

博士論文

膵癌における HIF 活性化分子 Mint3  
の機能解析

金森 茜

# 要旨

膵癌は、がんによる死亡原因の第4位であり、5年生存率が6%前後と極めて低く致死的な癌である。Mint3 はがん細胞や炎症性マクロファージなど限られた細胞でのみ HIF を活性化する分子であり、乳癌細胞などで腫瘍形成能を促進していることが知られているが、膵癌での機能は分かっていない。そこで本研究では、膵癌で Mint3 の機能を解析し、膵癌の治療標的になりうるか評価することを目的とした。

まず、膵癌細胞において Mint3 をノックダウンしたところ、G0/G1 期で細胞周期停止していることが明らかとなった。その原因としてユビキチンリガーゼ SKP2 の mRNA 低下が認められ、その結果、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21 と p27 のタンパクが増加していることから細胞周期停止を引き起こしていることが示唆された。また、その経路を調べたところ、Mint3 は FIH-1 の抑制を介して HIF-1 依存的に SKP2 の発現を制御していることが示された。

次に、Mint3 の癌悪性化への寄与を調べたところ、Mint3 ノックダウンにより Slug などの EMT マーカーの低下が認められ、それに付随して幹細胞性の低下と抗がん剤感受性の向上が認められた。そこで、Mint3 の造腫瘍能への影響を調べるために、

Mint3 ノックダウン細胞を免疫不全マウスに移植したところ、コントロール細胞に対して有意に腫瘍の重量が小さくなることが明らかとなった。また、そのパラフィン切片を解析したところ、Mint3 ノックダウン細胞を移植した組織において SKP2 陽性領域の減少や、p21 と p27 陽性領域の増加、EMT マーカー陽性領域の減少が認められた。さらに、マウス膵癌同所移植モデルにおいても、Mint3 ノックダウン細胞移植群において、Gemcitabine と Paclitaxel への感受性が向上した。

最後に、ヒト膵癌のデータセットを解析したところ、Mint3 発現が高いほどに予後不良であることが明らかとなった。以上の結果から、Mint3 は膵癌において SKP2 を制御することで EMT や、幹細胞性、抗がん剤抵抗性を引き起こし、癌の悪性化に寄与していることから、膵癌治療の標的分子となりうることが示唆された。

## 略語一覧

ATP	adenosine triphosphate
APBA3	amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member3
APP	Amyloid precursor protein
cDNA	complementary DNA
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EMT	Epithelial-Mesenchymal transition
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
HIF	Hypoxia inducible factor
HRE	Hypoxia response element
Mint3	Munc18-1-interacting protein 3
mRNA	messenger RNA
MT1-MMP	Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PHD	prolyl hydroxylase domain
PVDF	polyvinylidene difluoride
pVHL	von Hippel-Lindau タンパク
RT-PCR	Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCF	Skp1-Cullin-1-Fox
shRNA	short-hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SKP2	S-phase kinase associated protein2
STS	Staurosporine
TBS	Tris buffered saline

## 目次

1	序文.....	6
1.1	膵癌.....	6
1.2	低酸素誘導性因子 (HIF-1) .....	10
1.3	HIF-1 活性化分子 Mint3.....	14
1.4	ユビキチンリガーゼ S-phase Kinase Associated Protein2 (SKP2) .....	16
1.5	本研究の目的 .....	19
2	実験方法 .....	20
2.1	細胞培養 .....	20
2.2	ウイルス作製法.....	20
2.3	安定的ノックダウン実験.....	21
2.4	安定的発現実験.....	22
2.5	誘導発現実験 .....	22
2.6	siRNA 実験.....	23
2.7	ウェスタンブロット .....	24
2.8	RNA 抽出、逆転写、リアルタイム RT-PCR.....	26
2.9	細胞周期測定 .....	27
2.10	細胞増殖アッセイ.....	28
2.11	スフィアフォーメーションアッセイ.....	28
2.12	抗がん剤感受性実験 .....	29
2.13	免疫沈降 .....	29
2.14	膵がん同所移植.....	29
2.15	抗がん剤治療モデル .....	30
2.16	凍結切片の免疫染色 .....	30
2.17	パラフィン包埋標本作製.....	31
2.18	レポーターアッセイ .....	32
2.19	統計処理 .....	34
3	結果.....	35
3.1	マウス膵癌で HIF-1 $\alpha$ は通常酸素下か緩やかな低酸素下に局在する .....	35
3.2	Mint3 ノックダウンは膵癌細胞の細胞周期を停止させる .....	37
3.3	Mint3 ノックダウンは、膵癌細胞に CDK インヒビター-p21、p27 のタンパクレベルの増加を引き起こす .....	40
3.4	Mint3 は SKP2 発現を促進することで p21 と p27 を分解し、膵癌細胞の細胞増殖を亢進する .....	45
3.5	Mint3 は HIF-1 抑制を通して細胞周期を促進する.....	52

3.6	HIF-1 抑制は SKP2 を抑制し p21 と p27 の発現を増加させる .....	57
3.7	Mint3 ノックダウンは EMT マーカーを抑制する.....	65
3.8	Mint3 ノックダウンは膵癌細胞の幹細胞性を抑制し、抗がん剤感受性を増加させる ...	70
3.9	Mint3 ノックダウンは膵臓同所移植モデルの造腫瘍能を抑制する .....	79
3.10	Mint3 ノックダウンは膵臓同所移植モデルの抗がん剤感受性を増加する .....	83
3.11	ヒト膵癌では Mint3 発現が高いほどに予後不良である .....	85
4	考察.....	87
4.1	Mint3 による膵癌特異的な細胞周期制御.....	87
4.2	Mint3 は膵癌細胞で SKP2 の発現を促進し、p21 と p 27 タンパクを分解する.....	88
4.3	Mint3 による HIF-1 を介した SKP2 の転写制御.....	89
4.4	Mint3 ノックダウンは EMT マーカーを抑制 .....	90
4.5	Mint3 ノックダウンは膵癌の抗がん剤感受性を増加する .....	91
4.6	Mint3 ノックダウンは膵臓同所移植モデルの造腫瘍能を抑制する .....	91
4.7	Mint3 の治療標的としての可能性 .....	92
5	総括.....	96
6	参考資料.....	97
	謝辞 .....	103

## 1 序文

### 1.1 膵癌

膵管腺癌 (PDAC) は致死的な癌の 1 つで、日本における癌による死亡原因の第 4 位である[1]。日本やアメリカにおける PDAC の 5 年生存率は近年わずかに上昇したものの、6%前後と依然として低いままである[2, 3]。目立った予兆のないこと、早期発見の診断方法が少ないことから、PDAC が発見されたときには進行したステージであることが少なくない。また、PDAC は発症や転移の機序が未だに解明されていないことから、有効な化学療法が少なく、早急に有効な治療薬の開発が必要とされている。

膵臓 (図 1.1.1a) は消化酵素を分泌する外分泌部 (図 1.1.1b、c) とインスリンやグルカゴンなどのホルモンを分泌する内分泌部 (図 1.1.1d) に分けられる。外分泌部の腺房で作られた消化酵素は導管を通過して十二指腸へ運ばれるが、膵癌のほとんどはこの導管細胞に起因するとされている。膵癌の危険因子としては、加齢、喫煙、過度な飲酒、肥満、糖尿病、慢性膵炎などが挙げられる[4]。遺伝要因との関連では、膵癌患者の親族はリスクが増加すると報告されており、膵癌患者の 10%に見られる[5]。近年、膵癌の発症・進行・診断・治療に関する分子生物学的な知見が多く発表されてきた。ほとんどの膵癌患者は 1 つ以上の遺伝子変異を持つとされている。最も多いのが、*KRAS* の活性型変異で、患者の 90%以上が持つとされている。

膵癌は、悪性形質転換の初期に *KRAS* が変異し、発がん、進行、維持に大きく寄与していると考えられている。正常な膵臓は、発癌の初期に *KRAS* 変異を得て、がん抑制遺伝子である *TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* などの不活化変異や欠損が加わり、膵臓上皮内腫瘍性病変（pancreatic intraepithelial neoplasia: PanIN）が出現する。さらに異形成段階が進行すると、基底膜を越えて浸潤癌となるという多段階発癌をする（図 1.1.2） [6, 7]。ここ十数年でこのような主要な遺伝子変異と形質転換に関して研究されてきたが、膵癌の発症、転移、放射線、化学療法抵抗性のメカニズムはまだ未解明である。また、近年の研究において、線維化、間質反応、腫瘍微小環境、免疫反応、血管新生に関する知見は、臨床研究に大きく貢献してきたにもかかわらず、多くの膵癌治療の臨床研究第 3 相試験は失敗に終わっているのが現状であり [8]、早急に膵癌の発症、進行、転移、治療への抵抗性の分子レベルでのメカニズムの解明が必要である。



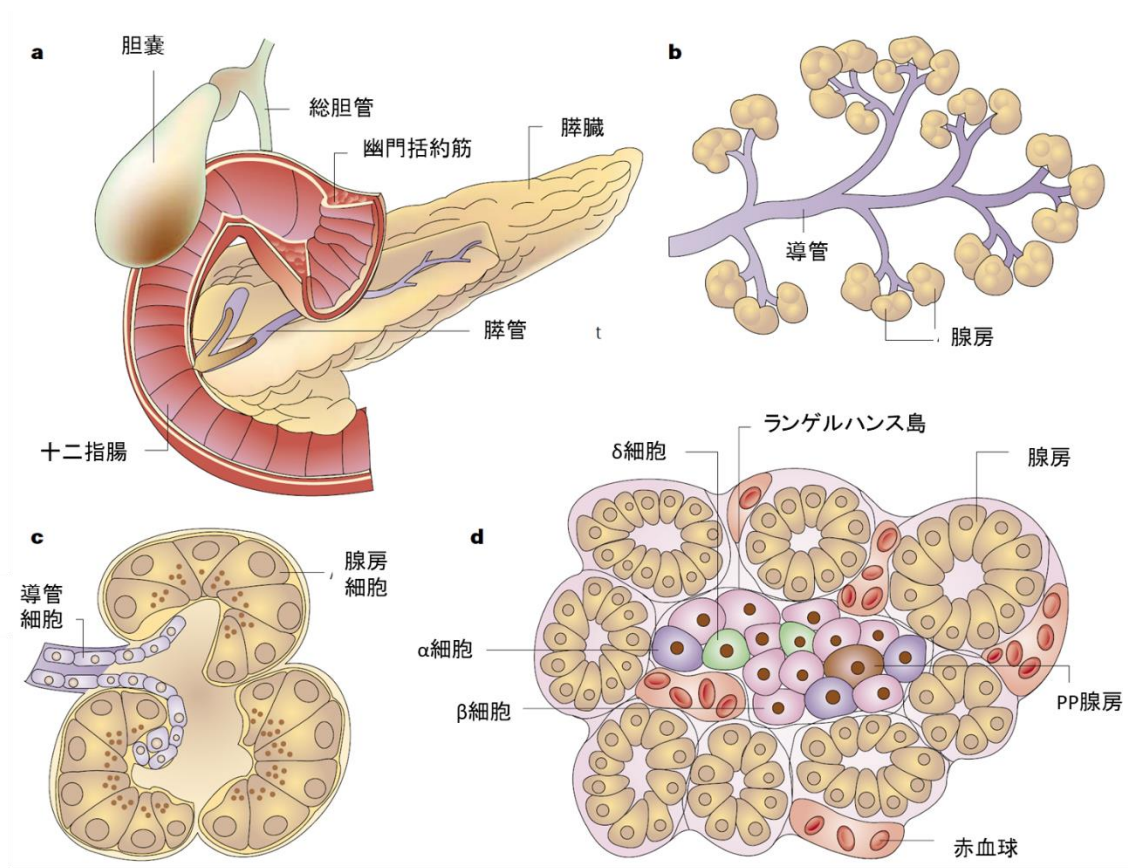


図 1.1.1 膵臓 (文献 7 を改変)

(a) 膵臓 (b) 外分泌腺。ぶどうの房のような形状をしている。(c) 外分泌腺の細胞。膵癌の多くはこの導管細胞が由来である。(d) 外分泌腺と内分泌腺。

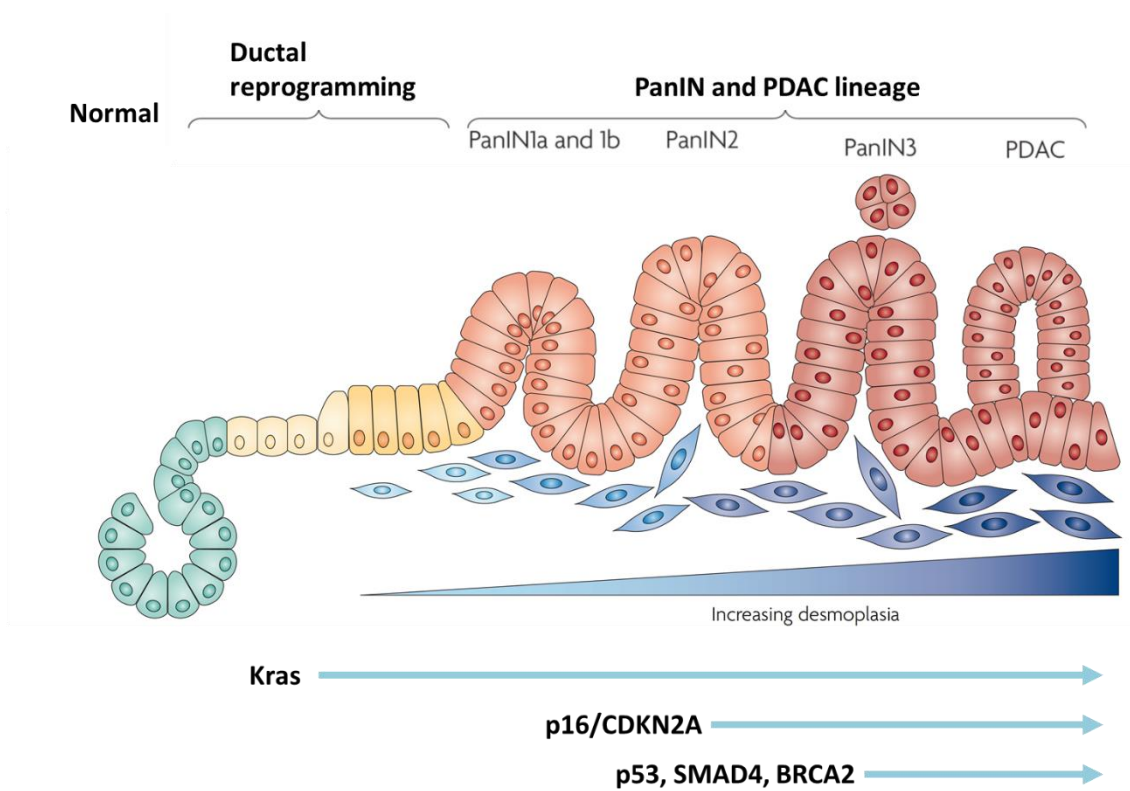


図 1.1.2 膵癌の進行と遺伝子変異（文献 6 を改変）

正常細胞が *KRAS*、*CDKN2A*、*TP53*、*SMAD4* などの遺伝子変異が蓄積するにつれて前駆病変（PanIN）が増え、異形成の段階が進行し膵癌（PDAC）へと移行する。

## 1.2 低酸素誘導性因子 (HIF-1)

低酸素誘導性因子 (Hypoxia inducible factor, HIF-1) は膵癌を含めてさまざまな癌において過剰発現しており、予後不良と相関することが示唆されて[9, 10]おり、膵癌の治療標的として近年注目を集めている。固形腫瘍内において無秩序な細胞増殖や不完全な血管新生によって低酸素領域が存在する。このような領域では、低酸素ストレスに適合するマスター因子として HIF-1 が活性化し、さまざまな遺伝子を発現することで癌の転移や悪性化、再発、治療への抵抗性に関わることが知られている[11, 12]。

