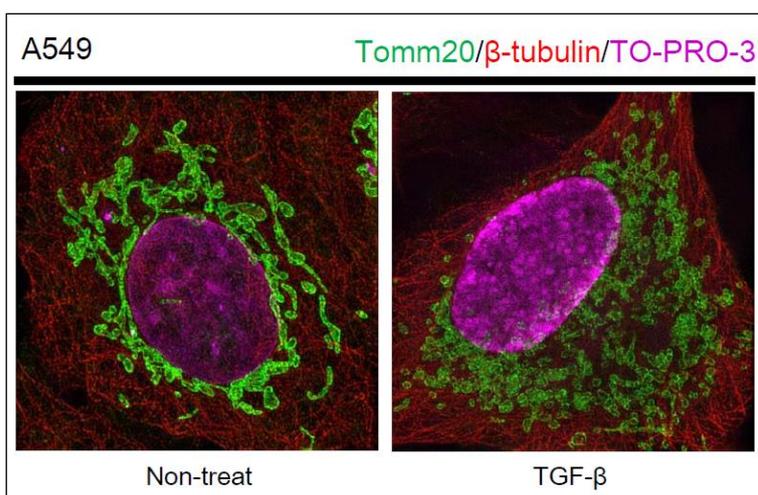


図 3-1-1 A549 細胞のミトコンドリア超解像像

A549 細胞において TGF- β 刺激 (48 h) によるミトコンドリア形態変化を超解像顕微鏡 (Nikon, N-SIM) によって観察した. 緑がミトコンドリア外膜に局在する Tomm20, 赤が微小管の構成タンパク質 β -tubulin, 紫が核を染める TO-PRO-3 である.

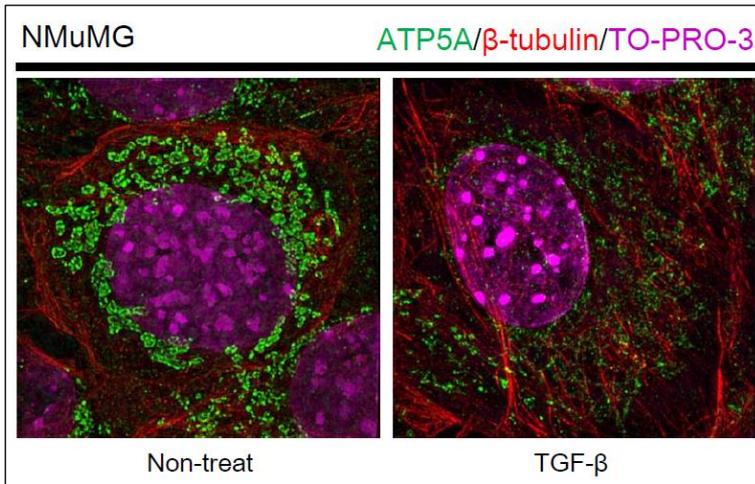


図 3-1-2 NMuMG 細胞のミトコンドリア超解像像

NMuMG 細胞において TGF- β 刺激 (48 h) によるミトコンドリア形態変化を超解像顕微鏡 (Nikon, N-SIM) によって観察した. 緑がミトコンドリア内膜に局在する ATP5A, 赤が微小管の構成タンパク質 β -tubulin, 紫が核を染める TO-PRO-3 である.

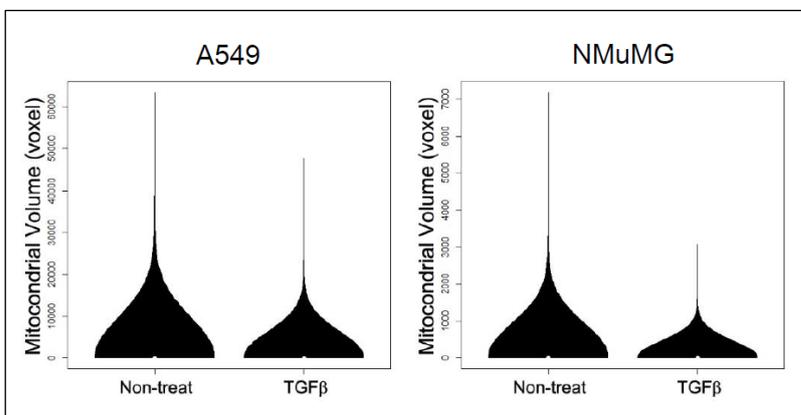


図 3-1-3 A549 細胞と NMuMG 細胞における EMT とミトコンドリア体積変化

共焦点顕微鏡により 3D 撮影した画像を画像解析ソフト *Metamorph* により解析し, ミトコンドリア一つあたりの体積を算出した. それぞれ 30 細胞以上を計測し, 体積の値をバイオリンプロットにより描出した. いずれの細胞株においても TGF- β 刺激によって有意に ($P < 0.05$) ミトコンドリア体積が減少していた.

3-2 A549 細胞における EMT の時間変化と OXPHOS 変化

次に, A549 細胞の EMT 過程における OXPHOS 変化を測定した. 図 3-2-1 に細胞形態の経時的变化を, 図 3-2-2 に各タイムコースにおける E-cadherin 発現量変化を, 図 3-2-3 に呼吸鎖 complex I+II の OXPHOS 能を示す. A549 細胞においては, E-cadherin の発現量低下と細胞形態変化を伴う EMT 過程において OXPHOS 能に変化は見られなかった.

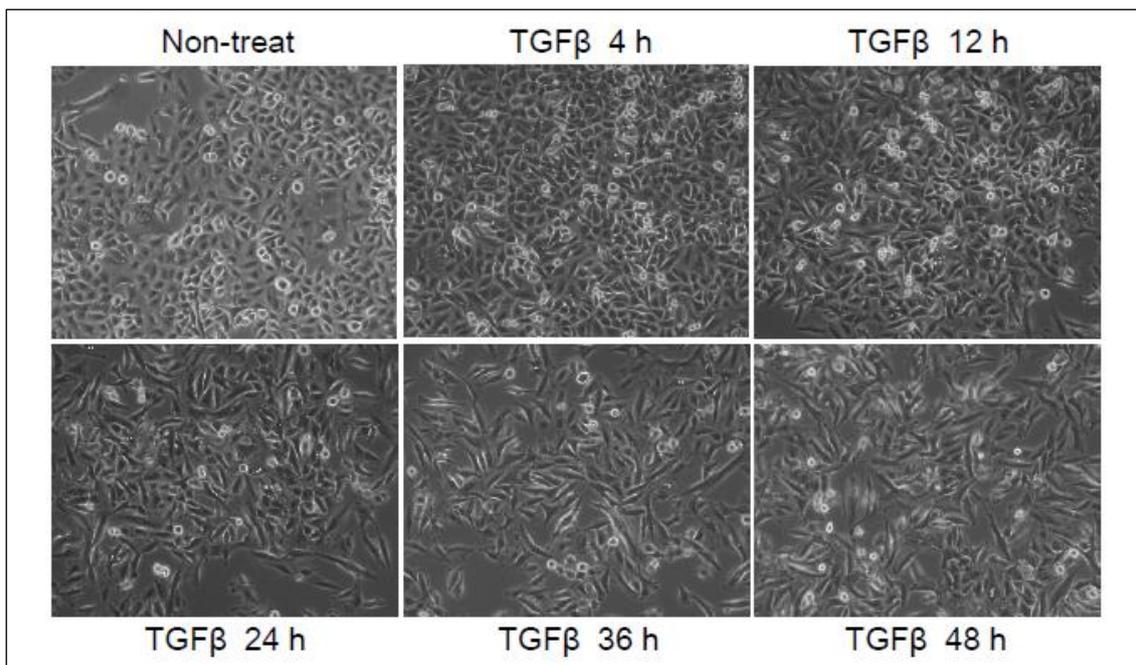


図 3-2-1 TGF- β による A549 細胞の形態変化の経時的観察

TGF- β 処理に伴う NMuMG 細胞の細胞形態変化を顕微鏡下に観察した. 処理後 12 h から 24 h ころに敷石状から紡錘形に変化している様子が観察された.

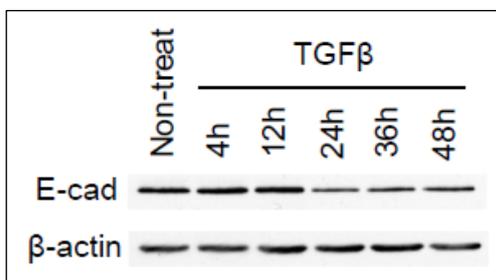


図 3-2-2 TGF- β による A549 細胞における E-cadherin 発現量の経時的变化

TGF- β 処理に伴う A549 細胞における E-cadherin 発現量を各段階のサンプルを用いた WB により経時的に捉えた.

