

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第40号

2016年3月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 28 年 3 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1 . 小谷 友理	〔博士（生物工学）〕	1
2 . 森 勇伍	〔博士（生物工学）〕	5
3 . 吉田 亜佑美	〔博士（生物工学）〕	11
4 . <small>オントン パーワレッド</small> Ontong Pawared	〔博士（生物工学）〕	17
5 . 佐々木 大樹	〔博士（生物工学）〕	21
6 . <small>スントンスイット ジーラワット</small> Soonthornsit Jeerawat	〔博士（生物工学）〕	27

論文博士

1 . 上野 信洋	〔博士（生物工学）〕	31
-----------	------------	-------	----

氏名（本籍）	小谷 友理（兵庫県）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第20号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	AAA+ ATP アーゼ・ユビキチンリガーゼ mysterin によるゼブラフィッシュの神経-筋形態制御
論文審査委員	主 査 永田 和宏 教授
	副 査 黒坂 光 教授
	” 近藤 寿人 教授

論文内容の要旨

本論文は、もやもや病感受性因子として同定された mysterin のゼブラフィッシュにおける生理的機能について検討したものである。

もやもや病は、ヒト脳底部に位置するウィリス動脈輪での動脈閉塞により、脳梗塞を引き起こす疾患である。もやもや病患者の一部は家族性であり、それら家系の遺伝解析から、もやもや病の発症リスクを上げる因子として、mysterin が同定されていた。

mysterin タンパク質は、一つの分子のなかに、AAA+ ATPase とユビキチンリガーゼを有する唯一の因子であり、単量体の分子量が 591 KDa と巨大なものである。加えて、AAA+タンパク質であるから、機能体は 3.6 MDa の巨大複合体（六量体）であることが予想される。先行研究により、ゼブラフィッシュにおける mysterin のノックダウンにより、体節間血管のミスガイダンスが観察されているが、それ以外の表現型は報告されていない。

本論文では、ゼブラフィッシュを用いて mysterin のノックダウン実験を行い、その他の表現型について検討を行った。明視野観察から、mysterin ノックダウン胚は、遊泳速度の低下と発生遅延を示すことが確認された。組織染色からは、運動神経の投射異常、速筋の形態異常、遅筋の垂集団である MPCs の異常増殖が観察された。以上から、mysterin は、体節間血管のみを制御する因子ではなく、運動神経、速筋形態にも関与することが明らかとなった。

mysterin の組織特異性を明らかにするため、速筋特異的にヒト由来の mysterin を発現させ、

mysterin ノックダウン個体で見られた表現型の回復について検討を行った。その結果、mysterin ノックダウンによる速筋形態異常は、ヒト mysterin の速筋特異的な発現によって回復した。加えて、運動神経の投射異常の一部も回復を見せた。しかし、体節間血管の異常ガイダンス、MPCs の異常増加はヒト mysterin の速筋特異的な発現によって回復しなかった。以上のことから、速筋由来の mysterin は、神経、筋肉の形態を制御するが、MPCs や体節間血管には影響せず、速筋における mysterin の細胞自律的な働きが示唆された。

mysterin の AAA+ ATPase とユビキチンリガーゼが生理機能に必須であるか、変異体、欠損体を作製し調べたところ、いずれのドメインを欠損しても野生型 mysterin の機能を代替できないことが分かった。すなわち、mysterin は、ATP ase 活性、ユビキチンリガーゼ活性依存的に神経-筋形態を制御しており、両ドメインは mysterin の *in vivo* 機能に必須であることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

本博士論文は、新規因子 *mysterin* の機能解析を行い、機能の一端を明らかにしたものである。特に、これまで *mysterin* 酵素活性の生理的意義に言及した論文はなかったが、二つの酵素活性が生理的に重要であることを見出した初めての研究である。*mysterin* は、もやもや病の感受性因子として単離され、C 末端近傍の一アミノ酸変異が発症に関与すると報告されている。もやもや病の発症と *mysterin* の生理機能に関係があるのか、*mysterin* の変異による機能の獲得や消失がもやもや病の発症とどのような関係にあるのか未だ明らかでない。本論文では、*mysterin* の機能を調べるため、ゼブラフィッシュにおいて *mysterin* をノックダウンし、幅広い組織における表現型の有無が検討された。

これまで、ゼブラフィッシュにおける *mysterin* ノックダウンにより、体節間血管の異常ガイダンスが観察されていたが、それ以上の表現型は報告されていない。本研究では、*mysterin* における運動神経、速筋形態、遅筋の亜集団 MPCs の増加が新たに観察された。加えて、ヒト *mysterin* を速筋特異的に発現させる実験に成功した。ゼブラフィッシュにおいて、受精卵に mRNA をインジェクションし、発現させる実験系が知られているが、*mysterin* mRNA が巨大であるため、従来の手法で発現させることは困難であった。しかし、今回トランスポゾンを用いて、ゼブラフィッシュゲノムに *mysterin* を組み込ませることで、組織特異的な入れ戻しに成功しており、*mysterin* の生理機能についてより詳細な解析を行うことができた。本研究の結果から、速筋に発現する *mysterin* が、神経-筋肉の形態制御に細胞自律的に関与することが明らかとなった。本研究は、*mysterin* の生理的意義を明らかにするのに留まらず、今後、血管内皮細胞や神経特異的な *mysterin* の発現にも結び付く、将来につながる有意義なものであると考えられる。

mysterin ノックダウン胚では、MPCs の異常増殖、体節間血管のガイダンス異常が見られたが、これらの表現型に速筋 *mysterin* は影響しないことが分かった。原腸胚後期に速筋前駆体、遅筋前駆体が生じ、その後、遅筋細胞と MPCs に分化する。*mysterin* のノックダウンでは、速筋の形態異常が引き起こされるが、遅筋には影響がなく、遅筋の亜集団である MPCs の数のみを増加させた。原腸胚後期以降、速筋前駆体と遅筋前駆体に分かれた後の速筋形成過程において *mysterin* が機能し、また、遅筋前駆体と MPCs の運命が決定される段階でも関与していると考えられる。この事実は、*mysterin* の機能を考える上で重要な情報であるが、さらに、不明な点の多い速筋の分化メカニズムにも手がかりを与える研究であると考えられた。

mysterin タンパク質は、巨大であり、かつ AAA+ ATP アーゼドメインとユビキチンリガーゼドメインを持つことで知られている中で唯一のタンパク質である。これまで、約 80 種の AAA+ タンパク質と、約 600 種のユビキチンリガーゼが知られているが、一分子内に両ドメインを持つものは *mysterin* のみであり、いかに両ドメインを協同させているかは大きな謎である。

本論文では、この疑問にも迫り AAA+ ATP アーゼの変異体、ユビキチンリガーゼの機能欠損体をそれぞれ速筋に特異的に発現させた。しかし、どちらの機能を欠いても、野生型 *mysterin* の機

能を代替しなかった。つまり、mysterin の両ドメインは生理機能に必須であることが分かった。この結果は、mysterin の酵素活性の重要性を初めて示したものであり、今後の mysterin の解析にも役だつと考えられた。

本論文の結果は、新規性が高く、また、実験系の構築という意味でも、今後の研究に有意義であると考えられた。本研究の主要部分は *Scientific Reports* 誌に掲載され、国際的にも高い評価を得ている。

以上より、本論文は、博士(生物工学)の論文として十分な水準に達していると考えられた。

氏名（本籍）	森 勇伍（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第21号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	MUC1を介した腫瘍悪性化機構の解析
論文審査委員	主 査 中田 博 教授
	副 査 佐藤 賢一 教授
	” 横山 謙 教授