HIF は N 末端側に DNA との結合に関わる basic helix-loop-helix (bHLH) 領域と Per-ARNT-Sim homology (PAS) 領域を持つ bHLH/PAS ファミリーに属する転写因子であり、 $\alpha$  サブユニット (HIF $\alpha$ ) と  $\beta$  サブユニット (HIF $\beta$ ) からなるヘテロ二量体である。 $\alpha$  サブユニットは HIF-1 に加え HIF-2 と HIF-3 があり、酸素依存的に制御される[13–15]。一方、 $\beta$  サブユニットは恒常的に発現している。サブユニットの中でも、HIF-1 と HIF-2 の解析が進んでいるが、特に HIF-1 と癌に関する報告が多くされている[16]。

HIF-1 $\alpha$  の C 末端領域には、N-terminal trans-activation domain (N-TAD)、C-terminal trans-activation domain (C-TAD) の転写因子としての機能不活性化に関わる 2 つのドメインを持つ。HIF-1 $\alpha$  は酸素依存的に分解と転写不活性化の制御を受ける。

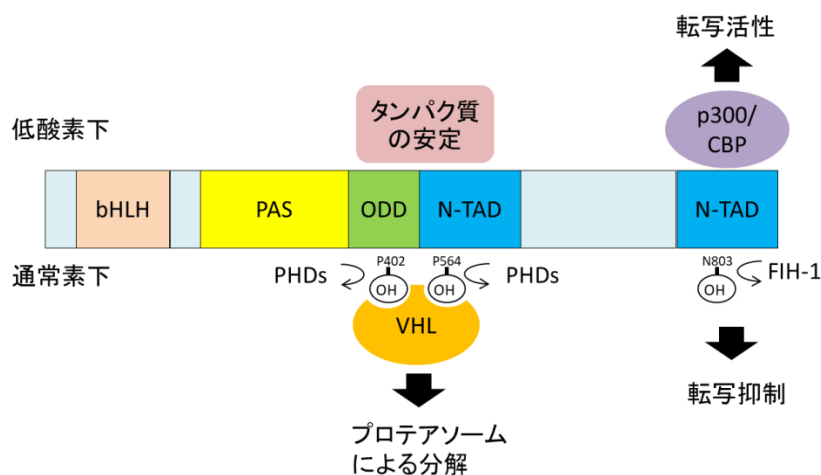
HIF-1 $\alpha$  の分解による制御は、酸素依存的なプロリン水酸化酵素 prolyl hydroxylase domain (PHD)によって担われている。通常酸素下では HIF-1 $\alpha$  の Oxygen-dependent degradation (ODD) ドメイン内にある 402 番目のプロリン残基と N-TAD の 564 番目のプロリン残基が、PHD により酸素依存的に水酸化されると、von Hippel-Lindau タンパク (pVHL) を含む E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されることにより、HIF-1 $\alpha$  タンパクはプロテアソームにより速やかに分解される。低酸素下では、PHD の酵素活性が低下するため、HIF-1 $\alpha$  は安定化し、HIF-1 $\beta$  とヘテロ二量体を形成し、転写活性を有する。一方、転写活性の制御はアスパラギン水酸化酵素 Factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) によって行われている。HIF-1  $\alpha$  の C-TAD 内にある 803 番目のアスパラギン残基が酸素依存的に FIH-1 によって水酸化されるとヒストンアセチル化酵素複合体である p300/CBP (CREB-binding protein)が HIF-1 に結合できなくなるため、HIF-1 の転写活性が抑制される[17](図 1.2.1)。

近年、HIF-1 は低酸素だけでなく、増殖因子や癌遺伝子によっても活性化することが報告されている[18]。しかし、低酸素以外の刺激による HIF-1 の活性化やそれによる HIF-1 の標的遺伝子はまだまだあまり調べられておらず、分かっていないことが多い。Vaupel らは、50~60%の癌は低酸素領域を持たないと報告している[19]。Sobhanifar らはヒトの腫瘍検体やマウスのゼノグラフモデルについて、低酸素領域が染色されるピモニダゾール染色を行い、ピモニダゾールが染色される 1-2%酸素

濃度ではがん細胞はネクローシスを起こして HIF-1 は染色されず、むしろそれより酸素濃度が高い血管に近い領域で HIF-1 が染色されると報告している (図 1.2.2) [20]。また、所属研究室での先行実験において、ヒト膵癌細胞 AsPC-1 細胞の同所移植切片を解析したところ、ピモニダゾール陽性部位には増殖マーカー Ki67 陽性細胞が少なかった (図 1.2.3)。以上のことから、膵癌における HIF-1 は厳しい低酸素下より、むしろがん細胞の増殖が盛んな通常酸素または緩やかな低酸素領域で機能していることが示唆される。Kuschel らは HIF-1 に関する多くの論文が、低酸素での HIF-1 の発現とその標的遺伝子に関するもので、通常酸素下での HIF-1 の制御やその標的遺伝子についてはほとんど調べられていないことを述べており [21]、通常酸素下での HIF-1 の発現やその効果についてはさらなる解析が必要である。

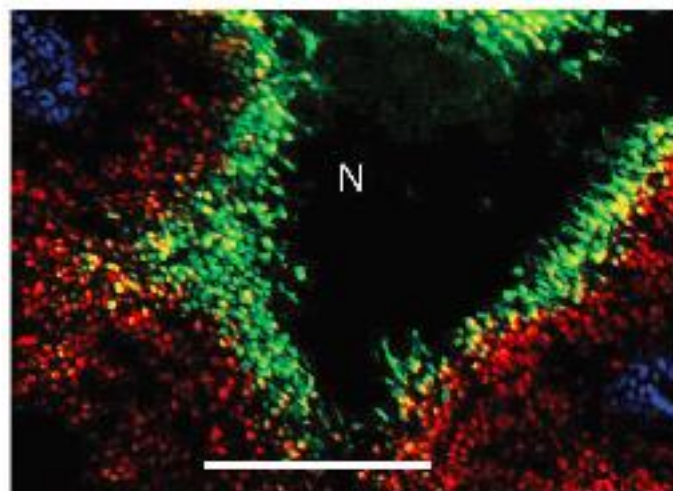
ここ 20 年間で多くの HIF-1 の阻害剤が開発されてきたが、HIF-1 の mRNA やタンパクを直接阻害したり、 $\alpha$  と  $\beta$  のサブユニットの二量体形成の阻害や、コアクチベーターとの相互作用を阻害したりするものも一部あるが、ほとんどが HIF-1 に間接的に作用するものや HIF-1 阻害以外の多様な活性を持つものであり特異性が低い [22]。また、HIF-1 のノックアウトマウスは胎生致死 [23] であり、HIF-1 は正常な臓器の発生や維持に必要な分子である [24] ことから HIF-1 を標的とした治療薬の有害事象も多く報告されている [25]。以上の理由から、現在臨床的に承認されている HIF-1 を標的とした薬はまだなく、癌特異的に HIF-1 を抑制する分子標的薬の開

発が必要とされている。



### 図 1.2.1 酸素依存的な HIF-1 $\alpha$ の制御

通常酸素下において 402 番目と 564 番目のプロリン残基が PHD に水酸化されることにより、プロテアソームで分解され、803 番目のアスパラギン残基が FIH-1 によって水酸化されることで p300/CBP との結合ができなくなり、転写が抑制される。



### 図 1.2.2 低酸素領域で HIF-1 は発現しない (文献 20 より)

SiHa 細胞のゼノグラフト。ピモニダゾールを投与 90 分後、血管を染色するために Hoechst33342 を投与し、10 分後に腫瘍を摘出した。凍結切片を HIF-1 の抗体で染色した。HIF-1 (赤)、ピモニダゾール (緑)、Hoechst33342 (青; 血管)。N:ネクロシス領域。

Ki67 Pimonidazole Hoechst33342

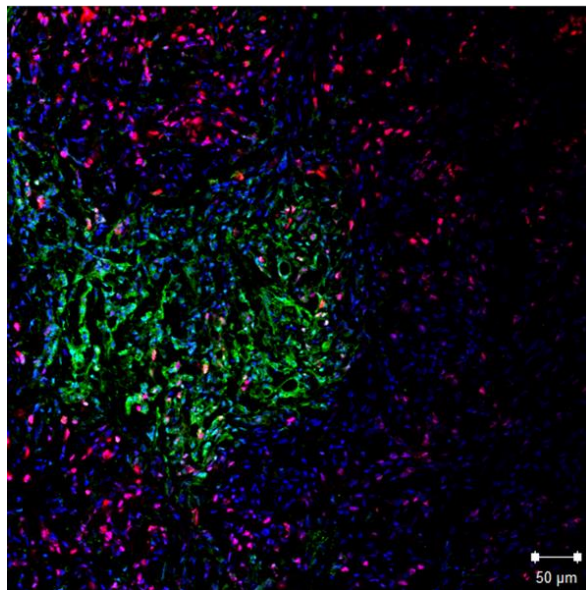


図 1.2.3 膵癌の低酸素領域と細胞増殖（坂本毅治博士らによる先行実験より）  
ヒト膵癌 AsPC-1 細胞のゼノグラフト。ピモニダゾールを投与 90 分後、腫瘍を摘出した。  
凍結切片を抗 Ki67 抗体で染色した。Ki67（赤）、ピモニダゾール（緑）、Hoechst33342（核）  
（青）。

### 1.3 HIF-1 活性化分子 Mint3

Munc18-1-interacting protein 3（Mint3）は別名 amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member3（遺伝子名: *APBA3*）とも言われる。Mint3 は X11 ファミリータンパクに属し、リン酸化チロシンの結合サイトと C 末端に 2 つの PDZ ドメインを持つのに対して、N 末端側は特に知られたモチーフを持たない。Mint3 の C 末端側はアミロイド前駆タンパク（Amyloid precursor protein: APP）や Furin など膜貫通タンパクの細胞内ドメインに結合するアダプタータンパク質と報告されており、APP などの輸送、エンドサイトーシス、代謝に関わるとされている[26, 27]。一方、所属研究室において、N 末端領域の Mint3 は FIH-1 と結合し、膜型マトリッ

クスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の細胞質側末端と協調して FIH-1 を抑制することで間接的に HIF-1 を活性化すると報告している(図 1.3)[28]。

Mint3 の N 末端領域は HIF-1 $\alpha$  と競合的に FIH-1 に結合することで、FIH-1 による HIF-1 $\alpha$  の水酸化を抑制し、HIF-1 $\alpha$  の活性化を行う[28]。Mint3 自体はユビキタスに発現する分子であるが、正常と癌の mRNA 発現を比較すると、いくつかの癌では発現が若干高いことが報告されている[29]。Mint3 による FIH-1 の抑制には MT1-MMP が必要であるため、Mint3 による HIF-1 の活性化は MT1-MMP の発現している一部の癌細胞やマクロファージでのみ起こる[28]。また、Mint3 ノックアウトマウスは、明らかな組織異常や寿命に変化が見られず[30]、マクロファージで HIF-1 活性低下により解糖系を介した ATP 産生が低下すること以外に組織や臓器に大きな影響はない[31]ことから、癌の治療標的となることが期待される。

先行研究において、乳癌や線維肉腫細胞において Mint3 ノックダウンすると腫瘍の成長が抑制されることが報告されている[29, 32, 33]。また、癌細胞以外では、癌間質に含まれる線維芽細胞の Mint3 をノックダウンすると乳癌や類表皮癌での腫瘍形成が抑制されること[34]、Mint3 が炎症性単球の機能を制御することで転移性ニッチの形成に関わる[35]ことなどが報告されており、Mint3 阻害による癌治療への応用が期待されている。



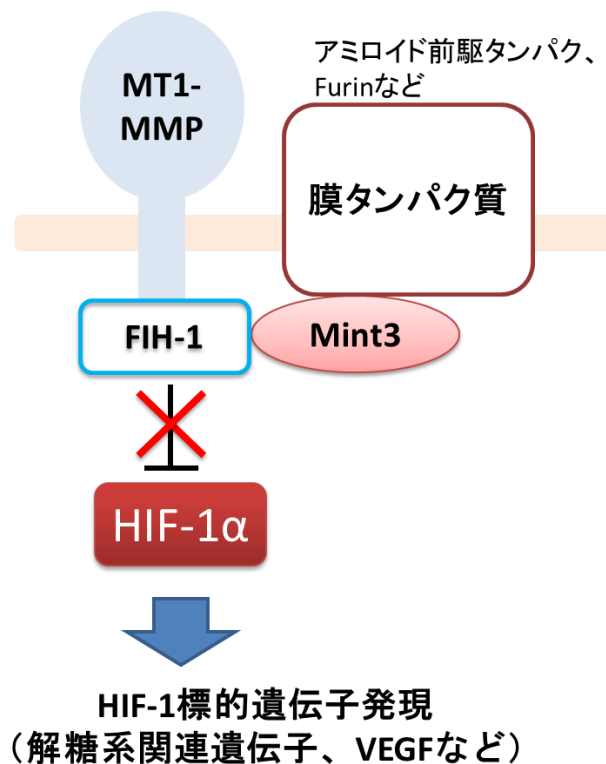


図 1.3 Mint3 による HIF-1 の活性化

Mint3 による FIH-1 結合には MT1-MMP が必要である。Mint3 が FIH-1 に結合すると、FIH-1 は HIF-1 $\alpha$  を水酸化できず、HIF-1 $\alpha$  の転写活性を抑制できない。結果として、通常酸素下でも HIF-1 は転写活性を保持し、HIF-1 標的遺伝子の発現が亢進する。

#### 1.4 ユビキチンリガーゼ S-phase Kinase Associated Protein2 (SKP2)

ユビキチンは 76 アミノ酸からなるタンパクで、真核生物において種を越えてよく保存されている。ユビキチン化はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の 3 つの酵素反応を通してユビキチンが基質のリジン残基にユビキチンの C 末端のグリシンをイソペプチド結合する反応である。一般に、ユビキチン結合酵素はユビキチン修飾の種類を、ユビキチンリガーゼは基質特異性を決定する。これまでにヒトゲノムでは 2 つの E1 と 50 の E2、600

の E3 が報告されている[36]。ユビキチンには7つのリジン (K) 残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) があり、これらのリジンと末端のメチオニンを介した8種類の結合様式のユビキチン鎖が形成される[37]。多様なユビキチン鎖の中でも K48 を介して形成されたポリユビキチン鎖は最も重要な役割を果たしていると考えられており、プロテアソームによるタンパク分解を誘導するシグナルである。ユビキチンの結合による機能はユビキチン-プロテアソーム経路だけではなく、K63 を介して形成されたポリユビキチンはエンドサイトーシス、DNA 修復、アポトーシス、転写制御などに関わるとされている[38]。

S-phase Kinase Associated Protein2 (SKP2) は SCF (Skp1-Cullin-1-Fox) ユビキチンリガーゼ複合体を構成する、F-box ファミリータンパクに属する E3 ユビキチンリガーゼである(図 1.4)。SKP2 は基質である p21 や p27 タンパクを認識し、UBC (E2 ユビキチン結合酵素) により基質をユビキチン化させ、分解に導くことが知られている[39, 40]。SKP2 の基質はこのほかに p57[41]、E2F-1[42]、p130[43]、Tob1[44]、CyclinD[40]など細胞周期に関わるタンパクがあり、これらのタンパク質の分解をすることで細胞増殖を制御する。細胞周期関連タンパク質以外にも、アポトーシス制御因子である Myc[45]、Foxo1[46]や、DNA 複製因子である Orc1p[47]、Cdt1[48]なども SKP2 の基質である。また、K48 を介したポリユビキチン化による分解のほか、SKP2 は K63 を介して Akt をユビキチン化することで Akt の活性化に関わり解

