



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 [全文の要約]
Author(s)	王, 向東
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2752 他
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/2115/89967
Type	doctoral thesis
File Information	WANG_Xiangdong_summary.pdf



学位論文(要約)

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)

2023 年 3 月
北海道大学
王 向東

学位論文(要約)

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)

2023 年 3 月
北海道大学
王 向東

【研究背景】

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 マウスの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の形成や腫瘍形成について、肝臓組織の HE 染色および生体イメージング法、また腫瘍の計測により解析した。さらにアルギナーゼ阻害剤である nor-NOHA を生体内に投与し、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。また担がんマウスの腫瘍組織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ェルを使用した migration/invasion アッセイ、CT26 細胞の細胞増殖能を MTT アッセイにて、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ッティング法により解析し、がんの増殖に関するシグナル関連分子 (mTORC1・MAPK)についてもウエスタンブロッティング法により評価した。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。さらに健常人に比べ、大腸がん患者で血清アルギナーゼの活性化高いことを見出した。以上の結果から、大腸がん領域において、ARG1 の発現レベルは、がんの悪性化に関連するとともに、新たなバイオマーカーの一つとして有望である可能性が示唆された。

次に、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明らかとなった。また 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、本研究で 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見出した。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。以上の結果から、ARG1 の活性および発現は大腸がんの悪性化に関与することが示唆された。

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。以上の結果より、腫瘍微小環境における ARG1 の発現と活性化は、樹状細胞や抗腫瘍エフェクター T 細胞の機能不全を誘発するとともに、大腸がん細胞の EMT や mTORC1 および ERK・MAPK シグナル伝達経路の活性化を介した細胞増殖、細胞遊走能、浸潤能を亢進し、担がん生体における大腸がんの腫瘍形成および転移巣形成の促進を引き起こす可能性が示唆された。

【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が考えられた。さらに 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。また本研究で 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。

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。さらに ARG1 の作用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 mTORC1 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。これまでの

先行研究で、アルギニンの代謝産物であるポリアミン類について、がんの悪性化との関連が報告されていることから、ARG1 発現誘導とその活性化を介したアルギニン代謝産物は、大腸がん細胞の細胞遊走能、浸潤能や転移巣形成能を亢進する mTOR シグナル伝達経路の活性化に関連する可能性があると考えられた。

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。最後に、ヒト大腸がん HCT116 細胞や DLD-1 細胞に対して、nor-NOHA 処理したところ、細胞増殖および細胞遊走能、浸潤能が低下した。従って、本研究結果から、ARG1 の活性化を制御することで、より効果的な大腸がん治療法の確立に繋がる可能性が考えられた。

【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。