

# 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）	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、U87MG 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 ( $\Delta$ 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 ( $\Delta$ 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 ( $\Delta$ 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、 $\Delta$ 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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。