糖系を促進する[49]ことや、Eithelial-Mesenchymal transition (EMT)に関わる因子である Twist の安定化に関わる[50]とされる。

SKP2 の発現は、膵癌においては phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)や NF-κB などによって活性化されることが報告されている[51, 52]。SKP2 は多くのヒトの癌において過剰発現が報告され、がん遺伝子として働く[53, 54]。PDAC においては、過剰発現し、組織学的な癌のグレードやリンパ節への転移、予後不良との相関が報告されている[54, 55]。また、SKP2 抑制は乳癌においてハーセプチンの感受性を高める[49]、肺癌においてパクリタキセルの感受性を高める[56]、前立腺癌においてドキソルビシンやパクリタキセルの感受性を高める[50]ことから、抗がん剤との併用としての治療への応用が期待されている。

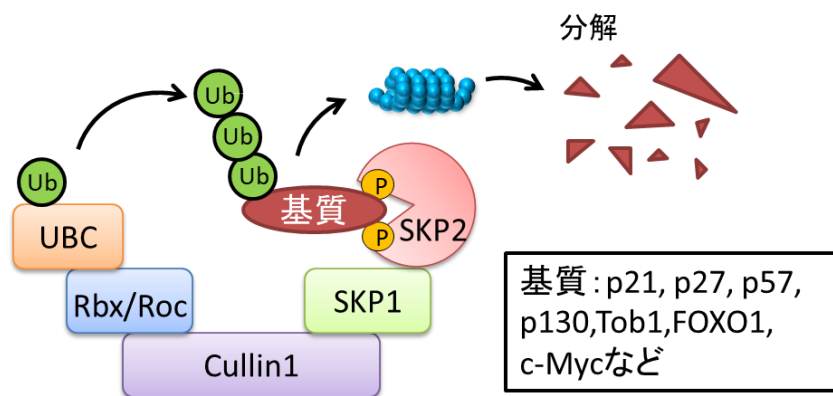


図 1.4 SCF<sup>SKP2</sup> 複合体の構成

SCF E3 ユビキチンリガーゼ複合体は Skp2、Rbx、Cullin1 と変動する F-box タンパクで構成される。

## 1.5 本研究の目的

膵癌は現在のところ外科的な治療以外の有効な治療方法が少なく、また発症や悪性化のメカニズムが分かっていないことから、早急に発症や悪性化のメカニズムの解明や新しい治療法の開発が必要である。先行研究において、乳癌細胞や線維肉腫細胞において、Mint3 をノックダウンすることで腫瘍形成能が抑制されることが明らかにされており[32, 33]、膵癌においても治療の標的になることが期待されている。しかしながら、膵癌における Mint3 の役割や癌化や癌悪性化における分子機構は明らかになっておらず、本研究では Mint3 の *in vitro* および *in vivo* での役割を解明することを目的とした。

## 2 実験方法

### 2.1 細胞培養

ヒト膵癌細胞株 AsPC-1 と BxPC-3, PANC-1, MIA PaCa-2 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入し、RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) に 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific 社)、100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Thermo Fisher Scientific 社) を添加して、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

ヒト膵臓腺房細胞は、Kerafast 社 (Boston, MA, USA) から購入し、Keratinocyte SFM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) に 50 mg/L Bovine Pituitary Extract と 5 µg/L EGF、100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Thermo Fisher Scientific 社) を添加して、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

ウイルス作製のための 293FT 細胞は Thermo Fisher Scientific 社から購入し、DMEM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社)、10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific 社)、100 units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Thermo Fisher Scientific 社) を添加した培地で、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

### 2.2 ウィルス作製法

安定的に発現する細胞株に感染させるウイルスは 293FT を用いて、ノックダウ

ンでは pLenti6/BLOCK-iT™-DEST Gateway Vector Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を、過剰発現系では ViraPower™ Lentiviral Directional TOPO® Expression Kit (Thermo Fisher Scientific 社) のプロトコルに沿って作製した。細胞の感染には 2 µg/mL ポリブレン (Sigma-Aldrich 社、St. Louis、MO) を添加した培地を使用した。ウィルス感染後、Blasticidin (AsPC-1 と MDA-MB-231 細胞; 20 µg/mL、それ以外の細胞; 10 µg/mL) (科研製薬、東京) もしくは G418 (AsPC-1 細胞; 2 mg/mL) (Sigma-Aldrich 社) を含む培地によるセレクションを行った。

### 2.3 安定的ノックダウン実験

本研究で用いた shRNA 配列を表 1 に示す。1 本鎖オリゴ DNA はユーロフィンジエノミクス (東京) で購入し、200 µM の濃度になるようにオリゴアニーリングバッファー[10 mM Tris-HCl (pH.8.0) , 1 mM EDTA (pH8.0) , 100mM NaCl]で希釈し、95°Cで 5 分加熱後、室温になるまで静置することで 2 本鎖 DNA を得た。次に pENTR/U6 TOPO vector (Thermo Fisher Scientific 社) にメーカーのプロトコルに沿ってサブクローニングされ、Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific 社) を使用してレンチウィルスベクター pLenti6 BLOCK iT (Thermo Fisher Scientific 社) にプロトコルに沿って組み換えた。

表 1 shRNA の配列

目的遺伝子	配列
shLacZ	5'- GCTACACAAATCAGCGATTTGAAAAATCGCTGATTTGTGTAG-3'
shMint3 #1	5'- CCGACTGTTGCAGCCCCCTGACGAATCAGGGGGCTGCAACAGTCGG-3'
shMint3 #2	5'- GCGGTTCTTGGTCCTGTATGACGAATCATA CAGGACCAAGAACCGC -3'
shHIF-1 $\alpha$ #1	5'- GGGATTAACTCAGTTTGAAC TCGAAAGTTCAA ACTGAGTTAATCCC-3'
shHIF-1 $\alpha$ #2	5'- GCTGGAGACACAATCATATCTCGAAAGATATGATTGTGTCTCCAGC-3'
shSKP2 #1	5'- GCGAGCAGCTCTGCAGTTAATCGAAATTA ACTGCAGAGCTGCTCGC-3'
shSKP2 #2	5'- GGAAACGGCTGAAGAGCAAAGCGAACTTTGCTCTTCAGCCGTTTCC-3'
shSKP2 #3	5'- GCTGAGGTTCTTAAGGTTACTCGAAAGTAACCTTAAGAACCTCAGC-3'

## 2.4 安定的発現実験

Mint3 再発現実験における WT Mint3、MUT Mint3 のベクターは所属研究室の先行研究において作製された[28, 32]ものを使用した。

## 2.5 誘導発現実験

FIH-1 の誘導系発現ベクターの構築は PCR 法に基づいて行われた。AsPC-1 細胞から RNeasy mini kit (QIAGEN 社、Hilden、ドイツ)を用いて RNA 抽出し、SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific 社) を使用して逆転写することで得られた cDNA を以下のプライマーを用いて EcoRI/BamHI の制限酵素サイトを伴って増幅した。プライマー、F: 5'-CCCTCGTAAAGAATTCATGGCGGCGACAGCGGCGGA-3'、R: 5'-GAGGTGGTCTGGATCCCTAGTTGTATCGGCCCTTGA-3'。

FIH-1 の cDNA は pGEM-T easy vector (Promega 社、Fitchburg、WI、USA) にサ

ブクローニングした。その後、制限酵素処理により、pRetroX-TetOne vector (タカラバイオ社、滋賀) に移し換えた。

安定的に細胞に発現させるためには Retro-X™ Universal Packaging System (タカラバイオ社) を使用してメーカーのプロトコルに沿って行った。細胞の感染には 2 µg/mL ポリブレン (Sigma-Aldrich 社) を添加した培地を使用した。ウィルス感染後、1 µg/mL puromycin を含む培地によるセレクションを行った。

発現の誘導には 100 ng/mL の Doxycyclin を用い、24-48 時間誘導を行った。

## 2.6 siRNA 実験

siRNA による一過性のノックダウンには  $1 \times 10^5$  cells / 6 well plate を前日に播種し、翌日、OptiMEM と最終濃度 20 pmol の siRNA と Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific 社) の混合液を添加して培養した。トランスフェクションから 5 日後にウェスタンブロットやリアルタイム PCR を行った。ターゲット配列は以下のとおり (表 2.6)。

表 2.6 siRNA のターゲット配列

siRNA	ターゲット配列
siLuc	5'-GAUCUACUGGUCUGCCUAA-3'
siGFP	5'-AUCCGCGCGAUAGUACGUA-3'
siMint3 #1	5'- GAUGGAACUUGAUGAGUCA-3'
siMint3 #2	5'-GGGAGGUGCACCUCGAGAA-3'
siMint3 #3	5'-GGUUCUUGGUCCUGUAUGA-3'



siFIH-1#1	5'-GCCAAUUUCCAGAACUUUA-3'
siFIH-1#2	5'-GUAUUGCACGCGUCACUUA-3'
siHIF-1a #1	5'-CAAAGUUCACCUGAGCCUAUU-3'
siHIF-1a #2	5'-GAUUAACUCAGUUUGAACUUU-3'
siSKP2#1	5'-GACCUAUCGAACUCAGUUA-3'
siSKP2#2	5'-GUGAUUGUCCGCGAGGCCUA-3'

## 2.7 ウェスタンブロット

細胞を lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、1% NP-40]で溶解し、15,000 rpm で 10 分間、4°Cで遠心分離を行い、上清を回収した。細胞抽出液のタンパク濃度はブラッドフォードプロテインアッセイ (Bio-rad 社、Hercules、CA、USA) を用いて Bradford 法により測定した。濃度調整した細胞抽出液に 4×SDS sample buffer [0.2 M Tris-HCl (pH 6.8) , 40% glycerol, 8% SDS, 0.04% BPB, 20% β-ME ]を加え 95°Cで 10 分間煮沸することで試料とした。その後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、セミドライ方式でゲルから PVDF メンブレン (Millipore 社、Burlington、MA、USA) にブロッティングを行った。その後、メンブレンを 5%スキムミルクが入った TBST [25 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 ]中で室温にて 1 時間振とうすることでブロッキングを行った。メンブレンは Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution1 (TOYOBO、大阪) に希釈した 1 次抗体と 4°Cで一晩反応させ、TBST で 10 分×3 回洗浄後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution2 で希釈した HRP 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反

応させた。メンブレンを TBST で洗浄後、ECL prime (GE Helthcare、Boston、MA、USA) または ECL select (GE Helthcare) を加え化学発光を LAS4000 mini (GE Helthcare) で検出した。ウェスタンブロッティングに使用した抗体を以下に示す (表 2.7)。

表 2.7 使用したウェスタンブロット抗体

抗原	抗体種	メーカー	カタログ 番号	希釈倍率
SKP2	Rabbit	Abcam	ab19877	1/500
HIF-1 $\alpha$	rabbit	Abcam	ab1	1/500
Mint3	mouse	BD Biosciences	611380	1/1000
Caspase-3	rabbit	CST	9664	1/500
Cleaved caspase-3	rabbit	CST	9665	1/500
PARP	rabbit	CST	9542	1/500
Cleaved PARP	rabbit	CST	5625	1/500
Caspase-9	mouse	CST	9508	1/500
Cleaved caspase-9	rabbit	CST	7237	1/500
Caspase-7	rabbit	CST	12827	1/500
Cleaved caspase-7	rabbit	CST	8434	1/500
Phospho histon H3	rabbit	CST	3377	1/1000
Cyclin D1 (p2G2)	rabbit	CST	2978	1/500
CyclinE2	rabbit	CST	4132	1/500
CDK4 (D9G3E)	rabbit	CST	12790	1/500
CDK6 (DCS83)	mouse	CST	3136	1/500
p21	rabbit	CST	2947P	1/500
p27	rabbit	CST	3686	1/500
PCNA	mouse	Santa Cruz	sc-56	1/1000
FIH-1	Goat	Santa Cruz	Sc-26219	1/500
$\beta$ -Actin	Mouse	富士フイルム和 光純薬社	0111-24554	1/1000
E-cadherin	mouse	BD Biosciences	#610181	1/1000
N-cadherin	rabbit	CST	13316	1/1000

Slug	rabbit	CST	9585	1/1000
TWIST		Novus	NBP2-37364	1/1000
Vimentin	rabbit	CST	5741	1/1000
Snail	rabbit	CST	3879	1/500
TCF8/ZEB1	rabbit	CST	3396	1/1000
K48-linkage Specific Polyubiquitin	rabbit	CST	8081	1/1000
K63-linkage specific polyubiquitin	rabbit	CST	5621	1/1000
V5	mouse	Thermo Fisher Scientific	R960-25	1/1000
Anti-rabbit IgG, HRP linked whole Ab	Donkey	GE Helthcare	NA934V	1/3000
Anti-mouse IgG, HRP- linked whole Ab	Sheep	GE Helthcare	NA931V	1/3000
Anti-Goat IgG HRP antibody	rabbit	Sigma	A5420	1/5000

※表中のメーカー情報は以下の通り。

Abcam 社 (Cambridge, UK)、BD Biosciences 社 (Franklin Lakes, NJ, USA)、Cell Signaling Technology (CST) 社 (Danvers, MA, USA)、富士フイルム和光純薬社 (大阪)、Santa Cruz 社 (Santa Cruz, CA, USA)

## 2.8 RNA 抽出、逆転写、リアルタイム RT-PCR

Total RNA の抽出には RNeasy mini kit (QIAGEN 社) を使用した。抽出した RNA を鋳型に ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) および表 2.8 に示す特異的プライマーを用いて、Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) でメーカーのプロトコルに従って

リアルタイム PCR を行った。内在性のコントロールには *ACTB* を用いた。

表 2.8 定量 RT-PCR に用いたプライマー配列

遺伝子名	Forward primer	Reverse Primer
ACTB	TTCTACAATGAGCTGCGTGTG	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
SKP2	CTTTACTATTAGTGACAAGAGCTGG	TGGCTGGACTTGAGTTTGG
CDKN1A (p21)	TCAGGGGAGCAGGCTGAA	TGGTAGAAATCTGTCATGCTGGT
CDKN1B (p27)	GCTAACTCTGAGGACACGCA	GAAGAATCGTCGGTTGCAGGT
HIF-1 $\alpha$	ATCCATGTGACCATGAGGAAATG	CTCGGCTAGTTAGGGTACACTT
VEGFA	CTCCACCATGCCAAGTGGTC	ACTCCTGGAAGATGTCCACC
PDK1	TCCTGTCACCAGCCAGAATG	CTTCCTTTGCCTTTTCCACC
E-cadherin	CAATGCCGCCATCGCTTACACCAT	TCAGCAGCTTGAACCACCAGGGTA
N-cadherin	AGGCTTCTGGTAAAATCGCA	TGCAGTTGCTAAACTTCACATTG
vimentin	GACGCCATCAACACCGAGTT	CTTTGTGCTTGGTTAGCTGGT
ZEB1	GGGCCTGAAGCTCAGGCAGATGA	CTCTGGTCTCTTCAGGTGCCTC
ZEB2	AGAAGCCACGATCCAGACCGCAATTA	GGTAAATAATGGCTGTGCTACTGCGC
Snail	CCAGTGCCTCGACCACTATG	CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA
Slug	ATGCATATTCGGACCCACACATTA	AGATTTGACCTGTCTGCAAATGCTC
Twist	TCCATGTCCGCGTCCCCTA	ATTCAAAGAAACAGGGCGTG
OCT4	GGGGTTCTATTTGGGAAGGTAT	GCCGCAGCTTACACATGTTC
SOX2	GAACCAGCGCATGGACAGTT	TCATGCTGTAGCTGCCGTTG
Nanog	GGTGGAGTATGGTTGGAGCC	GAGACGGCAGCCAAGGTTAT
LGR5	CCTGCTTGACTTTGAGGAAGACC	CCAGCCATCAAGCAGGTGTTC
Notch1	CCC GCCAGAGTGGACAGGT CAGTA	TGTCGCAGTTGGAGCCCTCGTTA
BMI	CTGGTTGCCCATGACAGCG	AAATCCCGAAAGAGCAGCC