論文内容の要旨

多くの上皮悪性腫瘍細胞で過剰発現している MUC1 は、膜結合型の糖タンパク質で腫瘍細胞の悪性化に関与することが示唆され、その発現量と癌患者の予後の経過には相関性があることもそのことを裏付けている。MUC1 は1本のポリペプチド鎖として生合成された後、細胞内輸送過程において自己切断され、大半の細胞外領域を形成する N-terminal subunit (MUC1-N) 及び膜貫通領域を有する C-terminal subunit (MUC1-C) が非共有結合によってヘテロ二量体を形成し細胞膜へ輸送される。MUC1 は一般的な接着分子と比較して巨大な棒状のタンパク質であるため、MUC1 が細胞間及び細胞/細胞外基質間の相互作用に対する物理的な障害となることで細胞接着を減弱し、腫瘍細胞の悪性化に関与することが報告されている一方で、MUC1 を介したシグナル伝達に伴う悪性化への関与も近年報告されている。しかし、MUC1 を介したシグナル伝達については、EGF 等の増殖因子と増殖因子受容体の結合を起点とした受容体型 tyrosine kinase の活性化に伴うシグナル伝達を MUC1 が中継することによる機構であり、MUC1 が直接シグナル伝達に関与している可能性についてはほとんど検討されていない。MUC1-N 上には多数の O-グリコシド型糖鎖が付加されるが、上皮悪性腫瘍細胞上に発現した MUC1 ではこの糖鎖構造が変化し、腫瘍関連糖鎖抗原の1つである TF 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr) が検出されることから、同糖鎖への galectin の結合が考えられた。また、担癌状態における血中 galectin 濃度の上昇が報告されていることから、腫瘍組織微小環境下において上皮悪性腫瘍細胞上の MUC1 に galectin が結合す

ることで、MUC1 が直接介在するシグナル伝達を惹起することが考えられ、この可能性を検討した。

ヒト大腸癌由来細胞株である HCT116 細胞に MUC1cDNA を導入した細胞 (HCT116/MUC1 細胞) 及びそのコントロール細胞 (HCT116/Mock 細胞) を用いた DNA microarray 解析の結果、HCT116/MUC1 細胞での MUC1 以外の mucin の発現は認められなかった。また、galectin family の中では galectin-1 及び galectin-3 の発現が認められたが、MUC1 発現の有無による galectin の発現量に変化は認められなかった。一方で、細胞表面に結合した galectin 量は galectin-3 のみ MUC1 発現腫瘍細胞で増加しており、これは MUC1 への galectin-3 の結合によるものと考えられた。実際、細胞及びヒト癌患者組織標本を用いた免疫染色法により、MUC1 と galectin-3 は同様の分布を示した。これらの結果を基に、MUC1 への galectin-3 の結合に伴うシグナル伝達について検討した。MUC1 発現腫瘍細胞を galectin-3 により処理することで、MUC1-C 中の tyrosine 残基のリン酸化が亢進し、続いて ERK1/2 及び Akt のリン酸化の亢進が認められた。また、EGFR 阻害剤存在下でも同様のシグナル伝達が誘導されたことから、MUC1 への galectin-3 の結合がシグナル伝達の起点となっていることを示している。更に、多量体形成能を欠損した galectin-3 による処理では、上述したシグナル伝達活性化は著しく減少したことから、galectin-3 の多量体形成が MUC1 を介したシグナル伝達の活性化に関与することを示している。更に、MUC1 の発現レベル及び細胞表面の galectin-3 量と、細胞増殖能及び移動能に相関性が認められた。以上の結果より、腫瘍細胞上の MUC1 への galectin-3 の結合によりシグナル伝達が活性化し、腫瘍悪性化機構が誘導されることが示唆されると共に、このシグナル伝達活性化は増殖因子/増殖因子受容体依存的な MUC1 介在性のシグナル伝達とは異なる機構であることが明らかになった。

MUC1 によるシグナル伝達の結果として新たな分子の発現が誘導され、その分子による腫瘍悪性化への関与も想定された。DNA microarray 解析を行い MUC1 の発現により発現レベルが上昇する分子を探索した結果、腫瘍細胞の細胞浸潤能に関与する分子である uPA (urokinase-type plasminogen activator) の上昇が認められた。また、ヒト癌患者組織標本を用いた免疫染色法により、MUC1 と uPA の分布の一致及び発現量の相関性が認められた。これらの結果を基に、MUC1 による uPA の発現誘導機構を検討した。Co-immunoprecipitation assay により、MUC1-C と NF- κ B p65 の複合体形成が認められ、また同複合体形成による NF- κ B p65 の核移行の促進が認められた。更に、chromatin immunoprecipitation assay 及び luciferase assay により、MUC1-C/NF- κ B p65 複合体が uPA プロモーター上にリクルートされ、転写活性の亢進に関与していることが認められた。uPA の発現亢進に伴い、細胞外に分泌される uPA 量も増加すると共に MMP-2/9 (matrix metalloproteinase-2/9) の活性型の増加も認められ、これらの分子の活性化に伴う腫瘍細胞の細胞浸潤能の亢進が示された。更に、MUC1 発現腫瘍細胞を galectin-3 により処理することで、MUC1-C への NF- κ B p65 のリクルートが促進したことから、上述した一連の機構にも MUC1 への galectin-3 の結合が関与している可能性が示唆された。以上の結果より、MUC1 による腫瘍細胞の細胞浸潤能亢進機構には、uPA の発現誘導が関与していることが示された。

このように、MUC1 を介したシグナル伝達の活性化及び悪性化に関与する分子の発現誘導が、

MUC1 発現腫瘍細胞の細胞増殖能、移動能及び浸潤能の亢進に関与していることが示唆された。またこれらの機構において、MUC1 への galectin-3 の結合が重要な起点の1つとして機能している可能性が示された。

論文審査結果の要旨

MUC1は上皮細胞に普遍的に発現する膜結合型ムチンであるが、本来の機能は粘膜の保護作用や潤滑作用である。がん化に伴うMUC1上に発現する糖鎖の質的变化に加えて、細胞膜上での局在性も変化する。すなわち、アピカル側に発現していたMUC1は細胞の極性の消失により細胞膜全体に分布するようになる。本博士論文の根底にある発想はがん組織微小環境における細胞と其の表面における分子の存在状態及び其の状態において相互作用する最も可能性のある分子を取り上げ解析したものである。生理的状況下のがん細胞の状態を的確に判断したところに大きな研究成果を生む要因があったと言える。さらに、実際に標的とした分子をヒトがん組織を用いて組織化学的に可視化し、想定の可能性をより高めた上で研究を進展させて行った手法も評価できる。MUC1の関連する情報伝達については、成長因子受容体を起点としたものであくまで中継する分子としての機能が解析されてきた。一方、リガンドとして想定したガレクチン-3についても既にMUC1に結合するというデータは報告済みであったが、シグナル伝達に関する機能については未解明であった。そのような背景のもと、MUC1へのガレクチン-3への結合が直接、シグナル伝達を惹起し、がん細胞の悪性化、すなわち増殖促進、移動能の亢進について明確に証明したことが高く評価される。それは、高い技術的な裏付け、すなわち、遺伝子操作により、MUC1及びガレクチン-3のレベルの人為的増減を複数のがん細胞株で施し、その因果関係を分子レベルで明確にした点によるものである。従来から指摘されてきたがんの悪性化に伴うMUC1の発現量の増加とがん患者血清中のガレクチン-3の増加の生物学的意義を初めて明らかにした論文と言える。次に、MUC1と腫瘍の悪性化についてはMUC1の発現によって、新たに誘導される分子の作用によるケースも想定されることから、MUC1の強制発現に伴い発現が誘導される分子の検索をDNAマイクロアレイにより行ったところuPAが見出された。このような研究の出発点を見出した点についても、MUC1単独の機能のみに拘泥することなく、柔軟な発想力の賜物であり、高く評価できる。MUC1の発現によるuPAの誘導についても、それぞれの分子を対象とした従来からの研究から、転写因子NF- κ Bを共通項として捉えたことに本研究の方向性が定まった。このように従来からの知見を客観的に演繹し、自らの研究内容に組み込んでいき、かつその2つを加味することにより独創性のある方向性を打ち出した研究成果と言える。すなわち、MUC1へのNF- κ Bのリクルートが核移行を促進し、NF- κ BのuPAプロモーター領域への結合、uPAの転写促進に繋がることを明らかにした。本研究においても複数のMUC1発現レベルの異なる細胞株、あるいは人為的にMUC1の発現レベルの異なる細胞を作成して一連の流れを証明した。証明も生化学的手法、細胞化学的手法、ChIP assayやルシフェラーゼアッセイなどの分子生物学的手法などを駆使し、信頼性の高い研究成果となった。その結果として、いずれの研究成果も高い評価をもつ米国のジャーナルJ Biol Chemに採択されている。また、副査2名からも質、量ともに十分な内容をもつ博士論文であると判断された。公聴会での発表も理路整然とわかり易く説明し、専門外の聴取

