

# 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><br>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><br>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）  | オントン パーワレッド<br>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<br>（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<br>副 査 竹内 実 教授<br>" 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<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> 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- $\beta$ ), and induction of the EMT-related transcriptional factors Snail and Twist. Inhibition of TGF- $\beta$ -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- $\beta$ -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 $\alpha$  stability and glycolytic program. Conversely, inhibition of GFAT-1 significantly decreased HIF-1 $\alpha$  stability in HA-overproducing cancer cells. Pharmacological inhibition of HIF-1 $\alpha$  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- $\beta$ -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<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> 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<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> 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- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、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。