## 2.9 細胞周期測定

前日に 6 ウェルプレートに細胞を  $5 \times 10^5$  個播種し、次の日 PBS (-) で細胞を洗淨後、トリプシン処理により細胞をプレートから回収した。細胞を  $500 \times g$  で 5 分

間遠心し、細胞ペレットを PBS (-) で洗浄し、再度遠心して PBS (-) を除去した。その後、冷 70%エタノールで細胞を懸濁し、-20°Cに一晩静置して固定した。その後、1,000×g にて遠心しエタノールを取り除き、細胞を PBS (-) で洗浄した後に PBS (-) で再懸濁し、Tali Cell cycle Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてメーカーのプロトコルに従って染色を行い、細胞周期の測定には Tali® Image Cytometer (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した。

## 2.10 細胞増殖アッセイ

24 well-plate の 1 well あたりに細胞を  $1 \times 10^4$  cells (AsPC-1)、 $1 \times 10^4$  cells (BxPC-3)、 $1 \times 10^4$  cells (PANC-1)、 $2.5 \times 10^3$  cells (MIA PaCa-2) 播種し、3, 5, 7 日後に血球計算盤を用いてカウントした。

## 2.11 スフィアフォーメーションアッセイ

AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞を DMEM/F-12 培地 (Thermo Fischer Scientific) に 100 µg/mL EGF (富士フイルム和光) と 100 µg/mL bFGF (富士フイルム和光)、2% B27 supplement (富士フイルム和光) を添加した培地で 96-well ultra-low attachment plates に 1 ウェル当たり 250 個播種し、7 日後に形成した 50 µm 以上のスフィアの数顕微鏡下で数えた。

## 2.12 抗がん剤感受性実験

前日に siRNA を用いてトランスフェクションした細胞を 24 well-plate の 1 well あたりに細胞を  $5 \times 10^4$  cells 播種し、翌日 Gemcitabine (東京化成工業) もしくは Paclitaxel (富士フイルム和光) を添加して 3 日間培養した。血球計算盤を用いて、トリパンブルー染色をして生細胞のみをカウントした。

## 2.13 免疫沈降

スクレーパーで回収した細胞を PBS(-)で洗浄し、lysis buffer [1% Nonidet P-40, 50mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl]で溶解し、4°C、15,000 g で 15 分遠心した。上清を回収し、p21 抗体 (CST)、p27 抗体 (CST)、Slug 抗体 (CST) を添加して 4°Cで一晩反応させた。Protein A アガロース (Thermo Fisher Scientific) をライセートに添加して 1 時間 4°Cでインキュベートした。ビーズを 4 回 lysis buffer で洗浄し、タンパクはメルカプトエタノールを添加したサンプルバッファーで加熱して溶出し、ウェスタンブロットで検出した。

## 2.14 膵癌同所移植

8 週齢のヌードマウス BALB/c nu/nu を日本クレア (東京) から購入した。AsPC-1 細胞を  $4 \times 10^7$  cells/mL の濃度で PBS (-) に調整し、等量の Matrigel (Corning 社、Corning, NY, USA) と混合した。メデトミン注 (フジタ製薬株式会社、東京) 9  $\mu$ g、

ミダゾラム注（サンド株式会社、東京）4.8  $\mu\text{g}$ 、ベトルフェール（Meiji Seika ファルマ株式会社、東京）60  $\mu\text{g}$  を生理食塩水 120  $\mu\text{L}$  に溶かした三種混合麻酔薬により麻酔をかけたマウス腹部を切開し、膵臓に  $1 \times 10^6$  の細胞を含む細胞調整液を 50  $\mu\text{L}$  移植した。その後、9 mm のウンドクリップ（BD 社）にて傷口を処置し、麻酔の拮抗薬メパチア注（フジタ製薬株式会社）15  $\mu\text{g}$  を生理食塩水 120  $\mu\text{L}$  に溶かして注射した。細胞移植から 4 週間後に安楽死を行い、正常な膵臓を含む腫瘍を摘出し重量を電子天秤で測定した。

## 2.15 抗がん剤治療モデル

6 週齢のヌードマウス BALB/c nu/nu を日本クレア（東京）から購入し、2.14 と同様に作製した同所移植モデルマウスに、移植 1 週間後から週 2 回を 4 週間、2.5 mg/kg Paclitaxel（10% エタノール、10% クレモフォール、80% 生理食塩水）腹腔内投与した後 25 mg/kg Gemcitabine（生理食塩水）を腹腔内投与した。細胞移植から 5 週間後に安楽死を行い、正常な膵臓を含む腫瘍を摘出し重量を電子天秤で測定した。

## 2.16 凍結切片の免疫染色

マウスに 100 mg/kg b.w. ピモニダゾール（Hypoxyprobe, Birlington, USA）を腹腔内投与し、さらに 80 分後に 10 mg/kg b.w. Hoechst33342 を腹腔内投与し、10 分後に解剖した。組織は O.C.T. コンパウンド（サクラファインテックジャパン）で包

埋し、-80°Cで保存した。免疫染色には、10  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製し、4% PFA/PBS で固定した。表 2.15 に示す抗体を使用して染色を行い、共焦点顕微鏡（Nikon）で撮影した。

表 2.15 免疫染色に使用した抗体

抗体	希釈倍率
HIF-1 $\alpha$ antibody (Novus, NB100-479)	1/50
Anti Hypoxyprobe-1 (HPI, Burlington, MA, HP1-100)	1/50
Anti-Ki67 Antibody (Thermo Fisher Scientific, RM-9106-SO)	1/50
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, A11035)	1/500
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11029)	1/500

## 2.17 パラフィン包埋標本作製

摘出した腫瘍は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で4時間浸漬法により固定した後、エタノールによる脱水処理後、キシレンに置換し、パラフィンに包埋することで、パラフィンブロックを作製した。パラフィンブロックから3  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色した。免疫組織染色には、3  $\mu\text{m}$  の薄切切片をキシレンでパラフィン除去をした後、エタノールでキシレンを除去し、その後水洗した。次に、クエン酸バッファー（18 mM クエン酸、82 mM クエン酸ナトリウム）にて100°Cで5分間加熱処理し、抗原を賦活化した。室温まで戻した後、



0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / PBS に 1 時間浸して内因性ペルオキシダーゼの除去をした。次に、非特異的反応を抑えるために 5% 正常ヤギ血清/PBS で 1 時間処理した。1 次抗体の希釈には PBS を用いて、表 2.16 に示す抗体をを使用し 4°C で一晩反応させた。PBS で 5 分×3 回洗浄した後、2 次抗体 Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP (Agilent 社、CA、USA) を滴下して室温で 1 時間反応させ、PBS で 5 分×3 回洗浄した。次に Stable DAB (Thermo Fisher Scientific 社) で 5 分間発色をさせ、水洗後、ヘマトキシリンで 5 秒染色し、さらに水洗後、エタノールによる脱水、キシレン処理後、マリノールを用いて封入した。

表 2.16 パラフィン包埋切片の免疫染色に使用した抗体

抗体	希釈
Anti-SKP2 Rabbit antibody (CST, 2652)	1/100
Anti-Mint3 mouse antibody (BD Biosciences, 611380)	1/50
Anti-HIF-1 $\alpha$ antibody (Novus, NB100-479)	1/50
Anti-p21 rabbit antibody (CST, 2947P)	1/100
Anti-p27 rabbit antibody (CST, 3686)	1/100
Anti-E-cadherin (BD, 610181)	1/100
Anti-N-cadherin rabbit antibody (CST, 13316)	1/100
Anti-Slug mouse antibody (Santa cruz, sc-166476)	1/50
Anti-TWIST1 mouse antibody (Novus, NBP-237364)	1/200
Anti-Vimentin rabbit antibody (CST, 5741)	1/100

## 2.18 レポーターアッセイ

SKP2 プロモーター領域 (DQ021501.1) を含むレポーターアッセイのベクター作製

には、まず AsPC-1 細胞のゲノム DNA を Allprep DNA/RNA/ Protein Mini Kit

(QIAGEN) を使用して抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型に SKP2 の転写開始位置から上流 2000 bp を KpnI と XhoI の制限酵素サイトを伴ったプライマー (F: 5'-GGTACCCAGGTAACCTCCTAGTAAAACCAAGA-3', R: 5'-CTCGAGAGCGTCCGCAGGCCCGGGAGTTTAA -3') を使用して PCR で増幅し、pGEM-T easy vector (Promega 社) にサブクローニングした。その後、制限酵素処理により pGL3 ベクター (Promega 社) に移し替えて、SKP2 プロモーターの制御下でホタルルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドを作製した。

HIF-1 活性は低酸素応答配列 (HRE) に応答してホタルルシフェリンを発現する pGL4.42 ベクター (Promega 社) を用いた。

レポーターアッセイには、ウミシイタケルシフェラーゼを発現する pRL ベクターは内在性コントロールとして使用した。トランスフェクションは、細胞を 24 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  cells / well 播種し、翌日 OptiMEM と 100 ng のレポータープラスミドと 10 ng の内在性のコントロールベクターと Lipofectamine2000 (Thermo Fisher Scientific 社) の混合液を加えて培養した。翌日、PBS (-) で細胞を洗浄後、 $1 \times$  Passive lysis buffer (Promega) で細胞を溶解し、遠心して上清を試料とした。ルシフェラーゼ活性は Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いてメーカーのプロトコルに従って測定した。化学発光は GloMax 20/20 ルミノメータ

ー (Promega 社) を使用した。

## 2.19 統計処理

腫瘍の重量のデータは平均値±標準偏差 (SD) で示し、統計学的有意差はマンホイットニーの U 検定により評価した。それ以外のデータは平均値±標準偏差(SD) で示し、統計学的有意差は t 検定により評価した。全ての検定において P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

### 3 結果

#### 3.1 マウス膵癌で HIF-1 $\alpha$ は通常酸素下か緩やかな低酸素下に局在する

固形腫瘍において HIF-1 は低酸素下で安定化し、増加することが知られている [19]。一方で、Sobhanifar らの子宮頸がんの臨床検体やマウス腫瘍移植実験を用いた研究によると、低酸素下では細胞はネクロシスを起こすことから HIF-1 $\alpha$  の発現は低下すると報告されている [20]。そこで、まず膵癌細胞でも HIF-1 $\alpha$  が通常酸素下に局在するかを調べるために、10 mmHg 以下の pO<sub>2</sub> を染色できる pimonidazole を用いてマウス膵癌同所移植切片の染色を行った。ヒト膵癌 AsPC-1 細胞を同所移植したマウスに、pimonidazole と血管の近くを可視化するために Hoechst33342 を腹腔内投与し、作製した切片の染色を図 3.1 に示す。HIF-1 $\alpha$  と低酸素マーカーである pimonidazole はほとんど重なっておらず、また、HIF-1 $\alpha$  と血管の近くを示す Hoechst33342 が一部重なっていたことから、HIF-1 $\alpha$  は低酸素よりも、通常酸素か比較的穏やかな低酸素下で発現していることが示唆された。また連続切片で増殖マーカー Ki67 を染色したところ、HIF-1 $\alpha$  と Ki67 はほとんど同じ部位が陽性領域であった。以上のことから、膵癌同所移植モデルにおいても HIF-1 $\alpha$  は比較的高い酸素濃度で発現しており、このような領域で細胞増殖がさかんであることが明らかとなった。

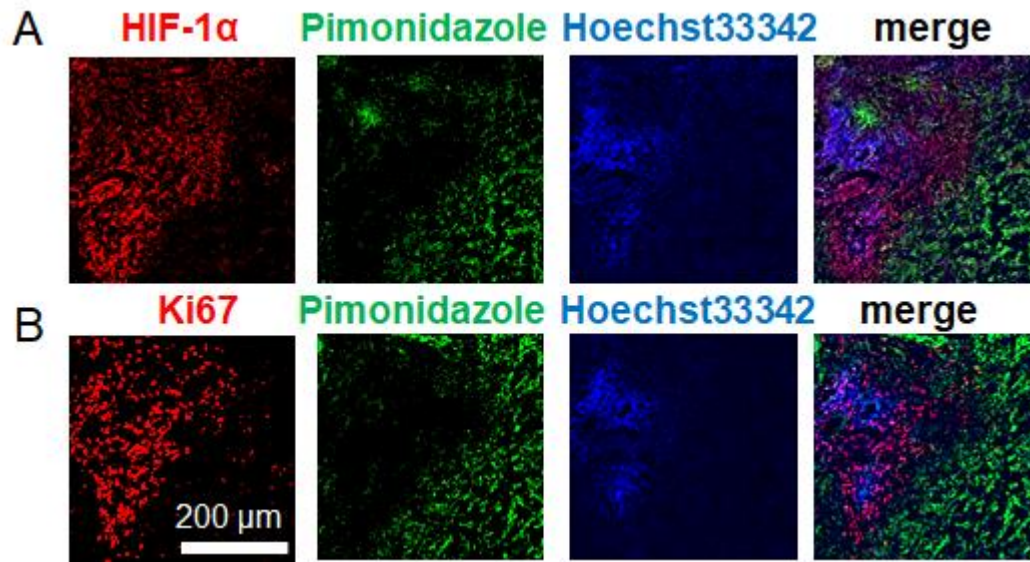


図 3.1 マウス膵癌同所移植切片の染色

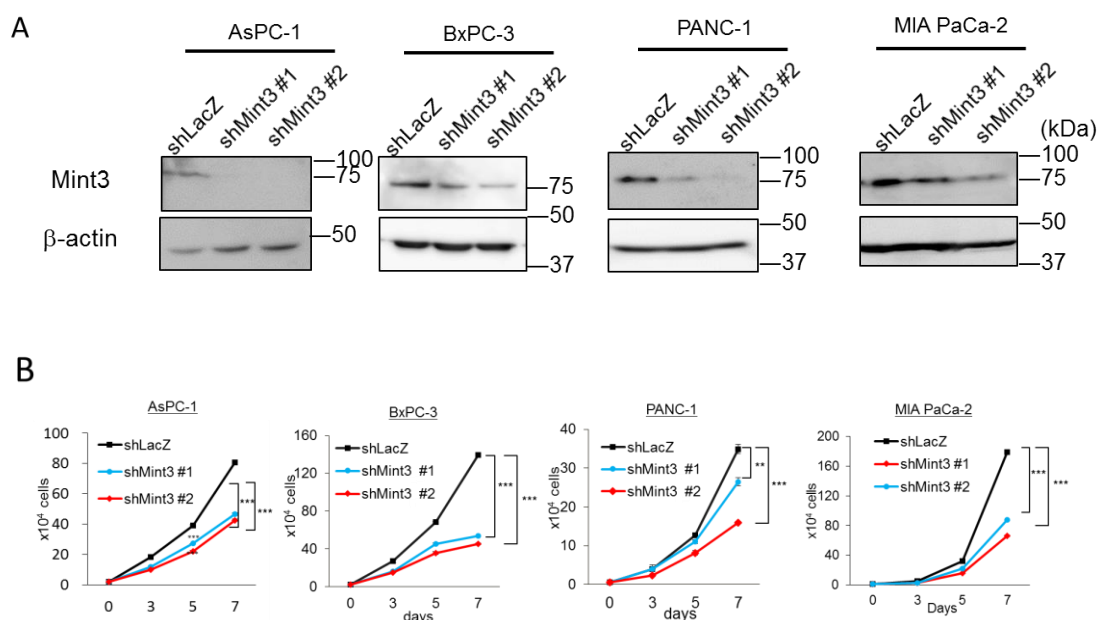
膵癌 AsPC-1 細胞の同所移植切片の免疫染色。低酸素マーカーpimonidazole (緑) と HIF-1 $\alpha$  (A)、Ki67 (B)。Hoechst33342 (青) は血管付近を染色するために解剖する 10 分前にマウスに腹腔内投与した。