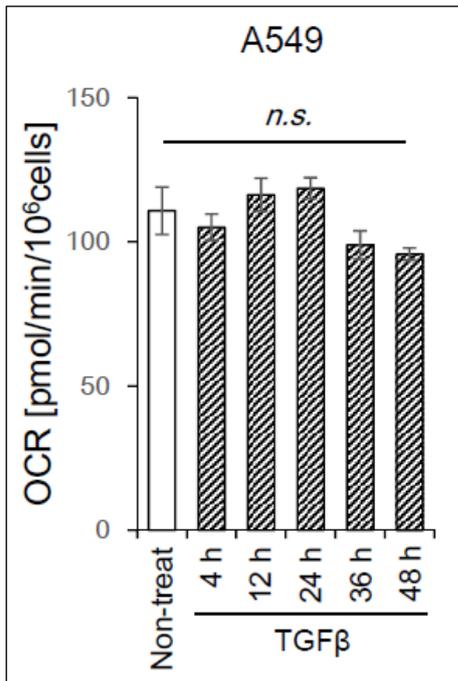


図 3-2-3 TGF- β による A549 細胞における OXPHOS の経時的変化

Oxygraph-2k (OROBOROS) によって A549 細胞における呼吸鎖複合体 I と II の総 OXPHOS 量を計測した。TGF- β 処理後 36 h で有意な上昇を確認した。群間比較には Welch *t*-test を施行した。*は $P < 0.05$ を, **は $P < 0.01$ を表す。

3-3 NMuMG 細胞における EMT の時間変化と OXPHOS 変化

前節と同様にして NMuMG 細胞における OXPHOS 変化を測定した. 図 3-3-1 に細胞形態の経時的变化を, 図 3-3-2 に各タイムコースにおける E-cadherin 発現量変化を, 図 3-3-3 に呼吸鎖 complex I+II の OXPHOS 能を示す. NMuMG 細胞においては EMT 過程において, TGF 刺激後 36 時間ほどで OXPHOS の上昇を示すことを見出した. なお, 細胞形態の EMT 様変化が OXPHOS 変化に先立つことも見出した.

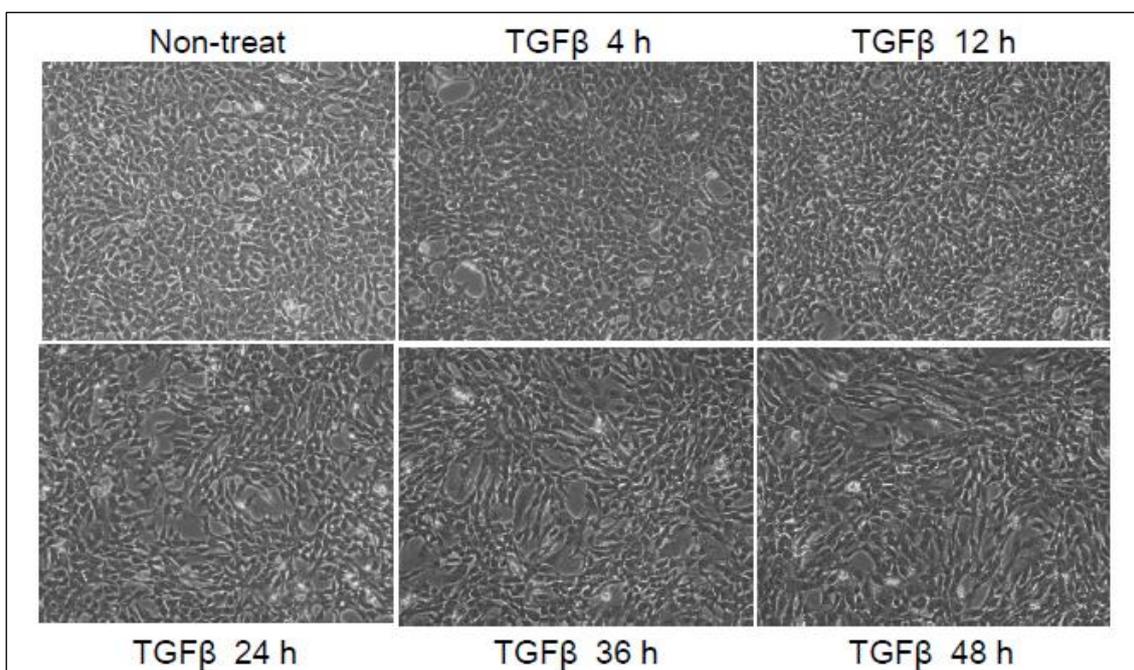


図 3-2-1 TGF- β による NMuMG 細胞の形態変化の経時的観察

TGF- β 処理に伴う NMuMG 細胞の細胞形態変化を顕微鏡下に観察した. 処理後 12 h から 24 h ころに敷石状から紡錘形に変化している様子が観察された.

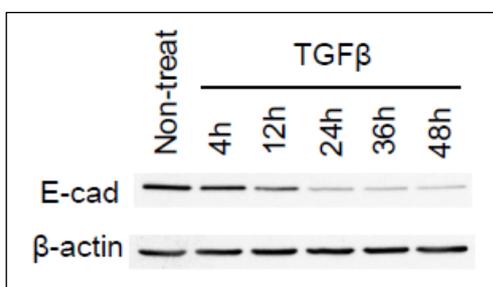


図 3-2-2 TGF- β による NMuMG 細胞における E-cadherin 発現量の経時的变化

TGF- β 処理に伴う NMuMG 細胞における E-cadherin 発現量を各段階のサンプルを用いた WB により経時的に捉えた.

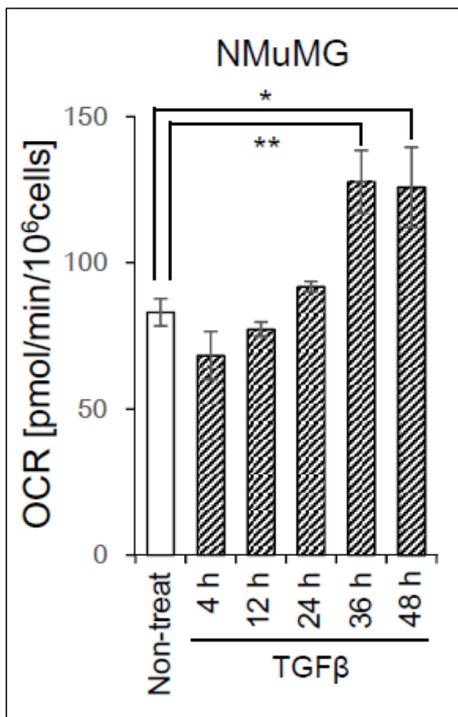


図 3-2-3 TGF- β による NMuMG 細胞における OXPHOS の経時的変化

Oxygraph-2k (OROBOROS) によって NMuMG 細胞における呼吸鎖複合体 I と II の総 OXPHOS 量を計測した。TGF- β 処理後 36 h で有意な上昇を確認した。群間比較には Welch *t*-test を施行した。*は $P < 0.05$ を, **は $P < 0.01$ を表す。

3-4 Mdivi 1 による細胞運動への影響

ミトコンドリアの fission 因子である Drp1 の選択的阻害剤 Mdivi 1⁹⁶ を用いて、細胞運動能への影響を調べた。図 3-4-1 に示すように A549 細胞においても NMuMG 細胞においても運動能が抑制される傾向を見出した。なお、NMuMG 細胞においては有意差を認めたが、A549 細胞においては実験間のばらつきが大きくなってしまったためか、傾向はみられるものの有意差は認められなかった。この時の生存性を図 3-4-2 に示す。