者も理解できたものと思われる。また、質疑に対する応答も十分で、研究内容はもとより、その背景にある知識も十分であることが伺えた。総合して、博士の学位を取得する上で十分な内容であると判断した。

氏名（本籍）	吉田 亜佑美（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第22号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Studies on Neuropilin-1 in cancer - V E G F - A promotes cancer cell proliferation and invasion by an autocrine mechanism - (がん悪性化における Neuropilin-1 の研究 - V E G F - A はがん細胞の増殖と浸潤をオートクリンに促進する -)
論文審査委員	主 査 瀬尾 美鈴 教授 副 査 板野 直樹 教授 " 浜 千尋 教授

論文内容の要旨

ニューロピリン-1 (NRP1) は血管内皮増殖因子 (VEGF-A) のレセプターで、血管内皮細胞と腫瘍細胞において発現する。その構造は A、B、C ドメインを含む細胞外領域、1 回貫通型の膜貫通領域、そして 44 アミノ酸からなる細胞内領域から構成される。しかし、NRP1 の細胞内領域はレセプターとしては短く、多くのレセプターに存在するキナーゼドメイン領域を有していない。そのため、NRP1 はもう一つの VEGF-A のレセプターである血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2) と VEGF-A との結合能を高めるコレセプターとして働き、単独ではシグナル伝達を行わないと考えられてきた。近年、NRP1 は血管系の形成だけではなく、腫瘍形成のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが多くのがん種において報告されている。本研究では、腫瘍細胞に発現する NRP1 が VEGF-A によりオートクリンに腫瘍の増殖、浸潤・転移を促進し、悪性化に重要な役割を果たすことをヒト皮膚がん細胞 DJM-1、前立腺がん細胞 PC3M、脳腫瘍のグリオブラストーマ U87MG を用いて明らかにした。

DJM-1、PC3M、U98MG 細胞は VEGF-A を産生し、NRP1 を発現しているが VEGFR は発現していない。VEGF-A または NRP1 発現を siRNA により抑制すると、軟寒天中におけるがん細胞のコロニー形成能が抑制された。コロニー形成能はがん細胞の足場非依存的な増殖を意味する。がん細胞の足場

非依存的な増殖は、生体内における造腫瘍性とがん細胞の転移性に密接に関係している。VEGF-A 発現を抑制したがん細胞に VEGF-A を添加すると増殖は回復したが、NRP1 発現を抑制したがん細胞では回復しなかった。よって、VEGF-A が NRP1 を介して増殖シグナルを促進することが示唆された。

DJM-1 細胞の NRP1 発現を shRNA ベクターにより抑制すると (shNRP1-DJM-1)、NRP1 siRNA 処理と同様に増殖が抑制された。また、shNRP1-DJM-1 細胞に NRP1 の正常型 (WT) を強制発現させると増殖は回復したが、NRP1 の細胞内領域を欠損させた変異体 (Δ SEA) を発現させても増殖は回復しなかった。よって、NRP1 の細胞内領域はがん細胞の増殖促進シグナルに重要であると考えられた。NRP1 の細胞内領域に結合するタンパク質として足場タンパク質である GIPC1 が、GIPC1 に結合するタンパク質として Syx が報告されている。NRP1-GIPC1-Syx が結合するかを共免疫沈降法により確認すると、VEGF-A 非存在下で NRP1-GIPC1 もしくは NRP1-Syx が結合しており、VEGF-A 刺激によって GIPC1-Syx の複合体形成が誘導された。加えて、GIPC1、Syx それぞれの発現を DJM-1 細胞において抑制すると、増殖が抑制された。

Syx は RhoA 特異的な GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) である。RhoA は低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーに属し、細胞骨格の再構成を行う。がん細胞においては転移、浸潤を促進する。がん細胞において、内在性の VEGF-A により RhoA が恒常的に活性化されていた。RhoA の活性化を阻害する C3 exoenzyme または RhoA の下流シグナル伝達分子 ROCK のキナーゼ阻害剤 (Y27632) 処理により DJM-1 細胞の増殖が抑制された。また、VEGF-A の発現を抑制した DJM-1 細胞に恒常活性化型 RhoA を発現させると増殖が促進されたことから、VEGF-A/NRP1 シグナルは GIPC1-Syx 複合体形成を誘導し、RhoA を活性化することでがん細胞の増殖シグナルを伝達することが示された。さらに、VEGF-A または NRP1 の発現を抑制すると、細胞周期における G1-S 期への移行を抑制する p27 のタンパク質レベルが増加した。がん細胞において VEGF-A/NRP1 シグナルは RhoA を活性化させることで、p27 のタンパク質レベルの増加を抑制することが示唆された。これらの結果をふまえて、

GIPC1-Syx の複合体形成を阻害する細胞透過性ペプチドを設計した。ペプチドは HIV ウイルスの膜透過型配列 TAT、強化型緑色蛍光タンパク質 EGFP と Syx-GIPC1 の結合に重要となる Syx の C 末端側 8 個のアミノ酸配列 (SyxP) または対照として scrambled 配列 (ConP) から構成される。SyxP の添加により、がん細胞における RhoA の活性化と増殖は抑制されたが、ConP では抑制されなかった。以上の結果より、VEGF-A は NRP1 を介して GIPC1-Syx 複合体形成を誘導し、RhoA を活性化することでがん細胞の増殖を促進することを示した。

活性化型 RhoA ががん細胞の浸潤を促進することから、VEGF-A/NRP1 シグナルとがん細胞の浸潤、転移能についても評価した。VEGF-A、NRP1、GIPC1 または Syx の発現を抑制するとがん細胞の浸潤は抑制され、SyxP の添加によっても浸潤能は抑制された。NRP1 正常型 (WT) または NRP1 の細胞内領域を欠損させた変異体 (Δ SEA) を発現する DJM-1 細胞をヌードマウスに異種移植し、腫瘍の成長とリンパ節への転移を組織免疫染色法により確認した。NRP1 を発現する DJM-1 細胞では腫瘍体積と転移は増加したが、shNRP1-DJM-1 細胞では減少した。shNRP1-DJM-1 細胞に、NRP1 正常

型 (WT) もしくは細胞内領域を欠損させた変異型 (Δ SEA) を発現させると、WT では腫瘍体積、転移ともに回復したが、 Δ SEA では回復しなかった。組織免疫染色法により腫瘍内の RhoA の活性化をみると、コントロールと WT により形成された腫瘍では RhoA が活性化され増殖マーカーである Ki67 が染色されていたが、shNRP1 と Δ SEA ではどちらも抑制されていた。さらに、DJM-1 細胞と WT 発現細胞では約 30%リンパ節への転移が認められたが、shNRP1-DJM-1 細胞または Δ SEA 発現細胞では転移が抑制されていた。以上より、VEGF-A/NRP1 シグナル伝達経路は種々のがん細胞の増殖、浸潤と転移を促進することを示した。NRP1 の細胞内領域と下流のシグナル伝達分子 GIPC1、Syx を標的とすることは、新規の抗がん剤の開発に有益であると考えられる。

論文審査結果の要旨

2015年の日本人の死因の第一位は悪性新生物であり、全体の28%を占めている。近年、がんの治療薬として分子標的薬が注目を浴び、世界の製薬企業は競って新たな分子標的を探索している。新たな分子標的として、がん細胞の増殖や転移を促進する細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質が良い候補となる。原がん遺伝子の活性型変異やがん抑制遺伝子の機能喪失型変異ががん細胞を生み出す第一歩となるが、がんが悪性化するとともに血管内皮細胞増殖因子 VEGF-A を産生し、周辺の正常血管を構成する血管内皮細胞を腫瘍に呼び寄せ腫瘍血管新生が起こる。腫瘍血管新生を抑えることによって、腫瘍の成長とがん細胞の転移を抑制しようと考えた J. Folkman 教授の仮説から、VEGF-A の中和抗体であるアバスチンがアメリカ製薬企業により開発され FDA に認可された。しかしながら、アバスチンは転移性結腸・大腸がんをはじめとする複数のがんに適用されたが、その延命効果は期待されたほどでなく最大で約5ヶ月であった。アバスチンは VEGF-A が主に血管内皮細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体 VEGFR2 に結合し、血管新生を促進することを阻害できるが、悪性がん細胞に主に発現する受容体ニューロピリン1(NRP1)と VEGF-A との結合は阻害できない。多くのがんにおいて、NRP1 の発現と患者の生存率の低下が報告されており、NRP1 ががんの悪性化にどのような役割を果たしているのか、また VEGF-A との関連などその分子メカニズムの解明が待たれていた。

