HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アルギナーゼ1の発現と大腸がんの悪性化に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	王, 向東
Description	配架番号：2752
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15434号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89881
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	WANG_Xiangdong_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　王　向東

学 位 論 文 題 名

アルギナーゼ 1 の発現と大腸がんの悪性化に関する研究
(Studies on the arginase-1 expression and malignant alteration of colorectal cancer)

【背景と目的】近年、大腸がんの生命予後は徐々に延長しているが、肝臓、肺、腹膜など、他臓器への転移は依然として治癒が困難である。そのため、大腸がんの再発・転移の制御は、克服すべき大きな課題の一つである。アルギナーゼ 1(ARG1)は尿素回路関連酵素の一つで、アルギニンを尿素とオルニチンに分解し、これらの代謝産物は、細胞の増殖、分化および機能を調節することが知られている。これまで担がんマウスモデルの生体内にアルギナーゼ阻害剤(nor-NOHA)を投与することで、抗腫瘍免疫機能が亢進し、腫瘍形成が抑制されることが明らかにされているが、がん細胞における ARG1 の役割については未だ報告が少ない。本研究では、公共データベースを活用した検索、マウス生体モデルの解析および in vitro 培養評価実験により、生体内での転移巣の形成能、腫瘍形成能、大腸がん細胞の遊走・浸潤能、増殖能および生体内での抗腫瘍免疫を解析・評価し、大腸がんの悪性化における ARG1 の役割について明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】大腸がん患者大腸組織の正常部位あるいは原発腫瘍組織における ARG1 タンパク質発現レベルについて臨床プロテオミクスコンソーシアム(CPTAC)のプロテオームデータを活用して比較検討した。また遺伝子発現オムニバス(GEO)データセットから原発腫瘍と肝転移巣における ARG1 遺伝子発現レベルを検証した。ARG1 遺伝子を過剰発現あるいは欠損したマウス大腸がん CT26 細胞株を作成し、これらを野生型 BALB/c マウスに対して GFP を導入した CT26 細胞株を脾臓内に移植する大腸がん肝転移巣形成モデルおよび皮内移植する原発腫瘍モデルを構築した。CT26 細胞の移植後における転移巣や腫瘍形成の形成について、肝臓組織の HE 染色および生体イメージング法、腫瘍の計測により解析した。さらに nor-NOHA を生体内投与し、転移巣の形成や腫瘍形成、抗腫瘍免疫に及ぼす効果を検討した。また腫瘍微小環境における免疫担当細胞について、免疫組織化学染色、フローサイトメトリーにより解析した。*in vitro* 培養評価実験にて、ARG1 を過剰発現あるいは欠損させた CT26 細胞、あるいは nor-NOHA を添加した細胞遊走能や浸潤能についてトランスウエルを使用した migration/invasion アッセイ、CT26 細胞の細胞増殖能を MTT アッセイ、でそれぞれ解析・評価した。また CT26 細胞の上皮間葉転換 (EMT) 関連因子について定量 PCR およびウエスタンブロティング法により解析した。さらにヒト大腸がん HCT116 細胞および DLD-1 を使用し、nor-NOHA 処理による遊走能や浸潤能および細胞増殖能に及ぼす効果について確認した。

【結果】大腸がん患者大腸組織の正常部位に比べ、原発腫瘍組織における ARG1 タンパク質発現レベルは高値であった。また原発腫瘍に比べ肝転移巣における ARG1 遺伝子発現レベルは高値であることを確認した。マウス生体モデルの検討により、ARG1 遺伝子を過剰発現させたマウス大腸がん CT26 細胞は、生体内における転移巣の形成や腫瘍の形成が亢進し、