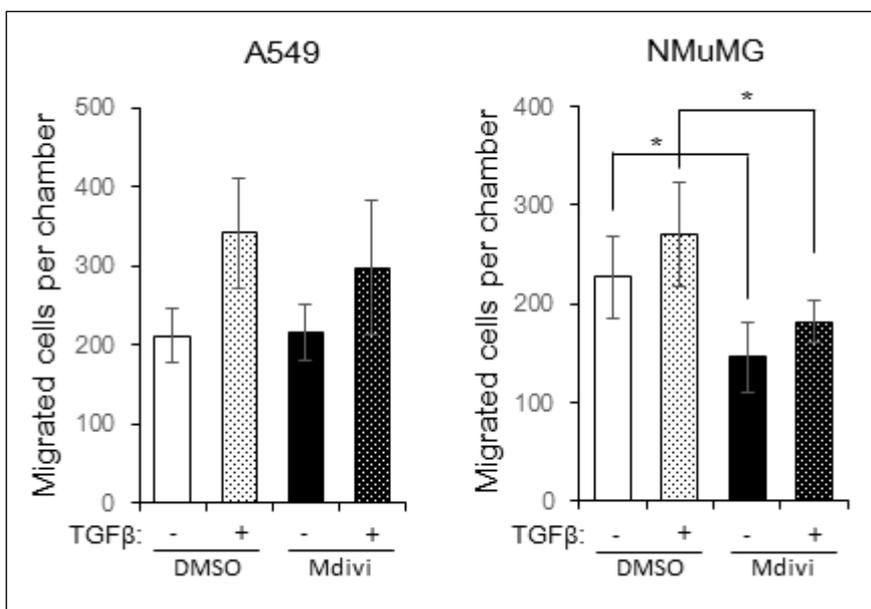


図 3-4-1 各細胞における $TGF-\beta$ と Mdivi 1 処理による運動能への影響

A549 細胞を用いて、 $TGF-\beta$ 刺激と Mdivi 1 処理によりミトコンドリア fission を阻害した際の運動能を測定した。トランスウェル運動能アッセイにより下部チャンバーに移動した細胞の数を計測し、その個数を図示した。群間比較には Welch t -test を施行した。*は $P < 0.05$ を示す。

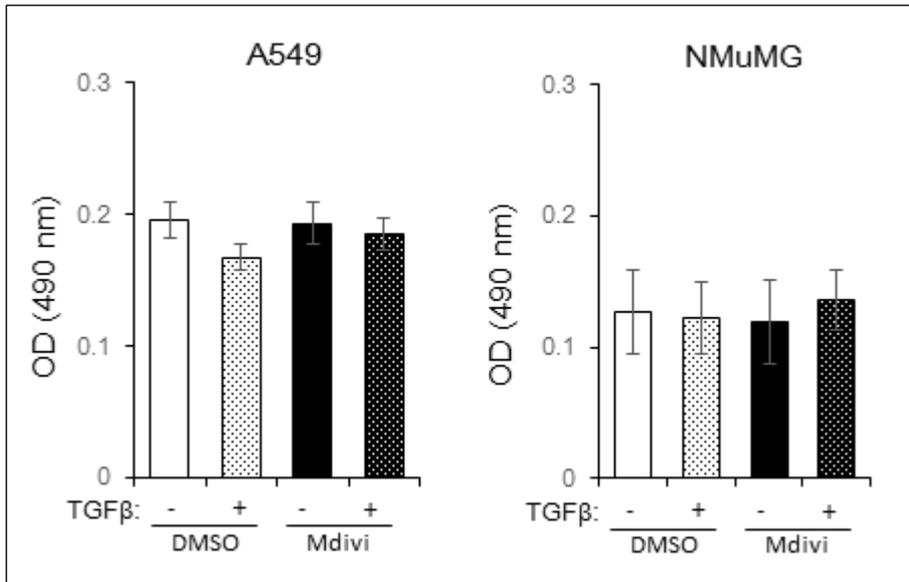


図 3-4-2 各細胞における $TGF-\beta$ と *Mdivi 1* 処理による細胞生存性への影響

細胞生存性アッセイによりインベーションアッセイに用いた細胞の *viability* を求めた。群間比較には *Welch t-test* を施行した。各群間に有意差は認めなかった。

3-5 Mdivi 1 による浸潤活性への影響

前節に関連し, A549 細胞において Mdivi 1 を用いた場合の浸潤活性への影響を調べた. 図 3-5-1 に示すように A549 細胞において, 細胞の浸潤能が有意に抑制されていた. なおこの時の OXPHOS 活性を図 3-5-2 に示す. Mdivi 1 処理群では TGF- β 処理時に OXPHOS が有意に低下しており, このことが浸潤活性に影響を与えている可能性がある.

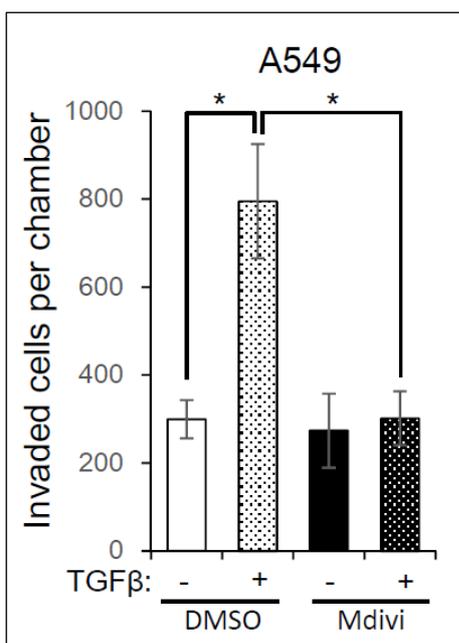


図 3-5-1 A549 細胞における TGF- β と Mdivi 1 処理による浸潤活性への影響

A549 細胞を用いて, TGF- β 刺激と Mdivi 1 処理によりミトコンドリア fission を阻害した際の浸潤活性を測定した. マトリゲルインベーションアッセイにより下部チャンバーに移動した細胞の数を計測し, その個数を図示した. 群間比較には Welch *t*-test を施行した. *は $P < 0.05$ を示す.

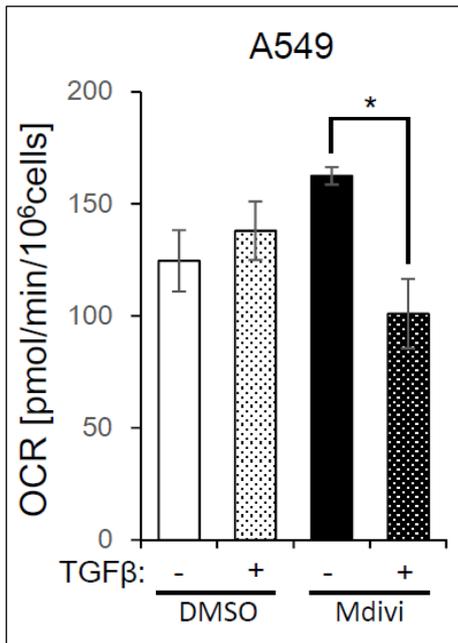


図 3-5-2 A549 細胞における $TGF-\beta$ と Mdivi 1 処理による OXPHOS の変化

Oxygraph-2k によって $TGF-\beta$ と Mdivi 1 で処理した際の A549 細胞における呼吸鎖複合体 I と II の総 OXPHOS 量を計測した。群間比較には Welch t -test を施行した。*は $P < 0.05$ を表す。

3-6 A549 細胞では EMT と Mdivi 1 処理で Gemcitabine 感受性は変化しない

細胞の悪性度進展においては運動・浸潤能に並んで、薬剤耐性の獲得も大きな特徴の一つである。EMTによりミトコンドリアが fission することにより獲得する性質の一つとして、薬剤耐性を考えた。ここでは特に、現在臨床においても広く利用されている gemcitabine への耐性が変化するか否かを検討した。96-well plate に TGF- β 刺激と Mdivi 1 処理を行った細胞を播き込み、段階希釈した gemcitabine をさらに 72 h 作用させ、細胞の生存性を計測した。図 3-6-1 に示す通り、各 gemcitabine 濃度において大きな差は認められず、Mdivi 1 処理の gemcitabine 耐性への寄与を見出すことができなかった。

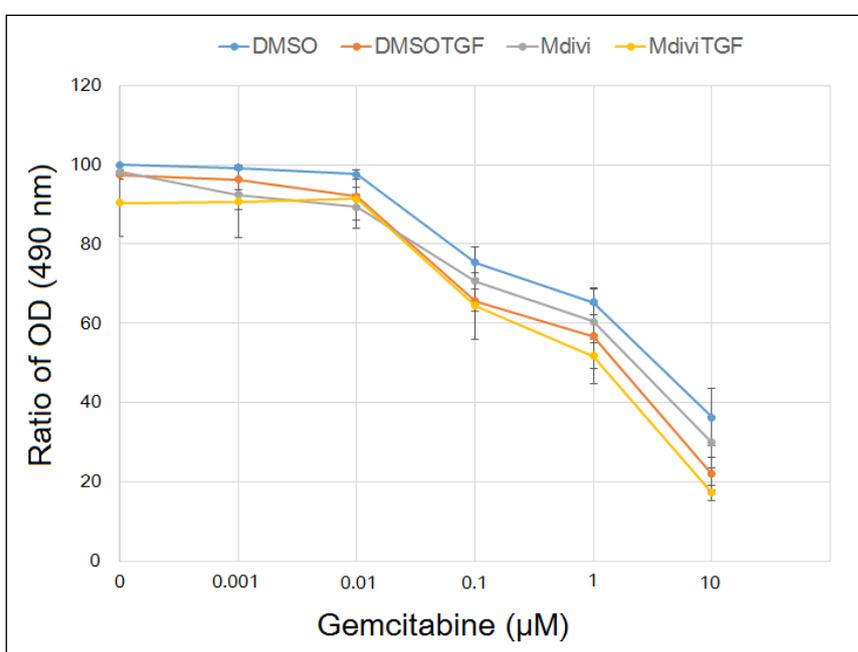


図 3-6-1 A549 細胞における TGF- β と Mdivi 1 処理による薬剤耐性への影響

A549 細胞を用いて、TGF- β 刺激と Mdivi 1 処理によりミトコンドリア fission を阻害した際の gemcitabine 耐性への影響を評価した。48 h の TGF- β 刺激と Mdivi 1 処理を行った細胞を 96-well plate に播き込み、さらに 72h 間 gemcitabine を作用させたのち、細胞生存性を計測した。