本研究では、VEGF-A を高レベルで発現するがん細胞を用いて、VEGF-A が NRP1 を介して細胞内シグナル伝達を惹起しがん細胞の増殖、遊走、浸潤、転移を促進することを明らかにした。転移性扁平上皮がん細胞 DJM-1、前立腺がん細胞 PC3M、脳腫瘍グリオブラストーマ U87MG 細胞、T98G 細胞を用いて、siRNA により VEGF-A または NRP1 の発現を抑制することで、がん細胞の足場非依存性増殖と遊走、浸潤が阻害されることを示した。また、shRNA によって NRP1 の発現を安定に抑制した扁平上皮がん細胞のクローンに、NRP1 の完全型(WT)、または NRP1 の細胞内領域を欠損した変異体 Δ SEA を作製し強制発現すると、NRP1-WT では増殖と浸潤が回復したが、NRP1 Δ SEA では回復できなかったことから、NRP1 の細胞内領域が重要であることを示した。さらに、NRP1 Δ SEA を用いて、NRP1 の細胞内領域と細胞内足場タンパク質 GIPC1 および Syx の相互作用が重要であることを示した。また、免疫沈降実験によって VEGF-A と NRP1 への結合が、NRP1/GIPC1 と GIPC1/Syx の相互作用を促進することを明らかにした。Syx は、細胞内骨格 F-actin を制御する RhoA を活性化する Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であり、GIPC1/Syx 相互作用が RhoA を活性化することを、siRNA を用いて GIPC1 または Syx の発現を抑制することによって示した。GIPC1/Syx の相互作用によって活性化された RhoA は、細胞周期を制御する CDK 阻害因子 p27 の不安定化に働き細胞増殖を促進することを示した。このことは、VEGF-A の発現を抑制し増殖を阻害した DJM-1 細胞に、恒常的活性型 RhoA を強制発現すると増殖が促進されたことから確認された。

GIPC1/Syx 相互作用の細胞増殖における効果に加えて、がん細胞の浸潤能を制御していることを明らかにした。GIPC1/Syx の相互作用を阻害する細胞内透過性ペプチドが、がん細胞の増殖と浸

潤を阻害することを示した。また、*in vivo* で VEGF-A/NRP1 のシグナル伝達のがん細胞の増殖とリンパ節への転移を促進していることを示した。

以上の研究成果は、VEGF-A ががん細胞の発現する NRP1 受容体を介してその下流のシグナル伝達を活性化することが、がん細胞の足場非依存性増殖や遊走、さらには浸潤や転移を促進することを明らかにし、学術的に意義深い。さらに、臨床応用面においても、NRP1 やそのシグナル伝達因子が新たながん分子標的となる可能性を示唆しており、がん治療に対して新しい治療薬を求めている社会に対する貢献度も高い。これらの成果の一部は国際英文専門雑誌に既に発表され、論文後半の部分も既に英語論文として投稿の準備が整っている。

本研究は、*in vitro* と動物実験を含む *in vivo* の実験によるがんの分子生物学的な特徴の解析、創薬につながるがんの分子標的となるシグナルタンパク質の相互作用と細胞透過性ペプチドの応用について多方面からの解析が加えられ、得られた結果も説得力がある。上に述べた研究内容から、本論文は学位にふさわしい内容を持つものと判断される。加えて、公聴会においては、研究の背景から始まり論理的に分かりやすく説明し、多様な視点からの質疑応答に十分応答し、研究者として今後の活躍が期待される能力を示した。

氏名（本籍）	オントン パーワレッド Ontong Pawared（タイ）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第23号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Hyaluronan overproduction promotes acquisition of cancer stemness and drives metabolic reprogramming （ヒアルロン酸の過剰産生はがん幹細胞性の獲得を促進し、代謝リプログラミングを誘導する）
論文審査委員	主 査 板野 直樹 教授 副 査 竹内 実 教授 " 川根 公樹 教授

論文内容の要旨

The cancer stem cell (CSC) model suggests that a small subpopulation of cancer cells possesses the ability to self-renew and give rise to malignant progeny that drive cancer progression. Recent reports have also proposed the existence of certain extra- or intracellular signals that allow cancer progenitors to dynamically revert to a stem-cell state. However, the mechanisms underlying cancer cell plasticity and CSC expansion are not entirely clear. Previous studies using a hyaluronan synthase 2 (Has2) transgenic mouse model demonstrated that hyaluronan overproduction caused rapid development of aggressive breast carcinoma at a high incidence. In Chapter I, it was hypothesized that hyaluronan overproduction may accelerate cancer progression by expanding CSC subpopulations during cancer development. Primary cancer cells were established from mammary tumors developed in the transgenic mice and subjected to the Hoechst 33342 dye exclusion assay to sort side population (SP) from non-side population (non-SP) cells. Flow cytometric analysis demonstrated the enrichment of CD44^{high}/CD24^{low} CSC-like cells in the SP fraction of hyaluronan overproducing cancer cells. This subpopulation exhibited several characteristics that

were similar to CSCs, including cancer-initiating and mammosphere-forming abilities. Excess hyaluronan production drove the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process defined as the loss of epithelial phenotypes, up-regulation of transforming growth factor beta (TGF- β), and induction of the EMT-related transcriptional factors Snail and Twist. Inhibition of TGF- β -Snail signaling or silencing of Twist expression abrogated the entrance into a stem-cell state. Taken together, these results suggest that hyaluronan overproduction allows plastic cancer cell populations to revert to stem-cell states via Twist and the TGF- β -Snail signaling axis.

Like many other stem cells, CSCs predominantly rely on glycolysis rather than mitochondrial oxidative phosphorylation for survival. However, little is known on how metabolic reprogramming in CSCs is controlled to orchestrate their stem cell-like properties. In Chapter II, metabolomic approaches clearly disclosed a metabolic shift toward aerobic glycolysis and acceleration of hexosamine biosynthetic pathway (HBP) flux in hyaluronan-overproducing breast cancer cells. A high HBP flux achieved by forced expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-1 (GFAT-1) resembled that caused by HA overproduction with regard to HIF-1 α stability and glycolytic program. Conversely, inhibition of GFAT-1 significantly decreased HIF-1 α stability in HA-overproducing cancer cells. Pharmacological inhibition of HIF-1 α abrogated HA-dependent aerobic glycolysis and markedly reduced the CSC subpopulation. These data provide definitive evidence that HA overproduction drives aerobic glycolysis via HBP-coupled HIF-1 signaling to evoke the metabolic responses required for CSC propagation and offer novel insights into the metabolic networks governing cancer cell stemness.

The results of this thesis indicate that HA overproduction modulated CSCs self-renewal via Twist and TGF- β -Snail signaling pathway. Alternatively, it also regulated CSCs maintenance through the switch of metabolic pathway to aerobic glycolysis and accelerates HBP flux. A more complete understanding of the mechanisms controlling how HA mediate the stemness of CSCs will be crucial to provides new opportunities for therapeutic intervention which improve the outcome of cancer patients. intervention which improve the outcome of cancer patients.