### 3.2 Mint3 ノックダウンは膵癌細胞の細胞周期を停止させる

膵癌において、増殖がさかんな通常酸素下における HIF-1 $\alpha$  の制御が重要であることが明らかになったが、HIF-1 の通常酸素下における制御因子として Mint3 がある。Mint3 は先行研究において、乳癌細胞や線維肉腫細胞において造腫瘍能を促進することが明らかになっている[28, 33, 57]。そこで、膵癌における Mint3 の機能を調べるために、まずヒト膵癌細胞株 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、MIA PaCa-2 細胞に shRNA 発現レンチウイルスベクターを導入し、コントロール (shLacZ) および Mint3 ノックダウン (shMint3#1, #2) 細胞を樹立した (図 3.2.1A)。次に、これらの膵癌細胞の増殖を調べたところ、コントロール細胞に比べ、Mint3 ノックダウン細胞では細胞増殖が有意に低下することが明らかとなった (図 3.2.1B)。

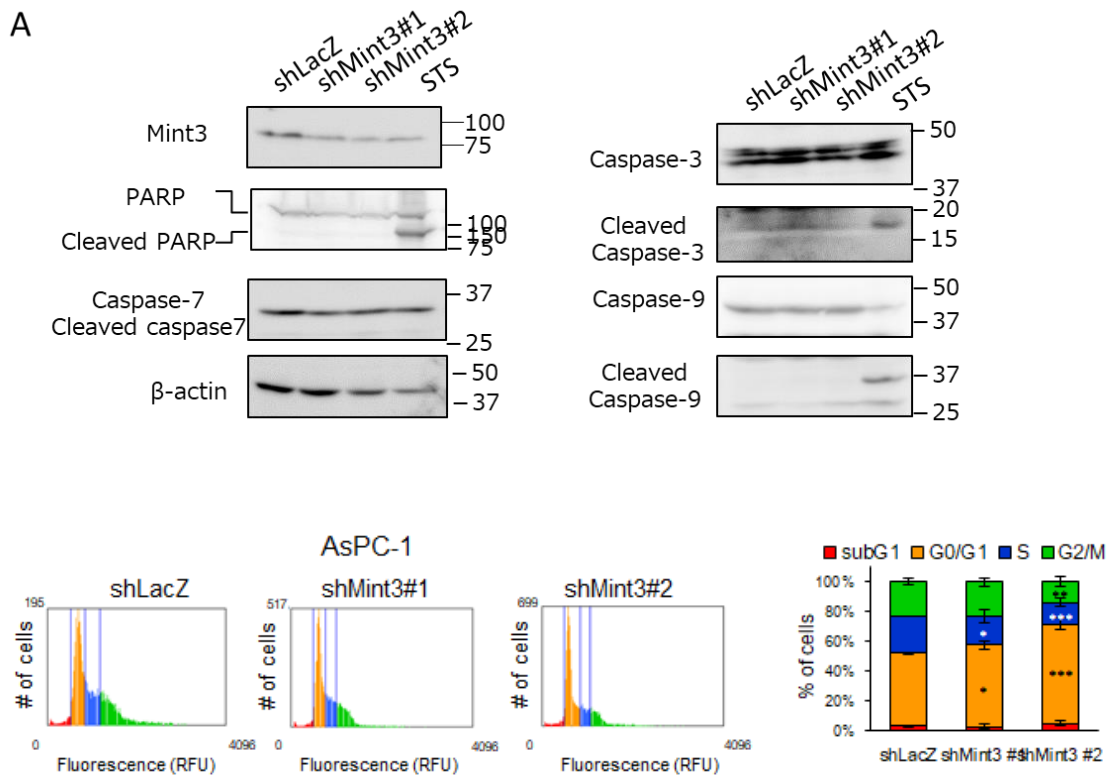
これまで乳癌細胞、線維肉腫細胞では Mint3 のノックダウンは細胞増殖に影響しないと報告されている[32, 33]ことから、膵癌特異的な Mint3 の役割であることが示唆された。次に Mint3 ノックダウンによる膵癌細胞の細胞増殖抑制に細胞死が関与するかについて、アポトーシス関連タンパクの発現をウェスタンブロットにて解析した。AsPC-1 細胞において、アポトーシスにより誘導される cleaved PARP, cleaved caspase-7, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 は、アポトーシスを誘導することが知られるスタウロsporin 処理 (STS) では検出されたが、Mint3 ノックダウンでは検出されなかった (図 3.2.2A)。このことから、Mint3 ノックダウンによって起こ

った細胞増殖低下は、細胞死によるものではないことが明らかとなった。次に、Mint3 のノックダウンが AsPC-1 細胞の細胞周期に影響を与えている可能性を明らかにするため、PI 染色で細胞周期の状態を解析した。その結果、コントロール細胞に比べ、Mint3 ノックダウン細胞では G0/1 期の細胞が増加し、S 期の細胞が減少していた (図 3.2.2B)。以上の結果から、Mint3 ノックダウンは AsPC-1 細胞において G1 期停止を引き起こすことが明らかとなった。



### 図 3.2.1 Mint3 ノックダウンは膵癌細胞の増殖を抑制する

(A) コントロール (shLacZ) および Mint3 ノックダウン (shMint3 #1, #2) AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、MIA PaCa-2 細胞における Mint3 発現のウェスタンブロット。(B) コントロールおよび Mint3 ノックダウン膵癌細胞の細胞増殖。データは平均値 $\pm$ S.D.。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ) を示す。



**図 3.2.2 AsPC-1 細胞での Mint3 ノックダウンは細胞周期 G1 期停止を引き起す**

(A) コントロール (shLacZ) および Mint3 ノックダウン (shMint3#1, #2) AsPC-1 細胞アポトーシス関連分子のウェスタンブロット解析。スタウロスポリン (STS) はアポトーシス誘導剤。(B) AsPC-1 細胞の細胞周期を PI 染色後、Tali Image Cytometer で測定した。左は代表的なサイトメーターの図。右は各細胞周期の細胞の割合。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ,  $n=3$ ) を示す。

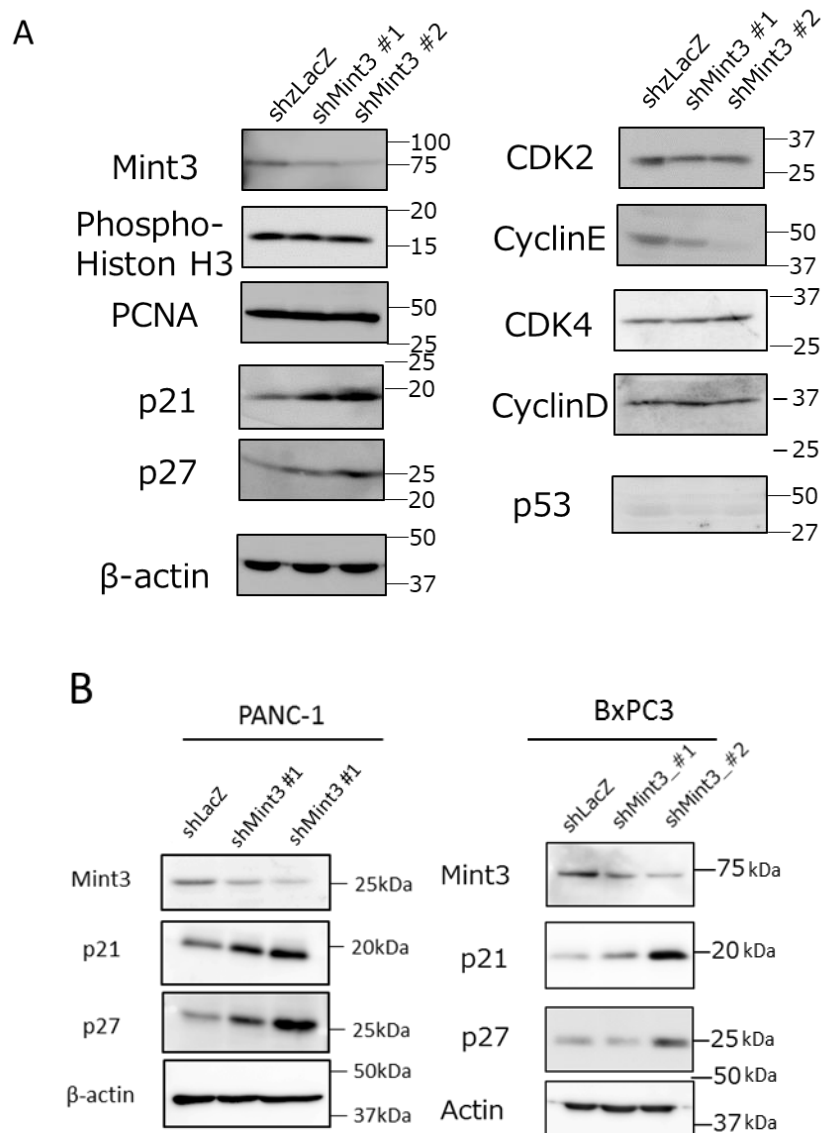


### 3.3 Mint3 ノックダウンは、膵癌細胞に CDK インヒビター p21、p27 のタンパクレベルの増加を引き起こす

次に、Mint3 ノックダウンがどのように膵癌細胞の細胞周期停止に関わるかを調べるため、細胞周期の G1 期のマーカーである CyclinD、CyclinE、CDK2、CDK4、その抑制因子 p21、p27、S 期のマーカーである PCNA、M 期のマーカーである phospho-Histone H3 (Ser10) のウェスタンブロットを行った (図 3.3.1A)。AsPC-1 細胞において、Mint3 ノックダウンは PCNA、phospho Histone H3、CyclinD、CDK2、CDK4 の発現量に影響しなかったのに対し、p21 と p27 は Mint3 の発現量に逆相関して増加した。他の膵癌細胞 PANC-1 や BxPC-3 細胞においても同様に Mint3 の発現量に逆相関して p21 と p27 のタンパクは増加していた (図 3.3.1B)。p21 と p27 は一般に、p53 などによる転写の促進による mRNA レベルの制御と、S-phase kinase associated protein (SKP2) などのユビキチンリガーゼによるユビキチン化・プロテアソームでの分解によるタンパクレベルでの制御により、発現レベルが制御されることが知られている[58, 59]。今回使用した膵癌細胞株はすべて p53 欠損もしくは変異を持つ[60]ため、Mint3 のノックダウンはこれら膵癌細胞株の p21、p27 mRNA 量に影響しないことが想定された。実際、コントロールおよび Mint3 ノックダウン AsPC-1、BxPC-3 細胞の p21、p27 の mRNA の量をリアルタイム PCR で調べたところ、コントロールと Mint3 ノックダウン細胞で有意な差は見られなかった (図 3.3.2)。

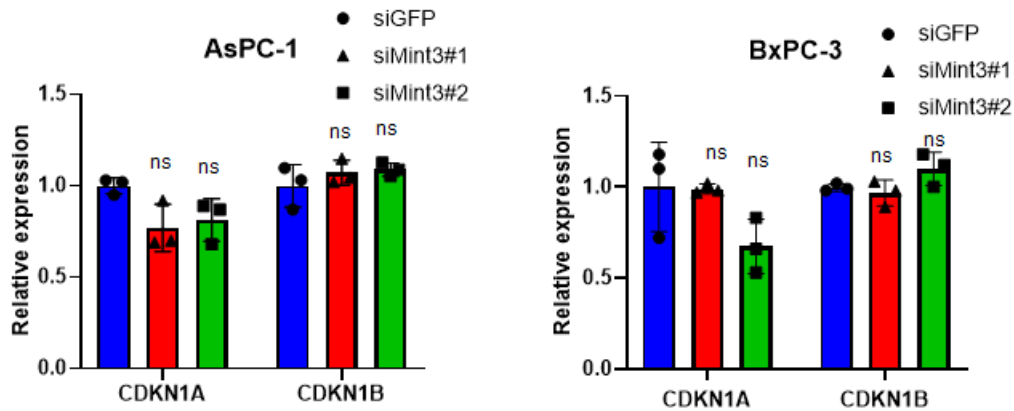
次に、Mint3 がプロテアソームでの分解による p21、p27 のタンパクレベルでの制御に関わるかを調べるために、プロテアソーム阻害剤 MG132 にて処理した際のコントロールおよび Mint3 ノックダウン細胞の p21、p27 タンパクレベルをウェスタンブロットで解析した (図 3.3.3)。溶媒の DMSO のみを加えた AsPC-1、BxPC-3 細胞では、一過性の Mint3 ノックダウンにより p21 と p27 の発現が増加した。一方、MG132 処理により、コントロール siRNA (siLuc/siGFP) を遺伝子導入した細胞でも p21、p27 のタンパク量が増加し、DMSO 添加時に比べ Mint3 ノックダウン細胞との p21、p27 タンパク量の差が減弱した。

p21、p27 のプロテアソームでのタンパク分解は K48 を介したユビキチン化により制御される [58, 59]。そこで、Mint3 が p21 と p27 の K48 ユビキチン化に関わるかを調べるために、MG132 処理したコントロール(shLacZ)AsPC-1 細胞と Mint3 ノックダウン(shMint3#1, #2)細胞の p21、p27 を免疫沈降し、ユビキチン化を比較した。その結果、Mint3 ノックダウン細胞で p21、p27 の K48 ユビキチン化が減少した (図 3.3.4)。以上のことから、Mint3 は膀胱癌細胞において p21、p27 タンパクのプロテアソームでの分解に関わることが明らかとなった。

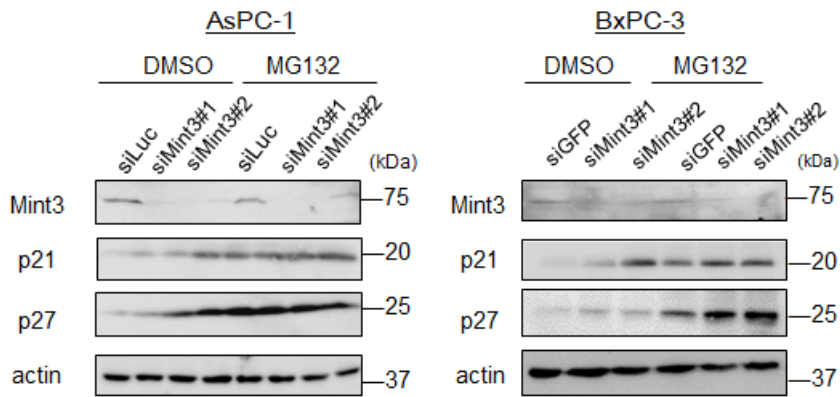


**図 3.3.1 Mint3 ノックダウンにより p21 と p27 の発現が増加する**

(A) AsPC-1 のコントロール (shLacZ) 細胞および Mint3 ノックダウン (shMint3 #1, #2) 細胞のウェスタンブロット解析。M 期のマーカー；phospho Histone H3、S 期のマーカー；PCNA、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子；p21, p27、G1 期のマーカー；CDK2,4 と CyclinD,E、がん抑制遺伝子；p21 と p27 の転写に関わる p53 の発現。(B) PANC-1 細胞と BxPC-3 細胞のコントロール (shLacZ) 細胞と Mint3 ノックダウン (shMint3 #1、#2) 細胞の p21 と p27 に対するウェスタンブロット解析。