3-7 狭路通過時のミトコンドリア局在の変化

Mdivi 1 処理によって細胞の運動能と浸潤能に影響が見られたことから、トランスウェルチャンバーを通過する際のミトコンドリア形態を蛍光観察した。共焦点顕微鏡により、Z 軸スライス像を取得し、再構成した。その時の画像を模式図と共に図 3-7-1 に示す。TGF- β 単独処理ではチャンバーの pore を通過する際に一部のミトコンドリアが移動先端に局在し、その後ろに核、そして大部分のミトコンドリアという配置になっていた。一方 Mdivi 1 処理を加えた細胞では、全てのミトコンドリアが一端に集中している像が得られた。このことを説明する一つのモデルとして、細胞が狭路を通過する際に「アイドリング」状態になる必要があるのではないかと考えた。狭路を通過するというのは細胞の生存という観点からすれば大きなリスクを伴うものである。細胞が狭路を通過するか否かの判断を行うこと際には移動先端に一部のミトコンドリアを配置し、後端に残りのミトコンドリアを分布させることによって様々な細胞周囲環境に即座に対応できるような仕組みを有しているのではないかと推察される。TGF- β 刺激により高い運動性を獲得した細胞の多くがこのような「アイドリング」状態となり、何らかの誘因刺激に応じて通過の判断を下すと考えられる。一方で Mdivi 1 処理によりミトコンドリアを分散配置しにくい状態に持ち込むと、もちろんながら狭路を通過してくる細胞も一定数は確認されるが、そこまでの刺激の閾値が非常に高くなってしまい、ほとんどの細胞が狭路通過を「否」としている状況が考えられる。このモデルはさらなる実験を加えて今後検証していきたい。

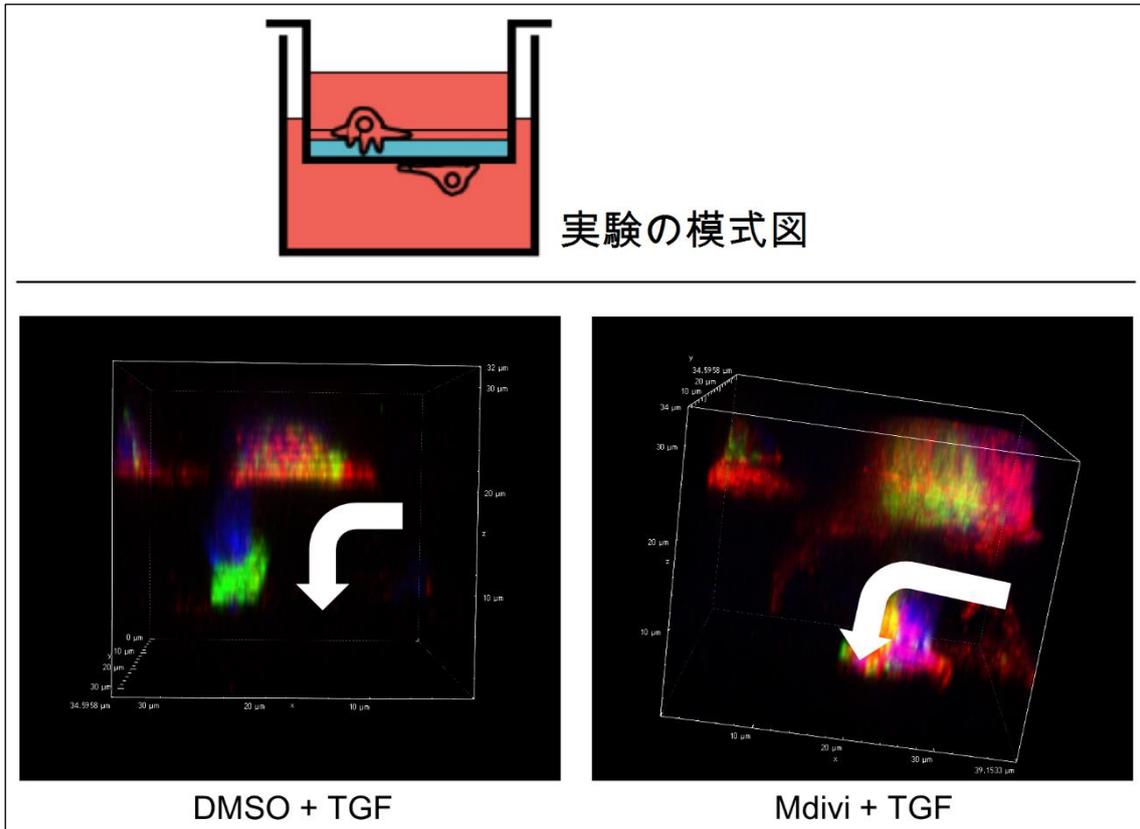


図 3-7-1 狭路通過時のミトコンドリア局在

トランスウェル運動能アッセイにおいて細胞が *pore* を通過している様子を蛍光観察した。緑がミトコンドリア外膜に局在する *Tomm20*, 赤が微小管の構成タンパク質 β -*tubulin*, 青が核を染める *DAPI* である。実験の模式図のような状態で、白矢印の左上に沿うように一つの細胞が存在している。*Mdivi 1* 処理をしない細胞では核が通り抜ける前の段階で細胞質と共にミトコンドリアが *pore* に入り込んでいる。*Mdivi 1* 処理をした細胞ではミトコンドリアの大部分がチャンパー上面に残り、微小管を含む細胞質のみが *pore* を通過しようとしている。

3-8 平面移動時のミトコンドリア局在

3-7で述べたモデルの裏付けとして、狭路以外の平面移動時のミトコンドリア局在が Mdivi 1 処理により変化するかを検討するため、共焦点顕微鏡によるライブイメージングを行った。ミトコンドリアを MitoTracker® Red, 核を Hoechst® 33342 にて染色し、画像取得を行った。クロップした画像を図 3-8-1 に示す。Mdivi 1 処理によってミトコンドリア fission が阻害されているかの確認も兼ねた（条件検討時に目視で確認したデータを残していなかったため今後は 3-1 節で述べた方法を用いて詳細かつ厳密に検討していく必要がある）。画像が荒いが、Mdivi 1 により EMT を起こした際のミトコンドリア fission が軽度抑制されている。核や細胞質との位置関係については、3-7 で述べたような差異は確認できなかった。

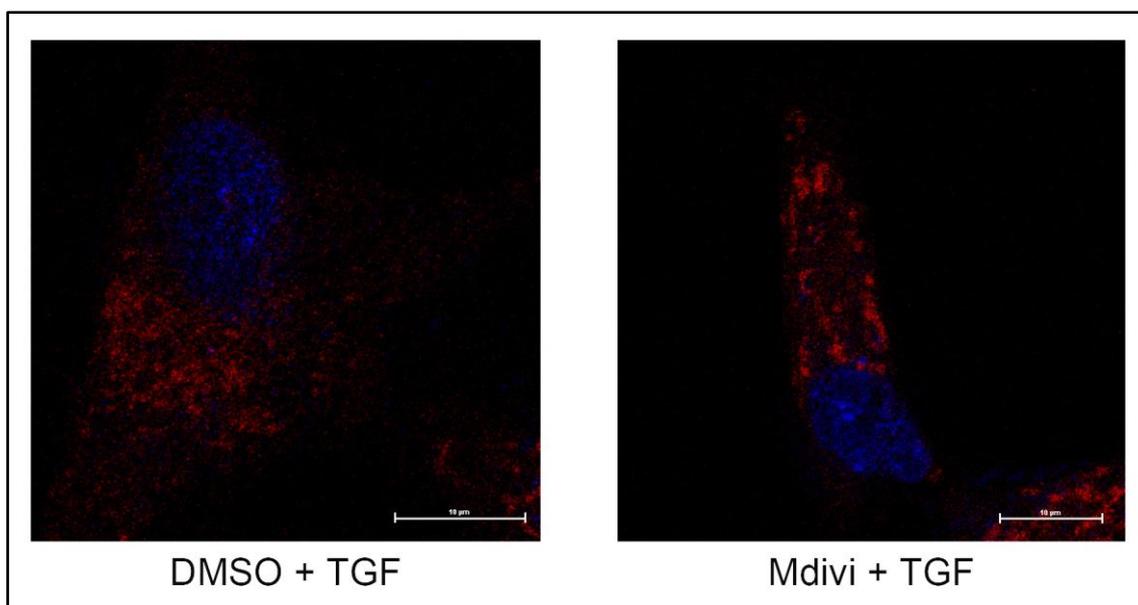


図 3-8-1 ミトコンドリア染色と核染色による A549 細胞の蛍光顕微鏡観察

ガラスボトムディッシュに標記の通り TGF- β と Mdivi 1 にて処理した A549 細胞を播き込み、ミトコンドリアを MitoTracker® Red, 核を Hoechst® 33342 にて染色し共焦点顕微鏡により画像取得を行った。タイムラプス撮影を行い、運動中の一細胞をクロップした。スケールバーは 10 μ m を示す。

