

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）	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。