論文審査結果の要旨

本研究では、癌微小環境を構築している主要な細胞外マトリックス成分であり、かつ、癌進展との間に密接な関係が示唆されているヒアルロン酸に着目し、その合成異常とがん幹細胞性との関連について解明を試み以下の結果を得た。まず、ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌発症モデルマウスと対照マウスに発生した乳癌から乳癌細胞を樹立し、細胞表面における CD44 と CD24 の発現を指標に、がん幹細胞の割合をフローサイトメトリー解析により測定した。その結果、ヒアルロン酸を過剰産生する乳癌では、対照に比して CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞が増幅していることを明らかにした。さらに、Hoechst 33342 色素の排除能を指標に分離した Side population (SP) 細胞と非 SP 細胞を用いて、CD44 と CD24 の発現をフローサイトメトリー解析した結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来の SP 細胞中には、CD44^{high}/CD24^{low} がん幹細胞様細胞が濃縮されていることを明らかにした。次に、がん幹細胞性の指標であるスフェア形成能について検討し、ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来の SP 細胞は、対照の SP 細胞に比して、より高いスフェア形成能を示すことを明らかにした。ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来の SP 細胞と対照の SP 細胞をヌードマウスの乳腺脂肪帯に移植後、造腫瘍性を解析した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来の SP 細胞は、対照の SP 細胞に比して高い造腫瘍能を示した。以上の結果は、がん細胞におけるヒアルロン酸過剰産生が、癌幹細胞性の獲得に寄与していることを示唆している。

本研究ではさらに、がん細胞におけるヒアルロン酸依存的な上皮-間葉転換が、がん幹細胞性の獲得に働く可能性を検討した。まず、上皮細胞マーカー分子の E-カドヘリンの発現を免疫染色法により解析した。その結果、ヒアルロン酸の産生増加が、がん細胞に上皮-間葉転換を誘導することを明らかにした。また、上皮間葉転換に関連する分子の発現変化について、Beads array 法と qRT-PCR 法により解析した結果、ヒアルロン酸過剰産生乳癌由来のがん細胞では、上皮-間葉転換の制御因子である TNF- α 、TGF- β 、Snail および Twist の発現が亢進していることを明らかにした。さらに、これらの因子の活性や発現を抑制すると、がん細胞における上皮-間葉転換が減弱し、がん幹細胞様細胞が減少した。以上の結果は、ヒアルロン酸過剰産生が、がん細胞の上皮-間葉転換を誘導して、がん幹細胞性の獲得に働くことを示唆している。

がん幹細胞は、他の幹細胞と同様に、酸化的リン酸化から解糖系にエネルギー産生経路が変化していることが知られている。所属研究室では、質量分析により、がん細胞におけるヒアルロン酸合成の促進が、ヒアルロン酸合成基質である UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) の代謝経路 (HBP) の流束を増大し、解糖系を中心とする糖代謝プログラムを正に制御するという新事実を明らかにしている。そこで本研究では、解糖系のマスターレギュレーターである HIF-1 に着目し、その構成タンパク質の HIF-1 の安定化に HBP 代謝流束が働く可能性を検討した。まず、HBP の律速酵素であるフルクトース 6-リン酸アミド転移酵素 (GFAT) の活性や発現の調節が、HIF-1 の安定化と解糖系に及ぼす影響について、解糖酵素の発現や乳酸脱水素酵素の活性測定、そして乳酸産生量の測定により解析した。その結果、GFAT の過剰発現によって、ヒアルロン酸の過剰産生

と同様に HIF-1 の安定化と解糖系が促進されること、逆に、GFAT の活性を阻害すると HIF-1 の不安定化と解糖系が抑制されることを明らかにした。上述の解析により、ヒアルロン酸糖鎖が、従来考えられてきた細胞外シグナルとしての機能の他に、その合成反応と共役した細胞内糖代謝の調節機能を担っていることが強く示唆された。そして、薬理学的実験の結果、ヒアルロン酸過剰産生による糖代謝プログラミングが、がん幹細胞性の制御に働いていることが示唆された。

以上、得られた結果は何れも新規性があり、がん幹細胞性の制御機構を解明するうえで大変意義がある。そして、がん幹細胞性の制御におけるヒアルロン酸の役割を詳細に解明した研究は、本論文が初めての報告である。主査、副査の博士論文調査委員による論文審査の結果、論文全体の内容は論理的で良くまとめられていることから、調査委員全員一致で合格と判定された。また公聴会では、発表内容は論理的かつ明瞭にまとめられており、質疑応答に対してもほぼ的確に回答していた。

尚、本論文に関する内容は、国際専門雑誌である *Journal of Biological Chemistry*, 289: 26038-26056, 2014. に掲載され、当該学位申請者は、この内容で第 24 回日本がん転移学会学術集会において優秀ポスター賞の受賞している。

氏名（本籍）	佐々木 大樹（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第 24 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
論文題目	Study on genes for the onset of type 2 diabetes associated with obesity using new animal models
論文審査委員	主 査 松 卒 耕 三 教授 副 査 竹 内 実 教授 " 前 田 秋 彦 教授

論文内容の要旨

2 型糖尿病は、多因子性の疾患であり近年、世界中で患者数が増加し続けており、国際糖尿病連合 (IDE) の発表によると 2014 年現在の世界の糖尿病有病数は 3 億 8670 万人に上ると言われている。2 型糖尿病発症には、不規則な生活や、運動不足、高脂肪、高カロリーな食事などの環境要因と遺伝的要因が重要な要因である。特に肥満は、先進国などで大きな問題になっており、肥満人口の増加に伴い 2 型糖尿病患者数も増加の一途を辿っている。しかしながら、なぜ肥満になると 2 型糖尿病を発症しやすくなるのか、またその原因遺伝子は何なのかについては分かっていない。そこで本研究では、肥満に伴って 2 型糖尿病を発症する新規のモデル動物を開発し、肥満下において 2 型糖尿病を発症させうる 2 型糖尿病原因遺伝子の探索研究を行った。

本論文では、自然 2 型糖尿病発症モデル動物である OLTEF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットで発見された 14 の 2 型糖尿病原因遺伝子座の染色体第 14 番上に存在する *Nidd2/of* QTL 領域に注目し、解析を行った。*Nidd2/of* QTL 領域単一の影響を解析するために、正常ラット系統である F344 ラットに *Nidd2/of* QTL 領域を導入したシングルコンジェニック系統 (*F344-nidd2*) を作製した。さらに肥満下での *Nidd2/of* QTL 領域の作用を研究するために肥満遺伝子であるレプチン受容体欠損遺伝子 (*Lepr^{-/-}*) を F344 ラットに導入した肥満コントロールラット (*F344-fa*) を作製し、*F344-nidd2* と交配することによって、肥満で *Nidd2/of* QTL 領域を持つダブルコンジェニックラット (*F344-fa-nidd2*) を作製した。

作製した各コンジェニックラットを用いて表現系の解析を行った。*Nidd2/of* QTL 領域を導入した F344-*nidd2* と F344-*fa-nidd2* の体重は、それぞれのコントロールラットである F344 と F344-*fa* と比較して有意に軽い結果であった。しかし、それぞれの系統間での摂食量と Body Mass Index (BMI) には差が無かったことから、F344-*fa* ラットは F344-*fa-nidd2* ラットのコントロールとして利用出来ると判定された。耐糖能を調べるために経口糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test : OGTT) を行った。その結果、痩せ型である F344-*nidd2* と F344 との間には有意な血糖値の差は存在しなかった。しかしながら、肥満化させた F344-*fa-nidd2* と F344-*fa* との間には、糖負荷後 60 分以降、F344-*fa-nidd2* が有意に高い血糖値を示した。さらに糖負荷後 120 分の血糖値が F344-*fa* が約 160mg/dl と境界型糖尿病の値を示したのに対して、F344-*fa-nidd2* は約 230mg/dl であり糖尿病の基準である糖負荷後 120 分での血糖値が 200mg/dl を超えていた故に糖尿病であると判定した。次にインスリン抵抗性を調べるためにインスリン負荷試験 (Insulin Tolerance Test : ITT) と血中インスリン濃度測定を行った。その結果、痩せ型である F344-*nidd2* は F344 と比較して有意な差を示さなかった。しかしながら肥満コントロールである F344-*fa* は F344 と比較して有意なインスリン抵抗性を示し、肥満がインスリン抵抗性を惹起することが確認された。ところが F344-*fa-nidd2* は、F344-*fa* と比較して有意に高いインスリン抵抗性を示した。これらのことから肥満になるだけでも高血糖を示しインスリン抵抗性を惹起するが、肥満でさらに *Nidd2/of* QTL 領域を持つ F344-*fa-nidd2* は更なる異常な高血糖とインスリン抵抗性を示しその結果高血糖を招き、2 型糖尿病を発症していることが示された。このことから *Nidd2/of* QTL 領域内に肥満下において 2 型糖尿病を発症させる原因遺伝子の存在することが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