ARG1 遺伝子を欠損した CT26 細胞は転移巣の形成や腫瘍の形成が抑制されることが分かった。さらに nor-NOHA の投与により、転移巣の形成や腫瘍の形成が抑制されることを確認した。*in vitro* 培養評価系において、ARG1 遺伝子過剰発現 CT26 細胞は、細胞遊走能、浸潤能および細胞増殖能が亢進し、ARG1 遺伝子欠損 CT26 細胞は、細胞遊走能、浸潤能および細胞増殖能が低下した。また CT26 細胞は nor-NOHA の添加により、細胞遊走能、浸潤能および細胞増殖能が抑制されることを確認した。nor-NOHA で処理した CT26 細胞の N-cadherin タンパク質発現レベルは低下し、E-Cadherin 発現レベルは増加することを確認した。また ARG1 遺伝子過剰発現 CT26 細胞は N-cadherin タンパク質発現レベルは増加し、E-cadherin 発現レベルは低下すること、Zeb2、Twist1 および Twist2 遺伝子発現レベルが増加すること、さらにリン酸化 mTOR およびリン酸化 ERK タンパク質の発現レベルが高値であった。さらにヒト大腸がん HCT116 細胞および DLD-1 細胞を nor-NOHA で処理した結果、細胞増殖の抑制、細胞遊走能や浸潤能が低下することを確認した。最後にマウス生体モデルにおける免疫担当細胞を解析した結果、nor-NOHA を投与することで、腫瘍内における成熟型樹状細胞やエフェクターメモリー型 CD8 陽性 T 細胞、また細胞傷害性分子パーフォリンおよび Granzyme B を発現する CD8 陽性 T 細胞の浸潤が亢進した。

【考察】本研究において、大腸がん患者の原発腫瘍組織における ARG1 タンパク質発現レベルが正常部位に比べ高いこと、また原発腫瘍組織に比べ、肝転移巣における ARG1 遺伝子発現が高値であることから、ARG1 の発現は大腸がんの悪性化に関与する可能性ことが考えられた。ARG1 遺伝子を過剰発現させた CT26 細胞は、マウス生体内での転移巣の形成や腫瘍形成が亢進する一方で、ARG1 遺伝子の欠損により転移巣の形成や腫瘍形成が著しく抑制されたことから、大腸がん細胞における ARG1 の発現は、がんの悪性化に直接的に関与することが考えられた。さらに、本研究で nor-NOHA をマウス生体モデル投与したところ、転移巣の形成や腫瘍形成が有意に抑制されることから、ARG1 の阻害は大腸がんの治療に有用である可能性も考えられた。そこで *in vitro* 培養評価系にて、CT26 細胞を nor-NOHA で処理したところ、有意に細胞遊走能、浸潤能および細胞増殖能が低下するとともに、ARG1 遺伝子過剰発現 CT26 細胞は、細胞遊走能および転移巣形成能が亢進すること、EMT 表現型を示すことが分かった。そこで ARG1 の作用分子メカニズムを検討した結果、ARG1 過剰発現 CT26 細胞はリン酸化 mTOR およびリン酸化 ERK タンパク質発現レベルが高値であることから、大腸がん細胞における ARG1 の発現は mTOR1 および ERK・MAPK シグナル経路の活性化を介して、細胞増殖能を亢進し、生体内における腫瘍形成および転移巣の形成を促進する可能性が考えられた。さらに本研究で、マウス生体モデルにおいて nor-NOHA 投与による宿主免疫担当細胞への影響を精査した結果、成熟型樹状細胞、エフェクターメモリー型 CD8 陽性 T 細胞およびパーフォリン、グランザイム B 陽性キラーT 細胞の肝転移巣の集積の亢進を認めたことから、担がん生体における ARG1 阻害は、抗腫瘍免疫の賦活とがん細胞に対する直接の抗腫瘍効果の両方が存在すると考えられた。従って、本研究結果から、ARG1 を阻害することにより、今後、大腸がん患者に対し、ARG1 の活性化制御による、より効果的ながん治療法の確立に繋がる可能性も考えられる。

【結論】本研究において、大腸がん細胞における ARG1 の発現は細胞遊走能、浸潤能および細胞増殖能を亢進し、生体内で転移巣の形成や腫瘍形成などの悪性化に関与することが明らかとなり、ARG1 の阻害は、有効ながん治療法の確立に繋がる可能性が示唆された。