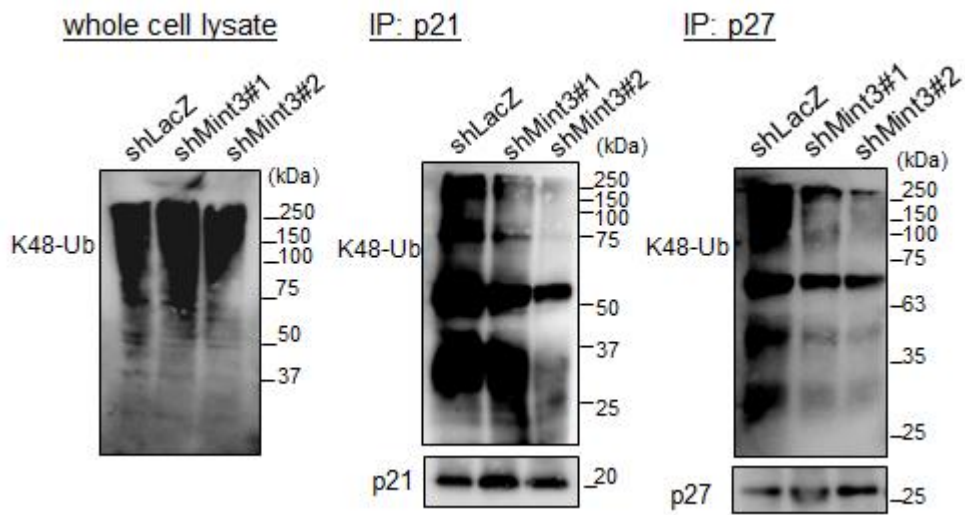


**図 3.3.2 p21 と p27 の転写は Mint3 ノックダウンによって変化しない**  
 AsPC-1 細胞と BxPC-3 細胞のコントロール(siGFP)と一過性Mint3 ノックダウン (siMint3 #1, #2) の p21 (*CDKN1A*) と p27 (*CDKN1B*) 発現に対するリアルタイム PCR 解析。内在性コントロールとして *ACTB* を用いた。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。ns は t 検定による統計的な有意差がなかったことを示す。



**図 3.3.3 Mint3 ノックダウンで p21 と p27 はプロテアソームによる分解が抑制される**

一過性に Mint3 をノックダウンした AsPC-1 細胞と BxPC-3 細胞における Mint3, p21, p27,  $\beta$ -actin 発現のウェスタンブロット解析。コントロール (siLuc もしくは siGFP) および Mint3 に対する siRNA (siMint3#1, #2, #3) のトランスフェクションから 5 日後に、細胞を溶媒の DMSO もしくは 10  $\mu$ M の MG132 で 4 時間処理した。



**図 3.3.4 Mint3 ノックダウンは p21 と p27 のユビキチン化を減少させる**

コントロール (shLacZ) と Mint3 ノックダウン (shMint3#1, #2) AsPC-1 細胞の免疫沈降。抗 p21 抗体と抗 p27 抗体で免疫沈降を行い、K48 特異的なポリユビキチン化抗体でウェスタンブロットを行った。細胞は回収の前に 10  $\mu$ M MG132 で処理された。

### 3.4 Mint3 は SKP2 発現を促進することで p21 と p27 を分解し、膵癌細胞の細胞増殖を亢進する

続いて、Mint3 がどのように p21 と p27 の分解を促進するかを検討した。p21、p27 のプロテアソームによる分解は SKP2 によって行われることが知られている[39, 40]。SKP2 は、SCF<sup>SKP2</sup> E3 リガーゼ複合体を構成する要素であり、基質となる分子の分解を通して細胞周期の亢進に寄与する[53]。近年の報告において、SKP2 はさまざまな癌種で高発現していることが報告されており、膵癌でも過剰発現し予後不良とかかわるとされている[55]。そこで、膵癌細胞で Mint3 による p21、p27 タンパクの分解に SKP2 が関与するかを調べるために、まずコントロールと Mint3 ノックダウン AsPC-1 細胞の SKP2 mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。その結果、Mint3 ノックダウン細胞で有意に SKP2 の mRNA 発現が低下していることが分かった (図 3.4.1A)。この結果に一致して、タンパクレベルでも Mint3 ノックダウン細胞で SKP2 が減少していた (図 3.4.1B)。以上のことから、Mint3 は SKP2 の発現を促進していることが明らかとなった。

次に、膵癌細胞での SKP2 の p21、p27 発現と細胞増殖への影響を調べるために、SKP2 ノックダウン (shSKP2 #1, #2, #3) AsPC-1 細胞を作製した。Mint3 ノックダウン細胞と同様に、SKP2 ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ p21 と p27 のタンパク発現が増加し (図 3.4.1C)、細胞増殖が有意に低下した (図 3.4.1D)。

Mint3 ノックダウンによる p21 と p27 の増加が SKP2 に依存するかを調べるために、Mint3 と SKP2 を同時にノックダウンしたところ、SKP2 ノックダウンによって p21 と p27 は増加したが、さらに Mint3 をノックダウンしてもそれ以上の増加は認められなかった (図 3.4.2) ことから、Mint3 による p21 と p27 の制御は SKP2 を介していることが示唆された。

SKP2 は細胞周期の中で周期的に変動することが知られる[61]。Mint3 ノックダウン膀胱癌細胞で低下した SKP2 が細胞周期に影響を与えた可能性を排除するために、ノコダゾール処理により M 期に同期して SKP2 の mRNA 発現を調べた (図 3.4.3)。その結果、ノコダゾール処理をした場合にも、ノコダゾール除去後 3 時間経った場合にも SKP2 は Mint3 ノックダウン細胞で有意に低下することが明らかとなった。以上の結果から、Mint3 は SKP2 発現を促進することで p21 と p27 を分解し、膀胱癌細胞の細胞増殖を亢進することが示唆された。

先行研究において、乳癌 MDA-MB-231 細胞や線維肉腫 HT1080 細胞で Mint3 は細胞増殖には影響しないが造腫瘍能に寄与すると報告されている[32, 33]。そこで、膀胱癌特異的に細胞増殖を抑制しているメカニズムを調べるために、これらの細胞での SKP2 の mRNA とタンパクレベルを調べた。その結果、MDA-MB-231 細胞や HT1080 細胞では、Mint3 をノックダウンしても SKP2 の mRNA もタンパクも有意な変化は見られなかった (図 3.4.4A, B)。また、その結果に一致して p21 の発現に

も変化はなかった。

次に、Mint3 をノックダウンしても細胞増殖に与えないこれらの細胞と、膵癌細胞の SKP2 の発現量の違いをウェスタンブロットで調べた。その結果、Mint3 ノックダウンによって細胞増殖が変化しないと報告されている乳癌 MDA-MB-231 細胞や線維肉腫 HT1080 細胞の発現は膵癌細胞 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞と比較して発現が高いことが明らかとなった (図 3.4.5)。以上の結果から、Mint3 によって細胞増殖が変化しない乳癌細胞や線維肉腫細胞では、SKP2 自体の発現は高いにもかかわらず、SKP2 の発現は Mint3 に依存しないことが明らかとなった。

次に、Mint3 は癌細胞特異的に HIF-1 を活性化する[57]ことから、正常細胞で SKP2 や p21、p27 に影響があるかをウェスタンブロットにより解析した。まず、膵癌細胞と正常膵臓腺房 H6c7 細胞と Mint3 発現を比較したところ、顕著な違いは見られなかった (図 3.4.6A)。Mint3 による HIF-1 の制御には MT1-MMP の発現が必要であることが知られている[57]ことから、MT1-MMP の発現を比較したところ、膵癌細胞で MT1-MMP の発現が高いことが明らかとなった。次に、H6c7 細胞の Mint3 を一過性にノックダウンしたところ、SKP2 や p21、p27 に変化は見られなかった (図 3.4.6B)。以上の結果から、Mint3 による SKP2 の制御は膵癌特異的であることが示唆された。



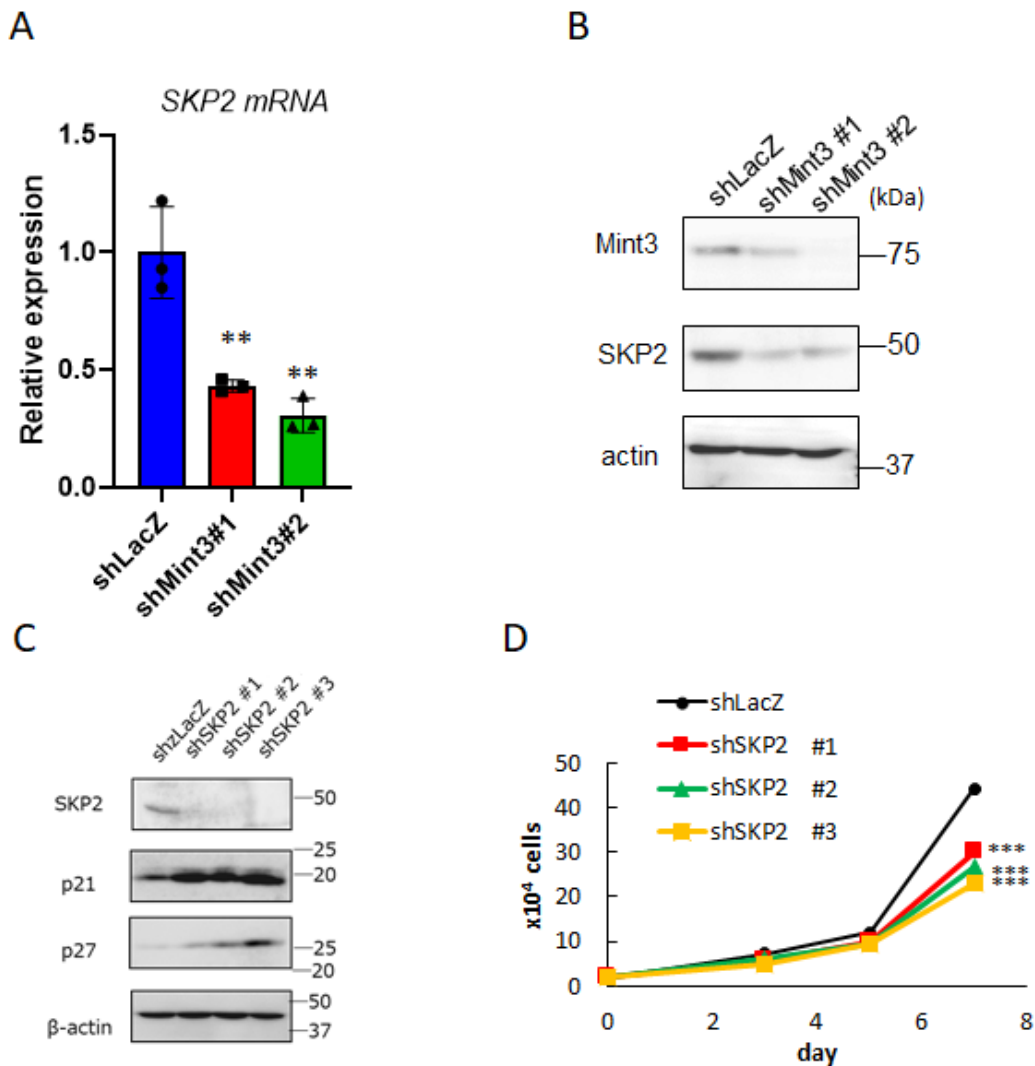


図 3.4.1 Mint3 により発現誘導される SKP2 は p21、p27 タンパクレベルと細胞増殖を制御する

(A) AsPC-1 細胞のコントロール(shLacZ)細胞と安定的 Mint3 ノックダウン(shMint3 #1, #2) 細胞の SKP2 発現に対するリアルタイム PCR 解析。内在性コントロールとして *ACTB* を用いた。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*;  $p<0.01$ ) を示す。

(B) AsPC-1 細胞のコントロール(shLacZ)細胞と安定的 Mint3 ノックダウン(shMint3 #1, #2) 細胞の SKP2 のウェスタンブロット解析。(C) AsPC-1 細胞のコントロール (shLacZ) 細胞と安定的 SKP2 ノックダウン (shSKP2 #1, #2, #3) 細胞の p21、p27 に対するウェスタンブロット解析。(D) AsPC-1 細胞のコントロールおよび SKP2 ノックダウン細胞の細胞増殖アッセイ。データは平均値±S.D. \*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*\*)、 $p<0.001$ 、 $n=3$ ) を示す。

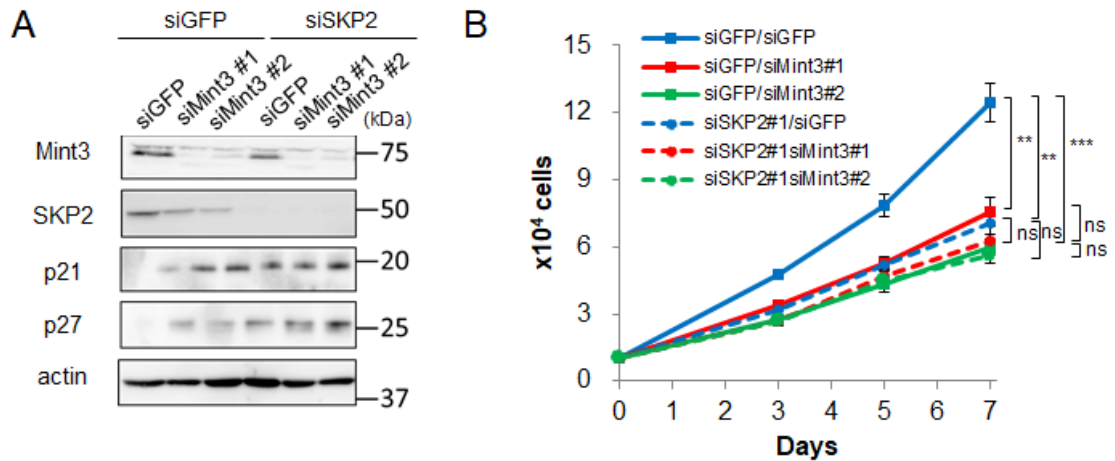


図 3.4.2 Mint3-SKP2経路により p21 と p27 のタンパクレベルと細胞増殖は制御される

AsPC-1 細胞のコントロール(siGFP)と一過性 Mint3 もしくは SKP2 ノックダウン実験。(A) p21 と p27 のウェスタンブロット解析。(B) 増殖アッセイ。データは平均値±S.D。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*; p<0.01、\*\*\*; p<0.001、n=3) を示す。