本論文構成は大きく二つに分けられている。第1部では新規糖尿病モデルラットの作製と維持、並びにそれらラットの表現型である、経時的な体重測定に始まり、糖負荷試験による血糖値、血中インスリン濃度測定、インスリン抵抗性試験等から構成されている。肥満遺伝子座と2型糖尿病遺伝子座の一つである Nidd2/of 遺伝子座の二つを正常ラット F344 に導入した、いわゆる肥満-糖尿病ラット (F344-fa-nidd2) とそのコントロールラットである肥満遺伝子座のみ導入した肥満ラット (F344-fa) の維持・作製には、肥満ラットは不妊のためヘテロで維持し、ホモを得る際はヘテロ同志の交配を行う必要がある。即ち、ヘテロとホモ接合体の選択が継代ごとに必要であり、さらにダブルコンジェニックのホモ個体は数十匹作成して1匹程度しか得られないことを考えると、実際は大変な作業であり、数千回におよぶ DNA 抽出、数万回に及ぶ遺伝子タイピングを行っている。申請者が正確な系統維持を数年にわたり継続してきた努力は、それ自体でその粘り強さ、研究に対する熱意として、十分評価するに値する。

さて、データの方を見てみると、正常ラットである F344 に肥満遺伝子(fa)を導入した F344-fa ラットは F344 に比較して糖負荷試験 (Oral glucose tolerant test: OGTT) で高い血糖値を示した。しかし、糖尿病ほど高くはなかった。しかし肥満と糖尿病遺伝子のダブルコンジェニック、F344-fa-nidd2 ラットは非常に高い糖負荷後血糖値を示した。しかも糖負荷後 120 分値は世界保健機構 (WHO) の糖尿病診断基準である 200 mg/dL を越えており、糖尿病と診断される。従って Nidd2 遺伝子座は肥満状態で非常に高い血糖値を示す糖尿病原因遺伝子を含んでいる事が示された。そのことは、糖尿病発症には肥満は重要であるが、それだけでは十分ではなく、糖尿病遺伝子の関与があって、はじめて糖尿病発症へと向かうことを明確に示した結果と云える。即ち、本論文により Nidd2 遺伝子座領域内に、本当の意味での、肥満に伴い、糖尿病を発症させる遺伝子のあることが示され、その意義は大きいと評価される。

一般に糖尿病は高血糖に先立ち、インスリン抵抗性が先に来ると考えられている。肥満になっただけでも非肥満ラットと比較して、非常に高い血中インスリン濃度を示している。実際、インスリン投与試験 (ITT) も行っており、その結果は単に肥満とするだけでもインスリン抵抗性となっていることを示している。そして、ダブルコンジェニックラットにおいては血中インスリン濃度は肥満コントロールラットよりもさらに有意に高く、ITT の結果はさらにインスリン抵抗性が有意に増していることを示している。従って、Nidd2 遺伝子座領域内にはインスリン抵抗性を引き起こす原因遺伝子の存在することが初めて示された。

本論文の後半、第2部では Nidd2 遺伝子座領域内にある遺伝子群のどの遺伝子が糖尿病発症に関与しているか、その遺伝子解析構成となっている。Nidd2 遺伝子座領域内、約 10 Mbp に約 90 の遺伝子が存在し、そのうち、肝臓内で発現している遺伝子約 60 遺伝子について、リアルタイム PCR 法にて肥満コントロールラット (F344-fa) と肥満-糖尿病遺伝子導入ダブルコンジェニックラ

ット(F344-fa-nidd2)におけるそれら各遺伝子の発現を比較検討している。肝臓を選んだ理由は肝臓が糖制御の要であり、また、インスリン抵抗性にもっとも大きく関与するからである。その結果、5個の遺伝子発現が有意差を示した。即ち、Abcg313, Hpse, Mapk10, Coq2, Plac8の各遺伝子である。その5個の遺伝子発現について、さらに詳細な検討を加えている。それは表現型のところですでに述べられているように、非肥満ラットであるF344ならびにF344-nidd2ラット間では血糖値もインスリン抵抗性もほぼ同じく正常であり、それは空腹時も糖負荷後も変わらなかったこと、一方、肥満系統である肥満コントロールラットと肥満-糖尿病遺伝子導入ラット間では糖負荷後血糖値、血中インスリン濃度に関しては空腹時と糖負荷後共にダブルコンジェニックラットの方が有意に肥満コントロールラットよりも高い値であったこと、また、インスリン抵抗性も両者で違いのあることから、その表現型にマッチする遺伝子発現をしている遺伝子が本当の原因遺伝子となり得る。実際、申請者はそのような解析をおこなっている。即ち肥満コントロールラットと肥満-糖尿病遺伝子導入ダブルコンジェニックラット間での遺伝子発現で、非肥満ラットではその発現に表現型上差異が無いので、遺伝子発現においても差異の無い遺伝子で、かつ、肥満状態で差異の生じているような遺伝子を捜せば良いことになる。

その結果、Abcg313, Hpse, Mapk10 遺伝子は非肥満状態でもそれら遺伝子発現に有意な差を生じていた。すなわち、肥満特異的では無いと云うことになり、それらは原因候補遺伝子から外されている。一方、Coq2 と Plac8 遺伝子は非肥満系統間では遺伝子発現上の有意差は認められなく、しかも肥満系統間では、Coq2 は空腹時と糖負荷後双方の遺伝子発現に有意差があり、血中インスリン濃度の表現型に良く対応しており、肥満特異的な原因候補遺伝子であると結論している。他方、Plac8 は非肥満系統間では有意差は無く、肥満状態で、糖負荷後において有意な差が認められた。興味あることに、Plac8 は空腹時では差を示さず、糖負荷後にのみ差異を示すことから、血糖値における表現型に良くマッチしている。いずれにせよ、Coq2 遺伝子と Plac8 遺伝子は肥満特異的発現を示した。さらに Coq2 と Plac8 の発現は Western blot によるタンパク質レベルでも確認され、mRNA 発現レベルとほぼ同じ傾向を示した。これらの結果から申請者は、Coq2 と Plac8 が肥満に伴い糖尿病を発症させる原因遺伝子の最有力候補であると結論している。

Discussion で触れられているが、Coq2 はコエンザイム Q10 形成に必須の遺伝子であり、その発現低下は各種効能がうたわれているコエンザイム Q10 形成を抑えることにつながり、そのことがインスリン抵抗性に関連しているかもしれないと推定している。一方、Nidd2 領域にある Plac8 は 5' 上流域(-419)に特殊なコンセンサス領域があり、コントロールの F344-fa は G であり、OLETF 由来糖尿病遺伝子を持つダブルコンジェニックラット(F344-fa-nidd2)では A となっている。興味深いことに調べた他の全ての系統では G であった。発現に絡む領域なので、血糖値発現にも関与している可能性があるかと推定している。

以上の内容は Mammalian Genome (2015) 26:619-629, DOI 10.1007/s00335-015-9597-4 に、申請者の筆頭著者名で掲載済みであり、欧州糖尿病学会、日本糖尿病・肥満学会、日本実験動物学会、日本肥満学会においても発表された。主査、副査による博士論文本調査委員による論文

本審査において、内容的に良く絞り込まれており、肥満に伴う糖尿病原因遺伝子として初めての報告であり、その意義も大きいことから、調査委員全員一致で合格と判定され、博士論文として、十分に値すると判定された。それを受けて、博士論文発表の公聴会が行われ、審査員全員一致で佐々木大樹君の論文を博士論文に値するとして、合格とする。

氏名（本籍）	スンタンスイット ジーラワット Soonthornsit Jeerawat（タイ）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第25号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Analysis of the molecular mechanisms maintaining the higher order structure of the Golgi apparatus （ゴルジ体の高次構造を維持する分子機構の解析）
論文審査委員	主 査 中村 暢宏 教授 副 査 永田 和宏 教授 " 川根 公樹 教授

論文内容の要旨

ゴルジ体は膜に囲まれた細胞小器官であり、分泌経路の細胞小器官へのタンパク質や脂質の輸送に必須の役割を果たしている。ゴルジ体は分極した層板構造をもち、この構造は翻訳後修飾や積荷分子の分別配送に重要な役割を果たしていると考えられている。ゴルジ体の構造は高度に動的であり、管状や球状の輸送小胞の出入りのバランスの上で保たれている。これらの輸送小胞によって様々な積み荷分子がゴルジ体の層板を通して運ばれている。哺乳類細胞では、ゴルジ体層板が繋がって中心体付近でリボン状の構造を形成している。この構造は、タンパク質の極性輸送に重要であることが提唱されている。しかしながら、リボン状構造維持の機構はあまり理解されていない。本論文では、ゴルジ体リボン構造形成の分子機構を理解するために、二つのアプローチから研究を行った。一つ目は、低 pH 処理でのゴルジ体分散機構の解析であり、二つ目は、ゴルジ体に局在する複数回膜貫通タンパク質の機能解析である。