【考察】

本研究によって、TGF- β 誘導性に起こる EMT において、ミトコンドリアが fission することを見出した。また、まだまだ検討段階ではあるが、このミトコンドリア fission は OXPHOS 活性変化を必ずしも伴わないこと、このミトコンドリア fission の細胞生物学的意義は細胞が狭路を通過する際に現れる可能性を見出した。今後は 3-7 節で述べた「アイドリング」状態説の検討を中心に実験を進めていく予定である。具体的には狭路通過時のミトコンドリア動態に関して、トランスウェルマイグレーションチャンバーによる観察のみならず、理化学研究所 QBiC (quantitative biology center, 生命システム研究センター) チームリーダー兼東京大学大学院理学系研究科物理学専攻教授の岡田康志先生の御協力のもと、PDMS (Polydimethylsiloxane) デバイスを用いた実験を計画中である。まとまったミトコンドリアが狭路通過時に高い圧力を伴って核周囲に局在することが ROS 産生や、ひいては DNA 障害に寄与するかどうか興味深いポイントとなる。

今回の実験では Mdivi によって A549 細胞の浸潤能と、同時に OXPHOS 能が低下していることを見出した。まずは、例えば Rotenone などの OXPHOS 阻害剤によって細胞浸潤能が阻害されるかを検討し、これらの上下関係を確定させていきたい。また、3-2, 3-3 節に関連して、ミトコンドリア形態変化のタイムコースもさらに詳細に検討する必要がある。細胞の機能、細胞の形態、ミトコンドリアの機能、ミトコンドリアの形態がどのようなタイムコースで、どのような連関をもって EMT を経るうちに起こってくるのかを詳細に確定することが出来れば、新規性の高い研究となる。

Mdivi 1 はミトコンドリア fission 因子である Drp1 選択的阻害剤として広く研究に使用されている薬剤であるが、もちろん副作用的な効果が否定できないので、Drp1 をノックダウンした A549 細胞と NMuMG 細胞を樹立したいと考えている。ミトコンドリア動態は細胞の生存に直結する現象なので、必要な時に、しかしながら高効率でノックダウンができるよう、Doxycycline 誘導性に miRNA を発現する系を構築しようとしていたが、Doxycycline 処理によりミトコンドリアの形態や OXPHOS に影響が出てしまい、より良い系を模索している段階である。

EMT を引き起こす過程についても検討の余地がある。TGF- β 誘導性でない、たとえば遺伝子導入等による EMT においても同様の知見が得られるかを検討する必要がある。

また、この TGF- β 刺激によるミトコンドリア fission に Arf6 経路が関与するかを検討することが喫緊の重要課題である。

第四章

希少かつ再現困難な事象に対する新規解析理論の必要性について

【諸言】

本章は、大学院在学中に、医学に携わる者として前提となるであろう、科学全般および哲学や宗教に関する書籍を読み、自分自身で思考したことについてまとめたものである。本章で議論する内容について具体的な実験は試行していないが、今後の自分の研究、ひいては新たな医学研究を推し進めるうえで重要な視点の一つを指摘できるものと信じ、学位論文として纏めることとした。本章を考えるうえで重要なコンセプトは「がんにおける劇的寛解例」の存在である。あらゆる治療において、統計学的な治療効果をはるかに凌ぐ病状改善が起こる事例が報告されている。このような例は希少かつ再現困難であり、現代の生命科学による取り扱いが非常に難しいものであることは想像に難くない。というのも、現代の生命科学というのは古典統計学を、その客観性のよりどころとしており、希少かつ再現困難な劇的寛解例はいわゆる「ノイズ=外れ値」として扱われることになるからである。しかしながら、往々にして科学の大きな発見というのは、これまでの科学的手法では捉えることの出来なかった領域にこそ隠れているものである。

【考察】

4-1 臨床医学研究における希少かつ再現困難な事象

臨床医学、特に癌治療においては、予想される治療効果をはるかに超える病状改善を示す、いわゆる劇的寛解例が存在する。こうした例は、「〇〇が奏功した例」というようにケースレポートとして報告されるのが普通であるが、大規模な臨床研究においてはノイズとしてとらえられることも多く、統計的解析が非常に困難であるといえる。同様のことはマウス等のモデル生物を用いた動物実験などでも当然みられるもので、本学位申請論文の第二章で解析した MMTV-PyMT マウスの例 (図 2-8-4) においても、例え遺伝的なバックグラウンドにほとんど違いのない同系列マウスであっても、個体によって肺転移の数に大きな差が出てくることが読み取れる。こうした「個体差」を科学的に排除するために、これまでの生命科学においては症例数や実験数を増やして統計処理を行うわけであるが、「オーダーメイド治療」を志向するこれからの癌治療においては、このような微細な部分にこそ着目して解析を進めていく必要があるだろう。もちろん癌以外の疾患を対象とする医療においても、同様の求めを受ける時代がすぐにはやってくるはずである。

一方、このようなヒトやマウスの「一個体レベル」の解析においては、大きな問題が存在する。これまでの生命科学では、培養細胞であれば継代数や実験条件を整えること、マウスであれば系を統一すること、ヒトにおいては年齢や性別、疾患の性質などを揃えることによって、その解析を行う群を均一とみなして解析を行ってきた。しかしながら上のような一個体レベルの解析、特に微細な差異を検討しようとする場合においては、これら標本同士を「均一」とみなすことは、明確に無理のある仮定である。ここに科学的思考の根幹をなす「再現可能性」の検証が不可能であるという大きな壁が現れるだろうと考える。

4-2 生命科学研究における希少かつ再現困難な事象

近年の基礎研究において、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析をはじめ、いわゆるオーム解析といわれる分野の技術発展が目覚ましい。ヒストンやDNAの化学修飾状況を全ゲノム的に行うエピゲノム解析や、細胞が発現している全タンパク質の種類と発現量を解析するプロテオーム解析、細胞の代謝状態経路の中間生成物等を全解析し代謝状態を明らかにするメタボローム解析などである。これらの解析技術は今後、解析の速さと簡便さ、解析価格の低さ、使用する試料の少なさといった方向に改良が行われることであろう。将来的には一つの細胞のゲノム・プロテオーム・メタボロームといった全生体情報が簡単に解析できる時代が来るかもしれない。そうした場合に立ち現われて来るのが、4-1節で述べた「一個体レベル」の解析とまったく同様の問題である。いずれの場合においても、希少かつ再現困難な事象を客観的に議論できる論理体系の確立が喫緊の課題であると考ええる。

4-3 生命科学以外の自然科学の場合

生命科学以外の自然科学においては、希少かつ再現困難な事象はどのように捉えられ、どのように議論されるのだろうか。ここでは地学と物理学について見ていきたい。地学の研究分野は地球規模の事物を対象としており、時間経過も数万年単位と、事実上再現困難な場合がほとんどである。さらに、研究対象とするのは宇宙や地球が誕生してから数回しか起こっていないような稀な現象であることが多い。同様のことは物理学の世界でも言え、例えば重力波の観測などのようにたった一度の極微量な変化の観測であっても意味のあるものとして捉えられることがある。生命科学や医学とは違い、こういった分野においては何度も *in vitro* の実験を繰り返す、ということは不可能である。では、どのように客観性が担保されるのか。物理学においては、これまでに観測された事実を数式化し、数学的に正しい理論を導き、その理論に当てはまる観測可能な事象を観測することによって議論を進めていく。こうすることで人為的に再現不可

