

審査の結果の要旨

氏名 西田 純

本研究は腎細胞がんの悪性形質制御機構を明らかにするため、ヒト腎がん細胞をヌードマウスの腎被膜下に同所性移植する系を応用して解析を試みたものであり、腎細胞がん進展における TGF- $\beta$  シグナル関連分子の役割と腫瘍内在性炎症の役割に関して、それぞれ下記の結果を得ている。

第一章では腎がん細胞における TGF- $\beta$  シグナルの意義に着目し、TGF- $\beta$  III 型受容体 TGFBR3 の機能に関して下記の結果を得ている。

1. 臨床検体に関する大規模データベースの再解析により、進行した腎細胞がんにおいて TGFBR3 の発現が低下していること、ならびに発現低下が患者予後不良と関連していることが示された。
2. TGFBR3 をレンチウイルスベクターにて腎がん細胞に過剰発現あるいはノックダウンした細胞を樹立し、マウス腎被膜下に同所性移植することで、TGFBR3 が原発腫瘍抑制因子として働くことが示された。また TGFBR3 のノックダウンによって、自然肺転移が亢進することが示された。
3. ウェスタンブロットによる Smad2/3 のリン酸化ならびにレポーターアッセイによる Smad シグナルの活性評価によって TGFBR3 の過剰発現あるいはノックダウンによって、TGF- $\beta$ 2 シグナルの活性が上昇あるいは低下することが示された。また TGF- $\beta$  シグナルは、腎がん細胞の足場非依存的増殖を抑制するが、TGFBR3 低発現細胞では TGF- $\beta$ 2 刺激によっても足場非依存的増殖が低下しないことが示された。
4. TGF- $\beta$ 2-TGFBR3 シグナルの下流で制御されている遺伝子を RNA-sequencing 法によって探索し、ALDH1A1 の発現制御と、それに伴う ALDH 活性制御を担うことが示された。またセルソーターにて、腎がん細胞から ALDH 高活性群と低活性群を分取して解析を行うことで、前者が自己複製能ならびに分化能を有すること、またマウス腎被膜下への同所性移植実験から、前者が高い腫瘍形成能を有することが示され、ALDH 高活性細胞が cancer-initiating cell 様の性質を持つことが考えられた。
5. Chamber migration assay ならびに wound healing assay の結果より、腎がん細胞では TGFBR3 のノックダウンによって細胞運動能が亢進することが示された。また TGF- $\beta$ I 型受容体阻害剤 SB431542 の投与実験によって、この機構には TGF- $\beta$  非依存的経路も関与していることが示唆された。細胞の形態学的解析から TGFBR3 の発現低下に伴う細胞運動には葉状仮足形成の亢進と、それに伴う運動方向の変化が関与することが示

唆された。またウエスタンブロットや形態学的解析から、TGFBR3 の発現低下に伴う葉状仮足形成の亢進には FAK-PI3K-Akt シグナルが関与している可能性が考えられた。

第二章では腎がん細胞における腫瘍内在性炎症の意義とその制御機構に関して下記の結果を得ている。

1. Luciferase 遺伝子と mCherry 遺伝子を発現させたヒト腎がん細胞をマウス腎被膜下に繰り返し同所性移植することで、新規に腎がん高悪性株を樹立した。この株は親株と比較して、移植されたヌードマウスの生存期間を有意に短縮し、原発腫瘍ならびに転移性肺腫瘍の形成能が亢進していることから、高悪性株として妥当であることが示された。
2. 組織学的解析から、腎がん高悪性株を移植したヌードマウスの原発腫瘍ならびに肺においては CD11b 陽性 Ly-6G 陽性の好中球様の細胞が高度に浸潤していることが示された。高悪性株移植マウスに対して、抗 Ly-6G 抗体を用いて好中球を除去することで、自然肺転移能が有意に低下することが示された。このことから、高悪性株随伴マウスにおいて、好中球は腎がん細胞の自然肺転移を促進することが示唆された。また免疫組織染色ならびに好中球養子移入実験により、腎細胞がん肺転移を促進する好中球の作用として、原発腫瘍中の血管新生ならびに肺生着時の関与が考えられた。
3. 親株と高悪性株の遺伝子発現の比較検討を行なうため RNA-sequencing を行ない、Gene Ontology を解析することで、炎症応答に関連するオントロジーの上昇が示された。また好中球遊走因子として知られる CXCL1, 2, 5, 8 等の複数の炎症関連因子の発現亢進が示され、GSEA 解析やウエスタンブロットによって高悪性株における NF- $\kappa$ B シグナルの亢進が示された。
4. H3K27ac の ChIP-sequencing によって親株と高悪性株の活性化エンハンサーを比較することで、CXCL8 のエンハンサー領域におけるスーパーエンハンサーの活性亢進が確認された。この傾向は BRD4 の結合領域に関する解析によっても同様であることから、BET 阻害剤 JQ1 を投与することで CXCL8 の発現変動を評価し、近傍にコードされた CXCL1, 2, 5, 8 のいずれに関しても発現が低下することが示された。
5. BET 阻害剤 JQ1 を用いて高悪性株移植マウスに対する治療効果を検討し、自然肺転移の低下傾向、原発腫瘍中の好中球の減少、ならびに原発腫瘍中の微小血管の減少が観察された。したがって、JQ1 が腎がん高悪性株の自然肺転移を抑制する機序の一部として、好中球を介した転移促進機構を阻害している可能性が考えられた。

以上、本論文は腎がん同所性移植系を用いた悪性形質制御機構の解析から、TGFBR3 の発現低下が腫瘍形成能、細胞運動能を亢進させる分子機構、ならびに高悪性腎がんにおける好中球を介した肺転移促進機構とスーパーエンハンサーによる制御機構、BET 阻害剤 JQ1 による治療可能性に関してその一端を明らかにした。本研究は腎細胞がんの新規診断、治療法を確立する上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。