第1章では、一つ目のアプローチの研究結果を記した。低 pH の培地で処理すると、ゴルジ体のシス、中間、トランスのすべての槽が分散するが、全てのコンパートメントは分離したままであった。低 pH 処理開始後初期にはシスゴルジのマーカが管状構造物に観察されたが、中間及びトランスゴルジのマーカはこの構造物には観察されなかった。コントロール培地に戻すと、ゴルジ体の構造は完全に回復した。低 pH 処理は、ゴルジ体の構造だけでなく機能も変化させ、

VSV-G tsO45GFP タンパク質の正方向の輸送が有意に阻害された。ゴルジ体の分散はゴルジ体からの管状構造物形成に働く PLA₂ に対するアンタゴニストである ONO-RS-082 (ONO) と Bromoenol lactone (BEL) によって顕著に阻害された。また、輸送小胞の融合に働くと考えられている Rab1 の発現によっても阻害された。これらの結果は、低 pH 処理によるゴルジ体の分散が PLA₂ や Rab1 によって調節されていることを示唆している。

第 2 章では、二つ目のアプローチの研究結果を記した。これまでに、ゴルジ体に 5 回膜貫通タンパク質である YIPF が局在しており、ゴルジ体のリボン構造維持に関わっていることが示されている。本研究では、YIPF1, YIPF2 及び YIPF6 の局在と機能の解析を行った。これらのタンパク質は、主として中間、トランスゴルジ及び TGN に共局在しており、低 pH 処理によってこれらのコンパートメントのマーカーと共に局在変化した。YIPF6 の発現抑制は YIP1 と YIP2 の安定性に影響を及ぼした。驚くべきことに、YIP1, YIP2 あるいは YIP6 の発現抑制によって低 pH 処理による中間及びトランスゴルジの分散が抑制された。一方、YIPF1 あるいは YIPF2 の発現抑制によって糖タンパク質の合成が低下した。これらの結果は、YIPF1, YIPF2 及び YIPF6 が低 pH 処理による中間及びトランスゴルジの分散に関与していること、また、これらのタンパク質のバランスがゴルジ体での糖タンパク質合成に重要であることを示唆した。

以上のことから本論文は、低 pH 処理がゴルジ体の高次構造維持機構を解析する新しいツールとであることを提案し、さらに、低 pH 処理下で PLA₂, YIPF1, YIP2 及び YIPF6 がゴルジ体分散を引き起こすこと、また Rab1 がそれに拮抗することを示した。

論文審査結果の要旨

ゴルジ体は小胞輸送経路の中心に位置する細胞小器官であり、分泌タンパク質や膜タンパク質の修飾と選別配送を担っている。タンパク質の選別配送は、細胞の極性獲得や運動方向の決定に必須であり、ゴルジ体の形態変化は、分泌タンパク質や膜タンパク質の修飾や選別配送に大きな影響を与えることが明らかになりつつある。学位申請者は、このゴルジ体の形態維持と動態の分子機構を相互に関連する2つの戦略から研究した。本論文はこの研究成果をまとめたものであり、2章に分かれている。第1章(Chapter 1)では、細胞外 pH の変化によるゴルジ体分散の分子機構の解析について、第2章(Chapter 2)では、ゴルジ体に局在する複数回膜貫通タンパク質のゴルジ体の構造・機能への役割の解析についてまとめている。

本論文の最も注目すべき点は、ゴルジ体の構造やその動態が細胞外 pH の変化によって急速に変化することを発見したことである(第1章)。短時間(15分)の低 pH 処理によってゴルジ体が急速に解体分散することは、地味であるが誇るべき世界初の発見である。本論文では、さらにこのゴルジ体分散の分子機構にアプローチし、分散過程にホスホリパーゼ A2 が促進的に、Rab1 などのゴルジ体に局在する小型 G タンパク質が抑制的に働くことも明らかにしている。細胞外環境の pH の低下は、アシドーシスとも呼ばれ、細胞運動や増殖などで局所的に呼吸過多が起きた場合、生理的な状況下でも一過性に頻繁に生じる現象である。特にがん組織周辺においては、血流の不足からアシドーシスが生じることが報告されてる。従って、本研究の研究成果は、アシドーシス環境下での細胞の機能的変化を理解し、その制御法を開発する上で有用な新規知見である。

第2章では、ゴルジ体に局在する複数回膜貫通タンパク質群 YIPFs の機能解析の結果を報告している。YIPFs は、第1章でも取り扱った Rab1 などの小型 G タンパク質との相互作用が報告されているタンパク質群である。この章の新規な点は、YIPFs の中で未解析であった YIPF1, YIPF2, YIPF6 がともにゴルジ体のトランス側に局在することを明らかにしたこと、また、これらの遺伝子が、第1章でも取り扱った低 pH 処理で誘導されるゴルジ体の分散に促進的に働いていることが示唆されたことである。YIPFs の機能を明らかにするという点では未完成であるが、今後の研究の鍵となる重要な発見であり、第1章と合わせて、ゴルジ体の構造維持と動態を明らかにするという目的に対して、十分な研究成果を報告できているといえる。以上のことから、本論文は博士の学位授与に十分な質を備えていると判断された。

申請者に口頭諮問を行った結果、学位論文の内容について十分に考察されており、研究を主導的に行ったことが明確に認められた。さらに、本博士論文の第1章の内容は、所属研究室の研究者達との共同研究としてまとめられ、申請者を筆頭著者として国際的に著名な研究雑誌

Experimental Cell Research に 2014 年に受理，出版されており，これが参考論文として提出されている。加えて，同研究内容について，2014 年度には細胞生物学会でポスター発表を，また生化学会関西支部会で口頭発表を行っている。

予備審査において，一部の実験結果の定量性についての指摘や，図（写真）の追加，図の提示方法の工夫，文章の工夫についての軽微な修正が指示されたが，それらの点全てについて修正が施されていた。修正点を含めて本調査を行ったところ，博士の学位論文としてふさわしいものに仕上がっていることが確認された。以上の審査結果を踏まえ，主査 1 名，副査 2 名で合議した結果，本論文は，京都産業大学博士（生物工学）の学位授与にふさわしいものであると結論した。

氏名（本籍）	上野 信洋（滋賀県）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	乙工第7号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Studies on Fibroblast Growth Factor Receptor 3 IIIc in Esophageal cancer. （食道がんのFGFR3 IIIcに関する研究）
論文審査委員	主 査 瀬尾 美鈴 教授 副 査 中田 博 教授 " 佐藤 賢一 教授

論文内容の要旨

線維芽細胞増殖因子(FGF)とその受容体(FGFR)は、細胞増殖、分化、遊走、生存など多彩な生理作用を制御している。FGFはヒトでは22種類の異なる遺伝子に、FGFRは4種類の異なる遺伝子にコードされている(FGFR1~FGFR4)。FGFRは細胞外に3個の免疫グロブリン様ドメイン(Ig)、細胞膜貫通部位、細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ。FGFがFGFRの2番目と3番目のIgに結合すると、FGFRの自己リン酸化が誘導され細胞内にシグナルが伝達される。FGFR1からFGFR3のN末端から3番目のIgは異なったエクソンIIIbとIIIcにコードされており、組織特異的な選択的スプライシングによりIIIbアイソフォームまたはIIIcアイソフォームを生じる。IIIbアイソフォームは主に上皮系細胞に発現し、IIIcアイソフォームは主に間葉系細胞に発現している。

さまざまながんにおいて線維芽細胞増殖因子(FGF)とその受容体(FGFR)の変異、発現異常はがん悪性化に関与している。脳腫瘍においてFGFR1のキナーゼドメインの点変異により恒常的に活性化し、膵臓がんにおいてはFGFR2IIIcの発現上昇が、がん細胞の細胞増殖を亢進することが報告されている。FGFR3の変異や発現上昇は主に多発性骨髄腫、大腸がん、膀胱がんの悪性化に関与していることが報告されており、様々ながんにおいてFGFR3は分子標的薬のターゲット分子として期待されている。日本における食道がん患者の90%以上は扁平上皮がんである。食道がんの生存率は他の消化器系がん(胃がん:約60%、大腸がん:約70%)と比較して30%と低く、