能な事象に対しても議論を拡張することが出来る。また地学においてはある客観的事実に基づいた推論を行い、その状況証拠や近似的事実との比較によって議論を展開する。こちらの場合も再現困難な事象を取り扱いやすい学問形態であるといえる。しかしこれらの学問体系に則った議論が真理に近い「正しさ」を有するかは検証不可能のままである。

4-4 数学の場合

次に数学の場合を考える。数学は日本ではいわゆる理系として自然科学の一分野として捉えられがちだが、実際には論理学と一体となった学問体系であり、伝統的には哲学の一分野である。物理学の視点から考えれば、数学は自然現象を記述するための言語となる。また、さらに複雑な自然科学分野全般が物理現象として集約されると考えれば、数学は自然科学に含まれるというよりもむしろ自然科学が数学的記述によって成り立っているのである。数学的な正しさは、ある定義の中で語られることが特徴的である。絶対的に正しい（と定義した）少数の事柄を起点にして、言い換え（等式）を用いてその世界を拡張する。するとその世界の中で語ることの出来た部分は、(少なくともその定義の中では) 絶対的に正しいのである。しかしながら、最初の定義が正しいかどうかについては数学的な正しさの範疇では議論できない。結局その数学的に構築された論理が真理に近い「正しさ」を持つかどうかは数学以外の分野に任されてしまう。

4-5 人文科学や社会科学の場合

人文科学や社会科学の場合は文献的な調査により意見の正しさを判断することが多い。検証の難しい問題に対しても推論を導くことが多いこの分野では、主張の論理的な整合性が重視される。また、一つの意見であっても多くの人々が納得すればそれが有力な「仮説」として信用される可能性もある。もちろん経済学や心理学などでは数学的な証明や実験を施行することもあり、多岐にわたる。人文科学や社会科学における「正しさ」の認識はまだ個人的に勉強不足で理解しきれていないことも多いが、客観的な意見に対し多くの人々が主観的に正しいと思えるかに集約されるのではないかと考えている。

4-6 科学的な正しさとは何か

これまで見てきたように、その対象の性質によって検証の仕方や学問的な「正しさ」という概念は大きく変わってくる。科学的な正しさとは何を意味するのか。「客観的に正しい」という言葉をよく耳にするが、結局正しいかどうかを判断するのは各人の主観である。科学の営みはその手助けをしているに過ぎない。とはいえ、有史以来の人類の創造物がもつ説得力は大きく、少なくとも現代にお

いては科学的に正しいと検証されたものは多くの人々が正しいと受け入れられ、その結果として客観的な正しさを有することとなる。我々研究者はこのことを真摯に受け止め、これまで科学体系を築き上げてきた先人たちへの敬意と、現段階の科学では立ち向かえないものへの興味を持ち続ける必要がある。

4-7 これからの研究方針

ここまで現在の生命科学における検証方法とその限界、そして様々な分野における「正しさ」について振り返ってきた。方法論としては比較的新しい物理学や生命科学の検証方法においてもまだ扱うことの出来ない問題があることは間違いない。いずれにしても、物事の正しさを判断はつまるところ主観に頼らざるを得ないという事実は指摘しておかなければならない。ここに大きなヒントが隠されているように思う。また、この観点からすると宗教における真理探究というのも科学と同じような性質を持つものと考えられる。古来、不思議なもの、経験的に説明不能なものは宗教的な観点から説明が試みられていた。超自然的な存在というものが多くの人を納得させることに大きな影響力を与えてきた。また例えば仏教においては厳しい修行の間に、時間という概念について思索を深めるなど、答えの出ない問いを考え続けるということも行ってきた。宗教の手法として強力なのは主観的な体験をそのまま主観として他人に伝えることが出来る点にある。現代においては、科学と宗教は対立概念として捉えられることも多いが、今後はこれらを融合するような研究が新たな局面を切り拓くのではないかと考えている。黎明期の科学は、全く未知の現象を、数少ない客観的観測事実によって説明づける試みであった。例えば、当時魔力とされていた万有引力や電磁気力などの遠隔力の存在を説明するなどどれほどの困難があったかは想像すら難しい。現代においては、西洋科学的な、分析的思考によりほとんどの現象に説明がつけられるようになってきたが、その反面全く未知の現象に科学が立ち向かうことも無くなってきたように思う。各学問領域が、それぞれの知識体系の内側だけを向いているように思う。今こそ、科学の方向性を捉えなおす時期に来ているのではないか。そのため、生命科学に携わる者として、本章の題に挙げた問題提起をしたい。希少かつ再現困難な事象に対する解析理論を構築することによって、上に述べたような事例のみならず、科学と宗教の間、また西洋思想と東洋思想の間にまたがるような問題に取り組むことが出来るのではないかと直感している。とはいえ具体的なアイデアはまだほとんどないので、時間をかけて広い視野を持って取り組んでいきたい。

総括および結論

本研究において以下の知見が得られた。

- ・頭頸部扁平上皮癌において EPB41L5 の高発現は予後不良と有意に相関する
- ・EPB41L5 は頭頸部扁平上皮癌細胞の浸潤能に寄与する
- ・EPB41L5 は頭頸部扁平上皮癌細胞の治療抵抗性に部分的に寄与する
- ・EPB41L5 高発現を引き起こす条件は組織系により異なる可能性がある
- ・MMTV-PyMT マウスの腫瘍はその悪性度進展に Arf6 経路を利用する
- ・MMTV-PyMT マウスの腫瘍における AMAP1 高発現は転写レベルから起こる
- ・AMAP1 は MMTV-PyMT マウス由来腫瘍細胞の浸潤能に寄与する
- ・AMAP1 は MMTV-PyMT マウス由来腫瘍細胞の運動能に寄与する
- ・AMAP1 は MMTV-PyMT マウス由来腫瘍細胞の MMP 活性に寄与しない
- ・スタチンは MMTV-PyMT マウス由来腫瘍細胞の浸潤能を抑制する
- ・スタチンは MMTV-PyMT マウスの腫瘍の転移巣形成能を抑制する
- ・EMT 過程においてミトコンドリアが fission する
- ・EMT におけるミトコンドリア fission を阻害すると細胞浸潤能が抑制される
- ・EMT におけるミトコンドリア fission を阻害すると細胞運動能が抑制される
- ・ミトコンドリア fission は狭路通過に有利な形質を細胞に与える可能性がある
- ・今後の医学研究には希少かつ再現困難な事象に対する新規解析理論の構築が必要である

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。また Arf6 経路が活性化する 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。

最後に総括として、自分自身の成長という観点から本研究の意義を捉え返してみたいと思う。本研究の章立ては時系列順に取り組んだ課題を並べている。第一章については先任の大学院生が見出した臨床データに分子生物学的な実験データを添えることにより、メカニズムの一端を説明した。道筋の見た実験を行うことによって実験手技の向上と文章として纏める技術の習得に努めた。第二章においては解くべきテーマを与えられ、その中でどのような実験を進め、どのように解決し理論立てていくのかという実践的な研究の進め方を習得した。

多くの部分で先生方からのアドバイスを頂いた。第三章においては最初のきっかけから取るべき実験手法の詳細，進めていくスピードまですべて自分で主体的に決定し取り組んだ。研究者として最も求められる能力の一つ「何に興味をもつか」という点，すなわち問題提起の部分を主に考えるきっかけとなった。第四章はそういった基礎研究を進めていく中で，現在の方法論ではどうしても扱えないような問題をどのように解決していくべきか考え続けた結果であり，これからの自分が最も取り組んでいきたい課題である。博士課程を通して，このような具体的かつ生涯をかけて取り組みたいテーマを得られたのは素晴らしいことであると実感している。

謝辞

まず本研究を遂行するにあたり、多大なるご理解とご支援を賜りました、北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室 佐邊壽孝教授に深謝申し上げます。また、終始適切なご指導ならびにご討論を頂きました北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室 及川司講師に深く感謝いたします。

本論文を審査していただきました、北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野 近藤亨教授、北海道大学大学院医学研究院免疫学教室 小林弘一教授、北海道大学大学院医学研究院解剖発生学教室 渡邊雅彦教授、北海道大学遺伝子病制御研究所癌生物分 野口昌幸教授に深く感謝いたします。

共同研究者として、多方面からご協力賜りました北海道大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室 福田諭名誉教授、北海道大学病院病理部 松野吉宏教授、北海道大学大学院医学研究院組織細胞学教室 岩永敏彦教授、北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 絹川真太郎講師、細胞生理学教室 大場雄介教授に深謝申し上げます。