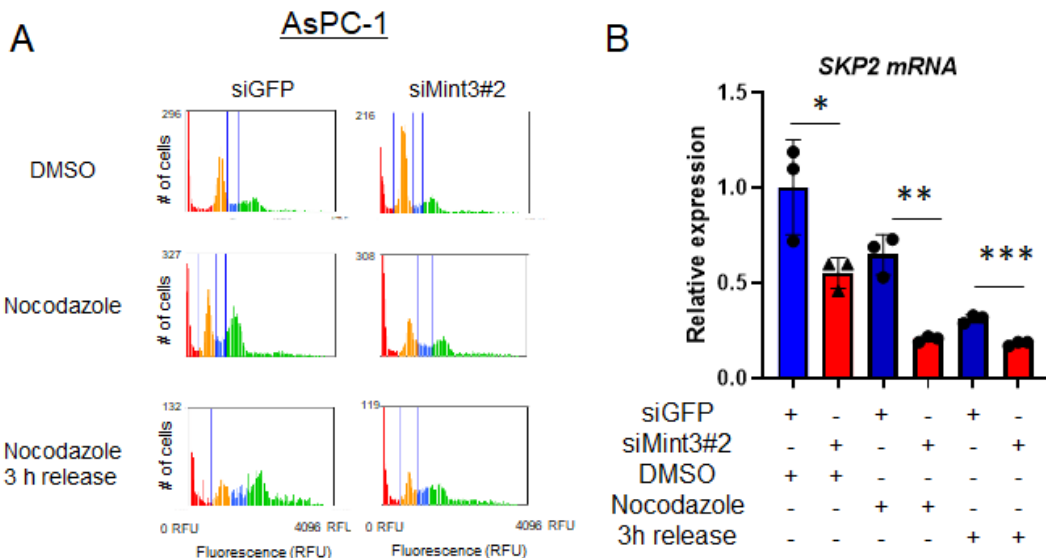


図 3.4.3 Mint3 ノックダウンによる SKP2 低下は細胞周期に関係しない

(A) AsPC-1 細胞をコントロール (siGFP) もしくは Mint3 ノックダウン (siMint3) し、コントロール (DMSO) もしくは nocodazole 処理、もしくは nocodazole 処理後 3 時間後に細胞を回収して、細胞周期を観察した。(B) その時の SKP2 mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析。データは平均値±S.D。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001、n=3) を示す。

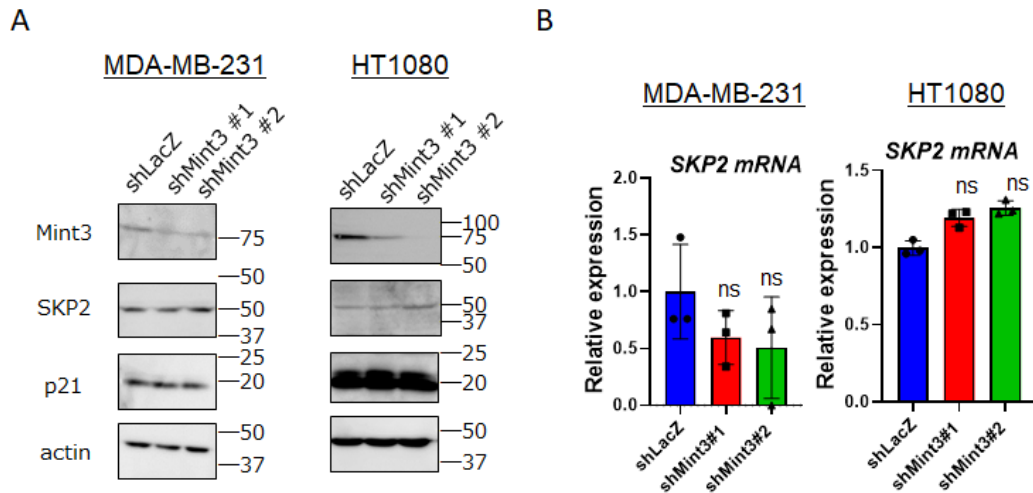


図 3.4.4 乳癌細胞や線維肉腫細胞では Mint3KD は SKP2 発現に影響しない

MDA-MB-231 細胞と HT1080 細胞のコントロール (shLacZ) 細胞および Mint3 ノックダウン (shMint3 #1, #2) 細胞の解析。(A) Mint3、SKP2、p21、actin に対するウェスタンブロット解析。(B) SKP2 発現に対するリアルタイム PCR 解析。内在性コントロールとして *ACTB* を用いた。データは平均値±S.D.。ns は t 検定による統計的な有意差がなかったことを示す ( $n=3$ )。

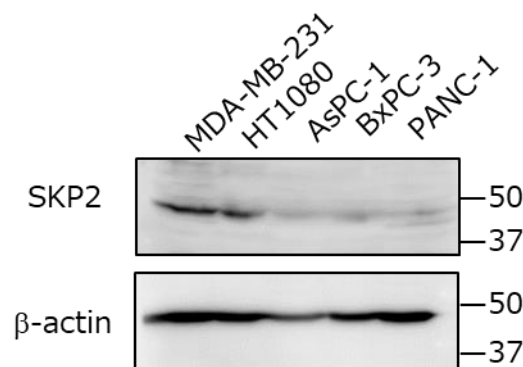


図 3.4.5 さまざまな細胞における SKP2 タンパク発現

乳癌 MDA-MB-231、線維肉腫 HT1080、膵癌 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞の SKP2、 $\beta$ -actin に対するウェスタンブロット解析。

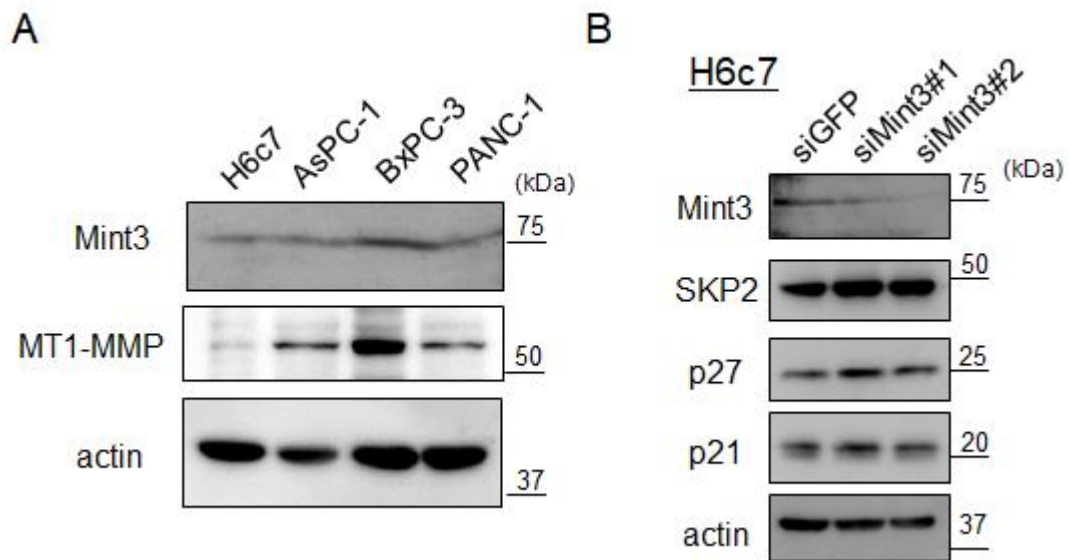


図 3.4.6 正常膵臓腺房細胞では SKP2 は変化しない

(A) 正常膵臓腺房細胞 H6c7 細胞、膵癌 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞のウェスタンブロット解析。(B) H6c7 細胞をコントロール (siGFP) もしくは Mint3 ノックダウン (siMint3#1, #2) しウェスタンブロット解析を行った。

### 3.5 Mint3 は FIH-1 抑制を通して細胞周期を促進する

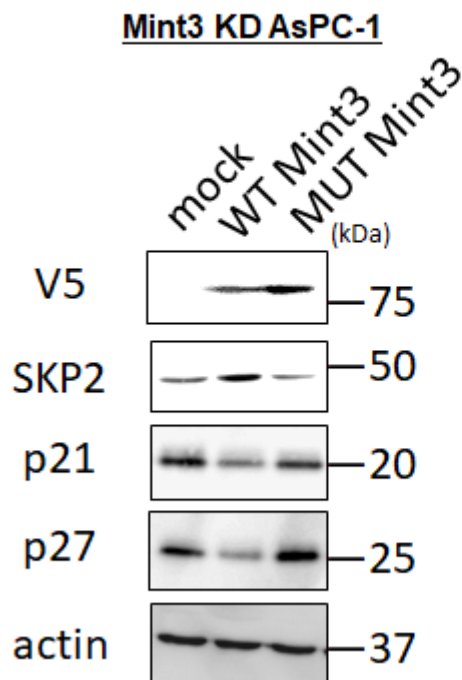
ここまでの実験で、Mint3 が SKP2 の発現促進を通して p21 と p27 の発現を抑制していることが示唆された。Mint3 は HIF の抑制分子 FIH-1 の機能を阻害することで HIF を活性化する[28]ことや、アダプタータンパク質としての機能が報告されている[26]。そこで、Mint3 による SKP2 発現増加とその結果起こる p21 と p27 の分解と細胞増殖の亢進が、FIH-1-HIF-1 経路を介しているかを調べた。Mint3 は特に知られたモチーフのない N 末端側で FIH-1 と結合し、FIH-1 を抑制することが知られている[32]。そこで、Mint3 をノックダウンした AsPC-1 細胞に mock、野生型 Mint3 (WT Mint3)、FIH-1 との結合ができない変異型 Mint3 変異体 (MUT Mint3) の再導入を行った (図 3.5.1)。これらの細胞をウェスタンブロットで解析したところ、p21、p27 の発現は WT Mint3 の再導入で低下したが、MUT Mint3 では mock と同程度のままだった。また、WT Mint3 の再導入で SKP2 の発現は回復したが、MUT Mint3 では回復しなかった。(図 3.5.1A)。この結果に一致して、細胞増殖は WT Mint3 では細胞増殖が亢進したのに対し、MUT Mint3 ではコントロールの mock と有意な差は認められなかった (図 3.5.1B)。以上のことから、Mint3 は FIH-1 と結合することで SKP2 の発現増加に関わることが示唆された。

次に、Mint3 による SKP2 発現に FIH-1 が関与するかを調べるために、siRNA を用いて一過性にコントロール (siGFP)、Mint3 ノックダウン (siMint3)、もしくは

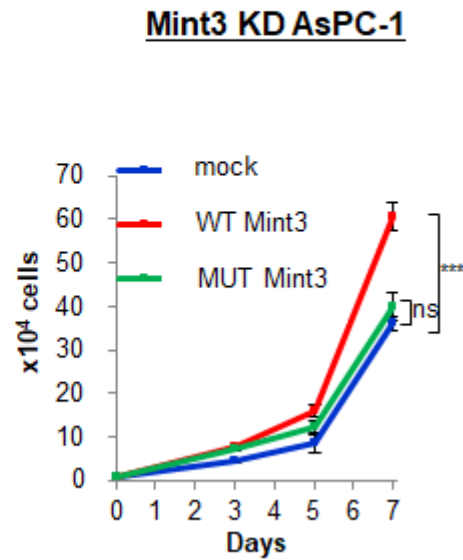
Mint3 と FIH-1 の両方 (siMint3/siFIH-1) のノックダウンを行った (図 3.5.2A)。まず、Mint3 と FIH-1 ノックダウンによる HIF-1 の活性を確認するために、HIF-1 結合配列・低酸素応答配列 (HRE) を用いたレポーターアッセイを行ったところ、Mint3 ノックダウンしたときに HIF-1 活性は低下したが、Mint3 と FIH を同時にノックダウンすると HIF-1 活性が復活した(図 3.5.2D)。また、一過性 Mint3 ノックダウンにより AsPC-1 細胞の SKP2 発現が減少し、p21、p27 は増加し、細胞増殖が抑制された (図 3.5.2B,C)。それに対し、Mint3 と FIH-1 を同時にノックダウンすると、コントロールと同程度に細胞増殖が回復し、p21 と p27 タンパクが減少し、SKP2 の発現が部分的に回復した (図 3.5.2B, C)。以上の結果により、Mint3 が FIH-1 の抑制を介して SKP2 発現を増加し、細胞増殖に寄与していることが示唆された。

さらに、FIH-1 による SKP2 発現への影響をさらに調べるために、ドキシサイクリン (Dox) による誘導発現系を用いて FIH-1 の過剰発現を行った。48 時間の Dox 誘導により FIH-1 を発現させ、ウェスタンプロットで SKP2、p21、p27 発現を解析した。その結果、FIH-1 を発現させると SKP2 発現は減少し、p21 と p27 は増加した (図 3.5.3A)。これらの結果に一致して、FIH-1 の発現により細胞増殖が低下した (図 3.5.3B)。以上の結果により、Mint3 による SKP2 の発現増加は FIH-1 の抑制を介していることが示唆された。

A

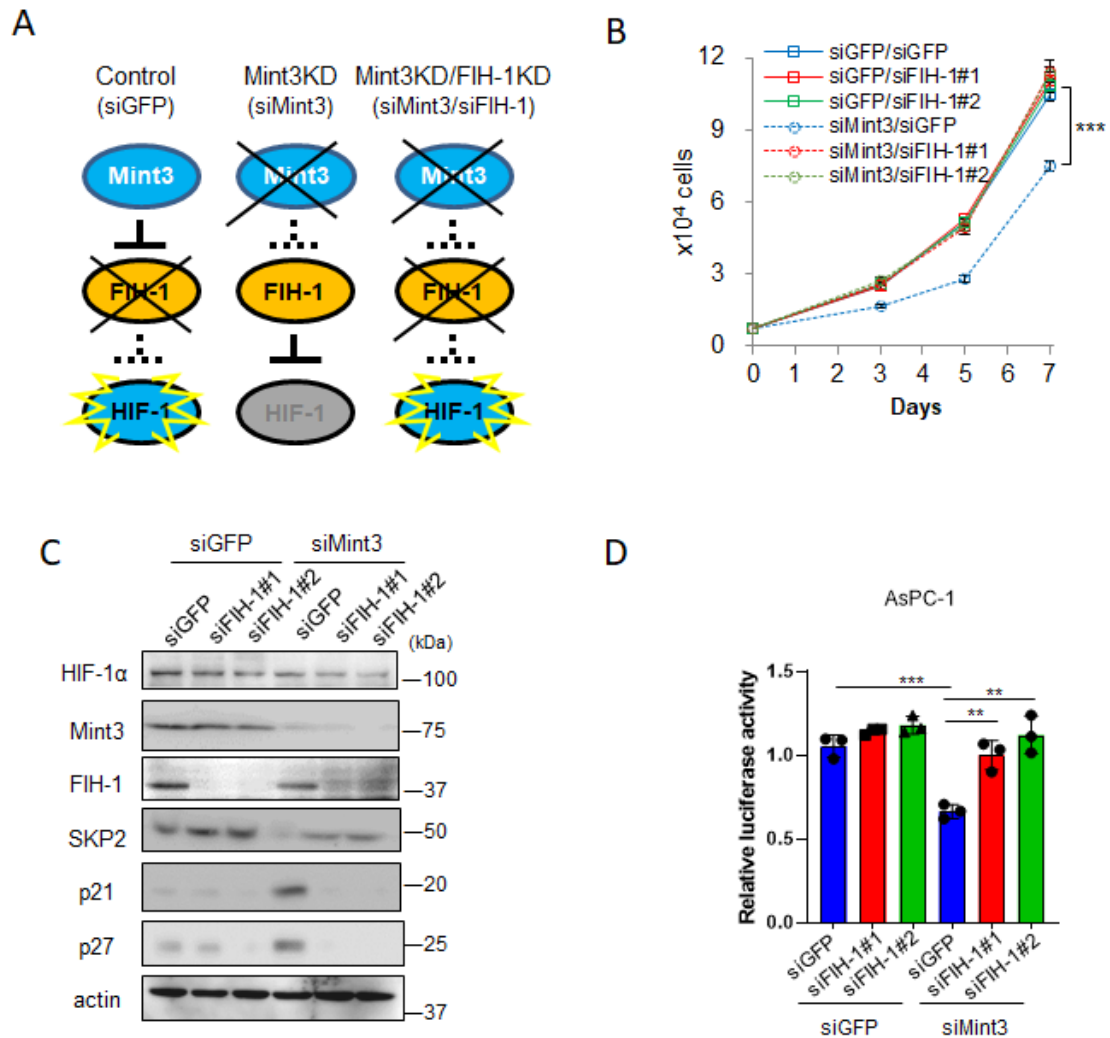


B



### 図 3.5.1 Mint3 の N 末端ドメインが細胞周期に寄与する

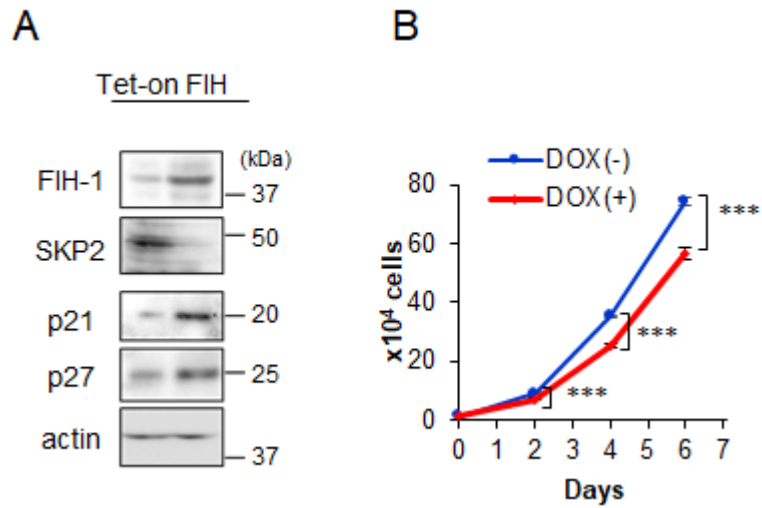
Mint3 ノックダウン細胞へのコントロール(mock)と Mint3-V5 tag 変異体 (野生型 WT、変異型 MUT) の一過性再発現。(A) V5、SKP2、p21、p27、 $\beta$ -actin に対するウェスタンブロット解析。(B) 細胞増殖アッセイ。データは平均値 $\pm$ S.D.。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*\*)、p<0.001、ns; p>0.05、n=3) を示す。