効果的な治療薬の開発が必要である。

本論文において、未だ報告されていない食道がん患者のがん組織における FGFR 選択的スプライシングアイソフォームの発現異常について検証した。食道がん患者の非がん性粘膜とがん部位の凍結試料を用いて RT-PCR 法により FGFR の mRNA 発現頻度を比較した。その結果、非がん性粘膜において FGFR3IIIc の mRNA 発現頻度が 38% (6 例/16 例) に対してがん部位で 75% (12 例/16 例) を示し、がん部位は非がん性粘膜と比較して FGFR3IIIc の mRNA 発現頻度が 2 倍上昇していた。一方、FGFR3IIIb の mRNA 発現頻度は非がん性粘膜で 69% (11 例/16 例)、がん部位で 75% (12 例/16 例) を示し、がん部位と非がん性粘膜における FGFR3IIIb の mRNA 発現頻度はほぼ同程度を示した。また、他の FGFR アイソフォーム (FGFR1IIIb, FGFR1IIIc, FGFR2IIIb, FGFR2IIIc および FGFR4) の発現頻度は非がん性粘膜とがん部位とで差は認められなかった。食道がんにおける FGFR3IIIc 発現頻度の上昇が他の消化器系がんにおいても生じるかどうか検証するため、大腸がん (18 例) および胃がん患者 (15 例) の凍結試料を用いて FGFR3IIIc 発現について同様に検証した。しかし、大腸がんおよび胃がんのがん部位において、非がん性粘膜と比較して FGFR3IIIc 発現頻度の上昇は認められなかったことから、消化器系がんの中で食道がんのみにおいて FGFR3IIIc の発現頻度が上昇していることが示唆された。大腸がんにおいてがん部位における FGFR3IIIb の発現頻度 (11 例/18 例, 61%) が非がん性粘膜 (5 例/18 例, 28%) と比較して上昇していたことから、大腸がんにおいて FGFR3IIIb の発現は大腸がんの悪性化に関与している可能性が示唆された。

食道がん患者のがん細胞で FGFR3IIIc が実際に発現しているかどうかを明らかにするため、食道がん患者由来のがん組織パラフィン切片を用いて FGFR3IIIc 特異的モノクローナル抗体による免疫染色法で、FGFR3IIIc の発現を検討した。その結果、stage0 のがん組織において SCC-112 (扁平上皮がん細胞マーカー) 陽性細胞に FGFR3IIIc の発現が認められたことから、がん細胞が FGFR3IIIc を発現していることが示された。また、stageIA, stageIB, stageIIB および stageIIIA のがん組織においてもがん細胞に特異的に FGFR3IIIc の発現が認められた。さらに、FGFR3IIIc を発現する細胞は細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性であったことから、FGFR3IIIc は細胞増殖能を亢進することにより、がんの悪性化を促進している可能性が示唆された。FGFR3IIIc 発現が食道がんにおける細胞増殖能の亢進に貢献している可能性について、食道がん細胞株 EC-GI-10 を用いた遺伝子強制発現実験により検証した。FGFR3 の非翻訳領域を標的とした siRNA を用いて EC-GI-10 細胞の内在性 FGFR3 をノックダウンすることにより (siFGFR3 細胞)、sicontrol 処置群と比較して細胞増殖能が約 25% 抑制されたことから、食道がんの細胞増殖能に FGFR3 が関与している可能性が示唆された。また、siFGFR3 細胞に FGFR3IIIb (FGFR3IIIb 細胞) または FGFR3IIIc (FGFR3IIIc 細胞) を強制発現させ、それぞれのアイソフォームの細胞増殖能の亢進作用について検討した。FGFR3IIIc 細胞の細胞増殖能は、siFGFR3 細胞と比較して有意に亢進したが (約 1.4 倍)、FGFR3IIIb 細胞の細胞増殖能の亢進は認められなかった。食道がん患者のがん部位および EC-GI-10 細胞で FGFR3IIIc 特異的なリガンドである FGF2 の mRNA 発現が確認されたことから、

FGFR3IIIc 細胞の細胞増殖能の亢進は FGF2 などの FGFR3IIIc 特異的に結合する FGF のオートク
ライン効果である可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、消化器系がんの中でも特に予後の悪い食道がんにおいて線維芽細胞増殖因子受容体 FGFR3IIIc アイソフォームが高い頻度で発現すること、および FGFR3IIIc アイソフォームが食道がん細胞の増殖を促進することを示した。これらの知見は、がん化過程において細胞の増殖を制御する遺伝子の選択的スプライシングが変化することにより、正常では入力されない増殖シグナルが細胞に入り、正常上皮細胞ががん化し細胞増殖が活性化されることについて分子レベルでの機序を説明する興味深い知見である。また、FGFR3IIIc が食道がんの細胞増殖に関わるドライバー遺伝子として働き、創薬のターゲットおよび診断マーカーとして有望であることも示しており、がん治療の新しい治療薬としても期待できることをも示す研究成果である。

以下、本論文の審査過程について記す。1月20日開催された研究科会議において本調査の開始が承認された。その後、2月3日に主査、副査2名により論文調査に関わる協議を行った結果、主査と副査1名は合格、副査1名は不合格と判定した。合格とした主査、副査のポイントは、がんの治療と診断を目的とする研究において、1)がんの分子標的の発見と分子標的薬の開発は最重要課題である、2)様々ながん腫別の標的分子を同定することは、がんの早期発見につながり、副作用の少ない抗がん剤の開発に役立つ、3)本論文は、上記の目標につながる重要な発見を含むとの観点から、本論文は博士論文としての条件を満たしていると判定した。一方、不合格とする意見は、1)用いた実験方法では研究成果の検証が十分に行えていない、2)実験データの解釈が不十分である、3) 実験データの分量と掘り下げ度が十分ではない、の3点に基づくものであった。1)については、PCR 産物の電気泳動写真の全体像を掲載していないこと、FGFR3IIIc だけではなく、FGFR3IIIb についての特異的抗体を用いたタンパク質発現の検証が必要である等の主張であった。また、3)については、本論文で分子標的とした FGFR3IIIc がなぜ食道がん細胞の増殖を促進するのか、その分子メカニズムすなわち細胞内シグナル伝達について追加の解明を求めるものであった。

3者間の協議では、合意に至らなかったため、2月4日に開催された研究科長、大学院委員、主査を含む主任会議構成員による会議で新たに2名の追加調査委員を決定し、博士論文の調査を依頼した。2月12日に、研究科長の司会により、主査、副査2名、大学院委員と2名の追加調査委員を含む協議会を開催した。1名の調査委員は研究成果の意義を認め合格とした、もう1名の調査委員は、主に研究の手法とデータ解釈の正当性についての説明を求めたが、合否判定については協議会の結果に委ねるものとした。主査、2名の副査からもこれまでの調査に基づく意見が付された。協議会の議論においては、本論文はがん診断・治療に関わる新規でかつ重要な知見を得ている一方で、研究手法および一部のデータ解釈に改善の余地があった。協議会では、本論文をもって公聴会に臨むこと、また、論文を修正した上で再度、予備調査から審査を行うことの可能性について議論したが、最終判断は主査に委ねられた。主査は申請者との相談の結果、公聴会に進み審査を受けることとし、その旨を大学院委員に報告した。

2月18日に開催された公聴会で申請者は、食道がんの早期発見と治療を目的として、腫瘍マーカー分子の同定およびそれを分子標的としたがん治療の可能性についての研究成果を発表した。この発表に対して、主に研究方法とデータに関して結論を導き出すまでの過程に関する質問があった。これらの質問に対して、申請者は、研究の背景と目的、さらに採用した実験方法とそれから得られたデータ、また補足的な実験結果なども含めて、導き出した結論の妥当性について適切に説明した。発表後の専攻会議において投票により合否判定が行われ、賛成多数で本論文は合格と判定された。また、同日行われた英語の学力試験においても、博士として十分な英語の学力を持つと判断された。

以上の結果から、本論文は博士学位を受けるに十分な内容を持つものと判定された。