実験に際して、分子生物学教室在籍中に適切かつ詳細なご指導を頂きました現大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫機能統御学 橋本茂准教授、北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室 橋本あり助教、ならびに小野寺康仁講師、北海道大学国際連携研究教育局 南璣叟講師、現市立札幌病院 佐藤宏紀副医長、現網走厚生病院 吉河歩医師、現北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室 杉野弘和助教、また他分野でありながら快くご指導いただきました北海道大学病院臨床研究開発センター 畑中佳奈子特任講師、北海道大学病院病理部 畑中豊特任講師、北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 高田真吾博士ならびに角谷尚哉さん、北海道大学大学院医学研究院細胞生理学教室 藤岡容一朗助教、そしてこれまで関わっていただいた全ての先生方に深く感謝いたします。

心地よい実験環境づくりにご尽力いただいた北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室 林悦子秘書、芳野日南子研究員、加戸由香里研究員に感謝申し上げます。多くの時間を共にした北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室の半田悠君、福永清君、山本博紀君、篠裕輝君、黒澤卓君並びに関わっていただいた全ての学生さんに感謝いたします。

最後に、研究生活を続ける上での精神的なサポートをしていただいた北海道大学化石・鉱物サークル シュマの会のメンバーと、良き人生を支え続けて頂いている両親はじめ親族、そして長谷部葉子さんに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1 厚生労働省 . 平成 28 年人口動態調査 , <<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1a.html>> (2016).
- 2 Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65, 87-108 (2015).
- 3 日本臨床腫瘍学会. 新臨床腫瘍学 改訂第4版, 南江堂, 東京, 2015.
- 4 Weinberg, R. A. *The biology of CANCER Second edition*, Garland Science, New York, 2014.
- 5 Husemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmuller, G. & Klein, C. A. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58-68 (2008).
- 6 Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* 166, 21-45 (2016).
- 7 Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. & Weinberg, R. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715 (2008).
- 8 Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V. & Gao, D. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472-476 (2015).
- 9 Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C. C., LeBleu, V. S. & Kalluri, R. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525-530 (2015).
- 10 Condeelis, J. & Segall, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer* 3, 921-930 (2003).
- 11 Wittinghofer, A. *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms*, Springer, Wien, 2014.
- 12 Simanshu, D. K., Nissley, D. V. & McCormick, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 170, 17-33 (2017).

- 13 Hodge, R. G. & Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 496-510 (2016).
- 14 Dasso, M. Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell* 104, 321-324 (2001).
- 15 Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513-525 (2009).
- 16 Donaldson, J. G. & Jackson, C. L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 362-375 (2011).
- 17 Gaschet, J. & Hsu, V. W. Distribution of ARF6 between membrane and cytosol is regulated by its GTPase cycle. *J. Biol. Chem.* 274, 20040-20045 (1999).
- 18 Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L. & Der, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* 10, 842-857 (2010).
- 19 Uhlén, M. *The Human Protein Atlas version17*, <<https://www.proteinatlas.org/>> (2017).
- 20 Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Ponten, F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419 (2015).
- 21 Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjostedt, E., Fagerberg, L., Bidkhor, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnstrom, H., Glimelius, B., Sjoblom, T., Edqvist, P. H., Djureinovic, D., Micke, P., Lindskog, C., Mardinoglu, A. & Ponten, F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 357 (2017).
- 22 Thul, P. J., Akesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Bjork, L., Breckels, L. M., Backstrom, A., Danielsson, F., Fagerberg, L., Fall, J., Gatto, L., Gnann, C., Hober, S., Hjelmare, M., Johansson, F., Lee, S., Lindskog, C., Mulder, J., Mulvey,

- C. M., Nilsson, P., Oksvold, P., Rockberg, J., Schutten, R., Schwenk, J. M., Sivertsson, A., Sjostedt, E., Skogs, M., Stadler, C., Sullivan, D. P., Tegel, H., Winsnes, C., Zhang, C., Zwahlen, M., Mardinoglu, A., Ponten, F., von Feilitzen, K., Lilley, K. S., Uhlen, M. & Lundberg, E. A subcellular map of the human proteome. *Science* 356 (2017).
- 23 Cox, R., Mason-Gamer, R. J., Jackson, C. L. & Segev, N. Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers. *Mol. Biol. Cell* 15, 1487-1505 (2004).
- 24 Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., Mazaki, Y., Kodama, H., Nio, Y., Manabe, T., Wada, H., Kobayashi, H. & Sabe, H. GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat. Cell Biol.* 10, 85-92 (2008).
- 25 Hashimoto, A., Oikawa, T., Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Otsuka, Y., Handa, H., Onodera, Y., Nam, J. M., Oneyama, C., Okada, M., Fukuda, M. & Sabe, H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* 213, 81-95 (2016).
- 26 国立研究開発法人産業技術総合研究所. *G-compass*, <<http://www.h-invitational.jp/g-compass/>> (2010).
- 27 Fujii, Y., Itoh, T., Sakate, R., Koyanagi, K. O., Matsuya, A., Habara, T., Yamaguchi, K., Kaneko, Y., Gojobori, T. & Imanishi, T. A web tool for comparative genomics: G-compass. *Gene* 364, 45-52 (2005).
- 28 Kawahara, Y., Sakate, R., Matsuya, A., Murakami, K., Sato, Y., Zhang, H., Gojobori, T., Itoh, T. & Imanishi, T. G-compass: a web-based comparative genome browser between human and other vertebrate genomes. *Bioinformatics* 25, 3321-3322 (2009).
- 29 Weizmann Institute of Science. *GeneCards*, <<http://www.genecards.org/>> (2017).
- 30 Brown, M. T., Andrade, J., Radhakrishna, H., Donaldson, J. G., Cooper, J. A. & Randazzo, P. A. ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7038-7051 (1998).
- 31 Takeuchi, K., Kawashima, A., Nagafuchi, A. & Tsukita, S. Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 7), 1921-1928 (1994).

- 32 Hirano, M., Hashimoto, S., Yonemura, S., Sabe, H. & Aizawa, S. EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 182, 1217-1230 (2008).
- 33 Sun, C. X., Robb, V. A. & Gutmann, D. H. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J. Cell Sci.* 115, 3991-4000 (2002).
- 34 Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., McGlade, C. J. & Tepass, U. The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev. Cell* 11, 363-374 (2006).
- 35 Jensen, A. M. & Westerfield, M. Zebrafish mosaic eyes is a novel FERM protein required for retinal lamination and retinal pigmented epithelial tight junction formation. *Curr. Biol.* 14, 711-717 (2004).
- 36 Hsu, Y. C., Willoughby, J. J., Christensen, A. K. & Jensen, A. M. Mosaic Eyes is a novel component of the Crumbs complex and negatively regulates photoreceptor apical size. *Development* 133, 4849-4859 (2006).
- 37 Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Kojima, C., Yamamoto, H., Tsutsumi, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Yagi, R. & Sabe, H. A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *J. Biol. Chem.* 279, 37677-37684 (2004).
- 38 Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A. & Sabe, H. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6647-6652 (2004).
- 39 Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Morishige, M., Mazaki, Y., Yamada, A., Ogawa, E., Adachi, M., Sakurai, T., Manabe, T., Wada, H., Matsuura, N. & Sabe, H. Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J.* 24, 963-973 (2005).
- 40 Hashimoto, S., Hirose, M., Hashimoto, A., Morishige, M., Yamada, A., Hosaka, H., Akagi, K., Ogawa, E., Oneyama, C., Agatsuma, T., Okada, M., Kobayashi, H., Wada, H., Nakano, H., Ikegami, T., Nakagawa, A. & Sabe, H. Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7036-7041

- (2006).
- 41 Miyata, M., Raven, J. F., Baltzis, D., Koromilas, A. E. & Sabe, H. IRES-mediated translational control of AMAP1 expression during differentiation of monocyte U937 cells. *Cell Cycle* 7, 3273-3281 (2008).
- 42 Menju, T., Hashimoto, S., Hashimoto, A., Otsuka, Y., Handa, H., Ogawa, E., Toda, Y., Wada, H., Date, H. & Sabe, H. Engagement of overexpressed Her2 with GEP100 induces autonomous invasive activities and provides a biomarker for metastases of lung adenocarcinoma. *PLoS One* 6, e25301 (2011).
- 43 Onodera, Y., Nam, J. M., Hashimoto, A., Norman, J. C., Shirato, H., Hashimoto, S. & Sabe, H. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J. Cell Biol.* 197, 983-996 (2012).
- 44 Kinoshita, R., Nam, J. M., Ito, Y. M., Hatanaka, K. C., Hashimoto, A., Handa, H., Otsuka, Y., Hashimoto, S., Onodera, Y., Hosoda, M., Onodera, S., Shimizu, S., Tanaka, S., Shirato, H., Tanino, M. & Sabe, H. Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy. *PLoS One* 8, e76791 (2013).
- 45 Sato, H., Hatanaka, K. C., Hatanaka, Y., Hatakeyama, H., Hashimoto, A., Matsuno, Y., Fukuda, S. & Sabe, H. High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Commun. Signal* 12, 17 (2014).
- 46 Handa, H., Hashimoto, A., Hashimoto, S. & Sabe, H. Arf6 and its ZEB1-EPB41L5 mesenchymal axis are required for both mesenchymal- and amoeboid-type invasion of cancer cells. *Small GTPases*, 1-7 (2016).
- 47 Hashimoto, A., Hashimoto, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Onodera, Y., Handa, H., Oikawa, T. and Sabe, H. ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis, and drug resistance. *Oncogenesis* (2016).
- 48 Hashimoto, S., Mikami, S., Sugino, H., Yoshikawa, A., Hashimoto, A., Onodera, Y., Furukawa, S., Handa, H., Oikawa, T., Okada, Y., Oya, M. & Sabe, H. Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat. Commun.* 7, 10656

- (2016).
- 49 Otsuka, Y., Sato, H., Oikawa, T., Onodera, Y., Nam, J. M., Hashimoto, A., Fukunaga, K., Hatanaka, K. C., Hatanaka, Y., Matsuno, Y., Fukuda, S. & Sabe, H. High expression of EPB41L5, an integral component of the Arf6-driven mesenchymal program, correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma of the tongue. *Cell Commun. Signal* 14, 28 (2016).
- 50 国立がん研究センター. がん情報サービス がん登録・統計, <http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html> (2016).
- 51 Posner, M. R., Hershock, D. M., Blajman, C. R., Mickiewicz, E., Winqvist, E., Gorbounova, V., Tjulandin, S., Shin, D. M., Cullen, K., Ervin, T. J., Murphy, B. A., Raez, L. E., Cohen, R. B., Spaulding, M., Tishler, R. B., Roth, B., Viroglio Rdel, C., Venkatesan, V., Romanov, I., Agarwala, S., Harter, K. W., Dugan, M., Cmelak, A., Markoe, A. M., Read, P. W., Steinbrenner, L., Colevas, A. D., Norris, C. M., Jr., Haddad, R. I. & Group, T. A. X. S. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 1705-1715 (2007).
- 52 Haddad, R. I. & Shin, D. M. Recent advances in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1143-1154 (2008).
- 53 日本癌治療学会. がん診療ガイドライン, <<http://jsco-cpg.jp/top.html>> (2013).
- 54 Adelstein, D. J., Li, Y., Adams, G. L., Wagner, H., Jr., Kish, J. A., Ensley, J. F., Schuller, D. E. & Forastiere, A. A. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 92-98 (2003).
- 55 Forastiere, A. A., Goepfert, H., Maor, M., Pajak, T. F., Weber, R., Morrison, W., Glisson, B., Trotti, A., Ridge, J. A., Chao, C., Peters, G., Lee, D. J., Leaf, A., Ensley, J. & Cooper, J. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 2091-2098 (2003).
- 56 UICC 日本委員会 TNM 委員会. *TNM 悪性腫瘍の分類 第7版 日本語版*, 金原出版, 東京, 2010.
- 57 Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S.,

- Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K. & Ang, K. K. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 354, 567-578 (2006).
- 58 Vermorcken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N. & Hitt, R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1116-1127 (2008).
- 59 Cordes, N. & Park, C. C. beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 753-760 (2007).
- 60 Hofman, P., Butori, C., Havet, K., Hofman, V., Selva, E., Guevara, N., Santini, J. & Van Obberghen-Schilling, E. Prognostic significance of cortactin levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status. *Br. J. Cancer* 98, 956-964 (2008).
- 61 Ferris, R. L., Blumenschein, G., Jr., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba, N. F., Iglesias Docampo, L. C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., Geese, W. J., Kopit, J., Shaw, J. W. & Gillison, M. L. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* 375, 1856-1867 (2016).
- 62 National Cancer Institute. *The Cancer Genome Atlas*, <<https://cancergenome.nih.gov/>> (2015).
- 63 Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178-196 (2014).
- 64 University of Copenhagen. *JASPAR version 5.0*, <<http://jaspar2014.genereg.net/>> (2014).
- 65 Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C. Y., Chou, A., Ienasescu, H., Lim, J., Shyr, C., Tan, G., Zhou, M., Lenhard, B., Sandelin, A. & Wasserman, W. W. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D142-147 (2014).

- 66 Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E. & Borresen-Dale, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869-10874 (2001).
- 67 Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X. & Perou, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, R68 (2010).
- 68 Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., Furth, P. A., Palazzo, J. P., Olopade, O. I., Bernard, P. S., Churchill, G. A., Van Dyke, T. & Perou, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76 (2007).
- 69 Hollern, D. P. & Andrechek, E. R. A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 16, R59 (2014).
- 70 Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J. & Pollard, J. W. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am. J. Pathol.* 163, 2113-2126 (2003).
- 71 National Center for Biotechnology Information. *Gene Expression Omnibus*, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>> (2017).
- 72 Guy, C. T., Cardiff, R. D. & Muller, W. J. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* 12, 954-961 (1992).
- 73 Nam, J. M., Onodera, Y., Mazaki, Y., Miyoshi, H., Hashimoto, S. & Sabe, H. CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J.* 26, 647-656 (2007).
- 74 National Center for Biotechnology Information. *Online Mendelian*

- Inheritance in Man*, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>> (2017).
- 75 Endo, A., Kuroda, M. & Tanzawa, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72, 323-326 (1976).
- 76 Endo, A., Kuroda, M. & Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 29, 1346-1348 (1976).
- 77 Baumann, K. L., Butler, D. E., Deering, C. F., Mennen, K. E., Millar, A., Nanninga, T. N., Palmer, C. W. & Roth, B. D. The Convergent Synthesis of Ci-981, an Optically-Active, Highly Potent, Tissue Selective Inhibitor of Hmg-Coa Reductase. *Tetrahedron Lett.* 33, 2283-2284 (1992).
- 78 Nawrocki, J. W., Weiss, S. R., Davidson, M. H., Sprecher, D. L., Schwartz, S. L., Lupien, P. J., Jones, P. H., Haber, H. E. & Black, D. M. Reduction of Ldl Cholesterol by 25-Percent to 60-Percent in Patients with Primary Hypercholesterolemia by Atorvastatin, a New Hmg-Coa Reductase Inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 678-682 (1995).
- 79 Spitzer, M. H., Carmi, Y., Reticker-Flynn, N. E., Kwek, S. S., Madhiredy, D., Martins, M. M., Gherardini, P. F., Prestwood, T. R., Chabon, J., Bendall, S. C., Fong, L., Nolan, G. P. & Engleman, E. G. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 487-502 e415 (2017).
- 80 Freed-Pastor, W. A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerod, A., Moon, S. H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., Bissell, M. J., Osborne, T. F., Tian, B., Lowe, S. W., Silva, J. M., Borresen-Dale, A. L., Levine, A. J., Bargonetti, J. & Prives, C. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* 148, 244-258 (2012).
- 81 Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, G. J., Chen, Q., Huang, S. C., O'Neill, C. M., Edelson, B. T., Pearce, E. J., Sesaki, H., Huber, T. B., Rambold, A. S. & Pearce, E. L. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* 166, 63-76 (2016).

- 82 Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159 (2012).
- 83 Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335-343 (2014).
- 84 Wai, T. & Langer, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 105-117 (2016).
- 85 Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. & Kurland, C. G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-140 (1998).
- 86 Powers, S. K., Wiggs, M. P., Duarte, J. A., Zergeroglu, A. M. & Demirel, H. A. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E31-39 (2012).
- 87 Mishra, P. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 634-646 (2014).
- 88 Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. & Mihara, K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282, 11521-11529 (2007).
- 89 Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. & Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11960-11965 (2009).
- 90 Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K. & Ishihara, N. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat. Cell Biol.* 19, 856-863 (2017).
- 91 Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S. O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., Taguchi, N., Morinaga, H., Maeda, M., Takayanagi, R., Yokota, S. & Mihara, K. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* 11, 958-966 (2009).
- 92 Zong, W. X., Rabinowitz, J. D. & White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* 61, 667-676 (2016).
- 93 Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W.

- & Tu, Y. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 32, 4814-4824 (2013).
- 94 Brown, K. A., Aakre, M. E., Gorska, A. E., Price, J. O., Eltom, S. E., Pietenpol, J. A. & Moses, H. L. Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res.* 6, R215-231 (2004).
- 95 Kasai, H., Allen, J. T., Mason, R. M., Kamimura, T. & Zhang, Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir. Res.* 6, 56 (2005).
- 96 Cassidy-Stone, A., Chipuk, J. E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M. J., Shaw, J. T., Hinshaw, J. E., Green, D. R. & Nunnari, J. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev. Cell* 14, 193-204 (2008).