### 図 3.5.2 Mint3 による細胞周期促進は FIH-1 を介する

AsPC-1 細胞のコントロール (siGFP) 細胞、Mint3 ノックダウン (siMint3) 細胞、Mint3 と FIH-1 のダブルノックダウン (siMint3/siFIH-1#1, #2) 細胞の解析。(A) Mint3 ノックダウン細胞への FIH-1 抑制の模式図。(B) 細胞増殖アッセイ。データは平均値 ± S.D.。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*\*)、 $p < 0.001$ 、 $n = 3$ ) を示す。(C) HIF-1 $\alpha$ 、Mint3、FIH-1、SKP2、p21、p27、actin に対するウェスタンブロット解析。(D) HIF-1 活性解析。データは平均値 ± S.D.。\*は t 検定による統計的な有意差 (\*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*)、 $p < 0.001$ 、 $n = 3$ ) を示す。





**図 3.5.3** FIH-1 の発現は SKP2 を減少させ、細胞増殖を抑制する

Doxycyclin (Dox)誘導により FIH-1 を発現する AsPC-1 細胞の解析。(A) 溶媒 (DMSO) のみもしくは 1 ug/mL DOX を 48 時間処理後の FIH-1, SKP2, p21, p27, actin のウェスタンブロット解析 (B) 細胞増殖アッセイ。\*は t 検定による統計的な有意差を示す (\*\*\*) (\*\*\*;  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ )

### 3.6 HIF-1 抑制は SKP2 を抑制し p21 と p27 の発現を増加させる

これまでの結果で、Mint3 による SKP2 の発現制御やそれに伴う p21 と p27 の増加と細胞増殖の低下は、Mint3 による FIH-1 の抑制を介していることが示唆された。Mint3 は FIH-1 の抑制を介して HIF-1 を間接的に活性化する[28, 32]ため、膵癌細胞でも Mint3 により HIF-1 が活性化しているか解析した。最初にコントロール (shLacZ) と Mint3 ノックダウン (shMint3) 細胞のウェスタンブロットを行い、Mint3 ノックダウンの確認と、FIH-1 や HIF-1 のタンパクレベルが変化しないことを確認した (図 3.6.1A)。次に、HIF-1 が結合することで知られる低酸素応答配列 (HRE) を用いたレポーターアッセイを用いて HIF-1 の活性を調べた。その結果、Mint3 ノックダウン細胞で、HRE-Luc 活性が下がることから、AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞でも Mint3 が HIF-1 を活性化していることが明らかとなった (図 3.6.1B)。

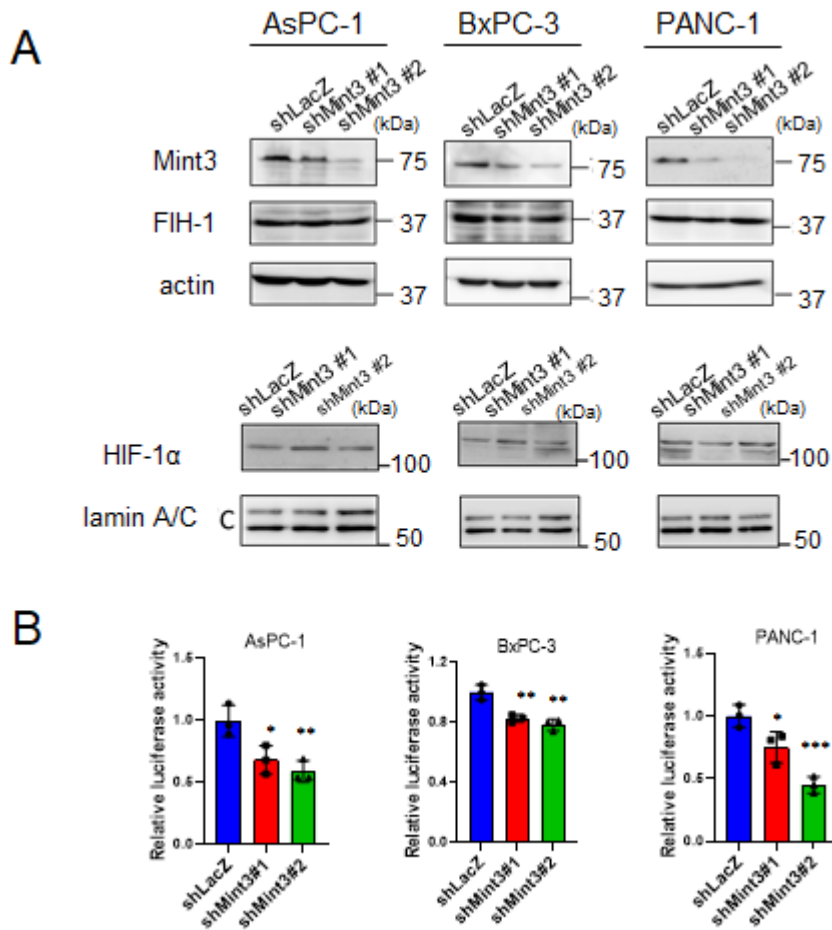
次に Mint3 が HIF-1 を介して SKP2 の発現を制御しているかを調べるために、HIF-1 $\alpha$  ノックダウンが Mint3 ノックダウンと同様に SKP2 の mRNA 低下、p21、p27 タンパク発現増加、細胞増殖低下を引き起こすか調べた。まず、ノックダウン効率を調べるために、一過性にコントロール siRNA (siGFP) もしくは HIF-1 $\alpha$  siRNA トランスフェクションをした AsPC-1 細胞 (shHIF-1 $\alpha$  #1、#2) の HIF-1 $\alpha$  発現をリアルタイム PCR で解析したところノックダウンが確認され (図 3.6.2A)、SKP2 の mRNA 発現を調べたところ HIF-1 $\alpha$  ノックダウンにより SKP2 の mRNA が低下する

ことが明らかとなった (図 3.6.2B)。次に、SKP2 と p21、p27 の発現をウェスタンブロットで解析したところ、Mint3 ノックダウンと同様に、HIF-1 $\alpha$  ノックダウン細胞では SKP2 タンパク発現は減少し、p21 と p27 のタンパクが増加することが分かった (図 3.6.2C)。これらの結果に一致して、HIF-1 $\alpha$  ノックダウン細胞では増殖が低下した (図 3.6.2D)。BxPC-3 と PANC-1 細胞でも同様に、HIF-1 ノックダウンにより SKP2 の減少と、p21 と p27 の増加が認められた (図 3.6.3) 以上の結果から、膵癌細胞では HIF-1 $\alpha$  をノックダウンしても SKP2 の mRNA 量が減少し、その結果 p21、p27 のタンパクレベルの増加と細胞増殖が低下することが明らかとなった。

次に、Mint3 による SKP2 の mRNA 制御が HIF-1 $\alpha$  依存的かどうか調べるために、AsPC-1 細胞で一過性に Mint3 もしくは HIF-1 $\alpha$  のノックダウンを行った。その結果、SKP2 mRNA 発現は、コントロール (siGFP) よりも HIF-1 $\alpha$  ノックダウン (siHIF-1 $\alpha$ ) で低下したが、さらに Mint3 ノックダウンした場合にはそれ以上低下しなかった (図 3.6.4A)。また、タンパクレベルでも同様な結果となった (図 3.6.4B)。一方で、低酸素下においては、HIF-1 $\alpha$  に依存せず減少しており、Mint3 ノックダウンをしても変化しなかった。以上の結果から、膵癌細胞で通常酸素下において HIF-1 $\alpha$  ノックダウンにより SKP2 発現が低下し、p21 と p27 の増加と細胞増殖抑制をすることが明らかとなった。

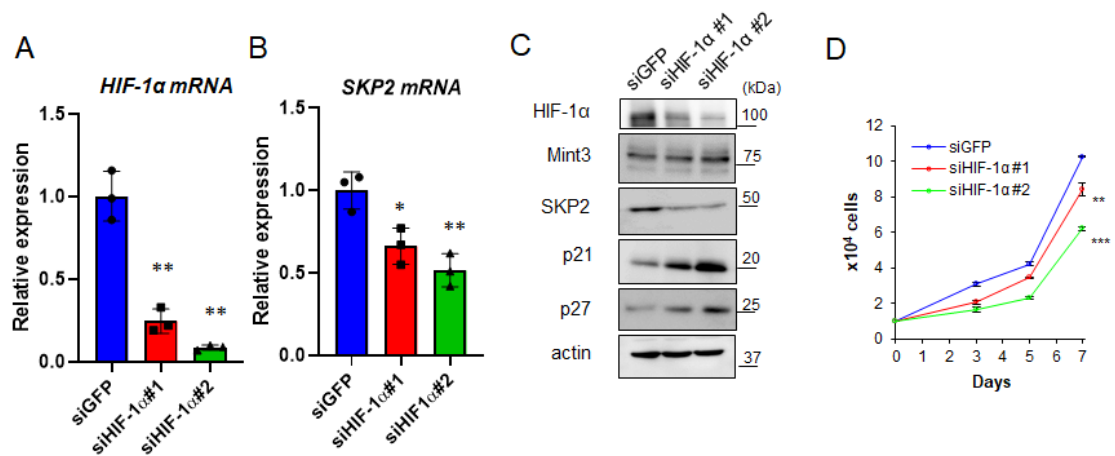
Mint3 と HIF-1 が SKP2 プロモーター活性に影響を与えるか調べるために、AsPC-1

細胞をコントロール siRNA (siGFP) もしくは Mint3 ノックダウン siRNA (siMint3) をトランスフェクションし、SKP2 プロモーター配列を用いて、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を調べた。その結果、Mint3 ノックダウンにより、SKP2 プロモーター活性が低下することが明らかとなり、また、HIF-1 $\alpha$  ノックダウンをしても同様に SKP2 プロモーター活性が低下することが明らかとなった (図 3.6.5A, B)。以上のことから、Mint3 は HIF-1 を介して SKP2 プロモーターに影響を与えることが明らかとなった。



**図 3.6.1 膵癌細胞で Mint3 発現は HIF-1 を活性化する**

AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞でコントロール (shLacZ) および Mint3 ノックダウン (shMint3#2) を行った。(A) (上段)全細胞の Mint3、FIH-1、actin のウェスタンブロット解析。(下段) 核抽出物のウェスタンブロット解析。(B) HIF-1 応答配列である HRE を用いたプロモーター活性を調べた。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ ) を示す。



**図 3.6.2 HIF-1α 抑制は AsPC-1 細胞の細胞増殖を低下させる**

AsPC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA (siGFP) と HIF-1α siRNA (siHIF-1α #1、#2) をトランスフェクションして解析を行った。(A) HIF-1α 発現に対するリアルタイム PCR 解析。(B) SKP2 mRNA 発現に対するリアルタイム PCR 解析。β-actin mRNA を内在性コントロールとして使用した。(C) HIF-1α、Mint3、SKP2、p21、p27、actin に対するウェスタンブロット解析。(D) 細胞増殖アッセイ。24 ウェルプレートに 1x10<sup>4</sup> の細胞を播種し、3、5、7 日後に細胞数を数えた。

データは平均値±S.D. (n=3)。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001) を示す。

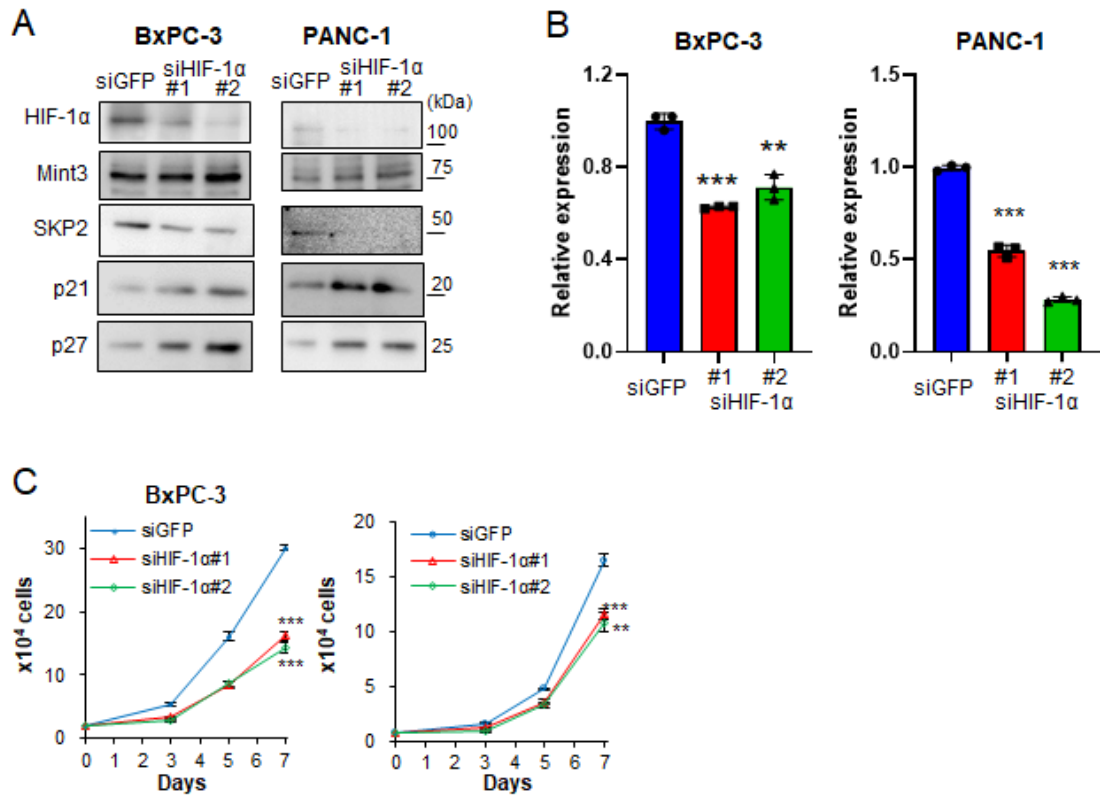
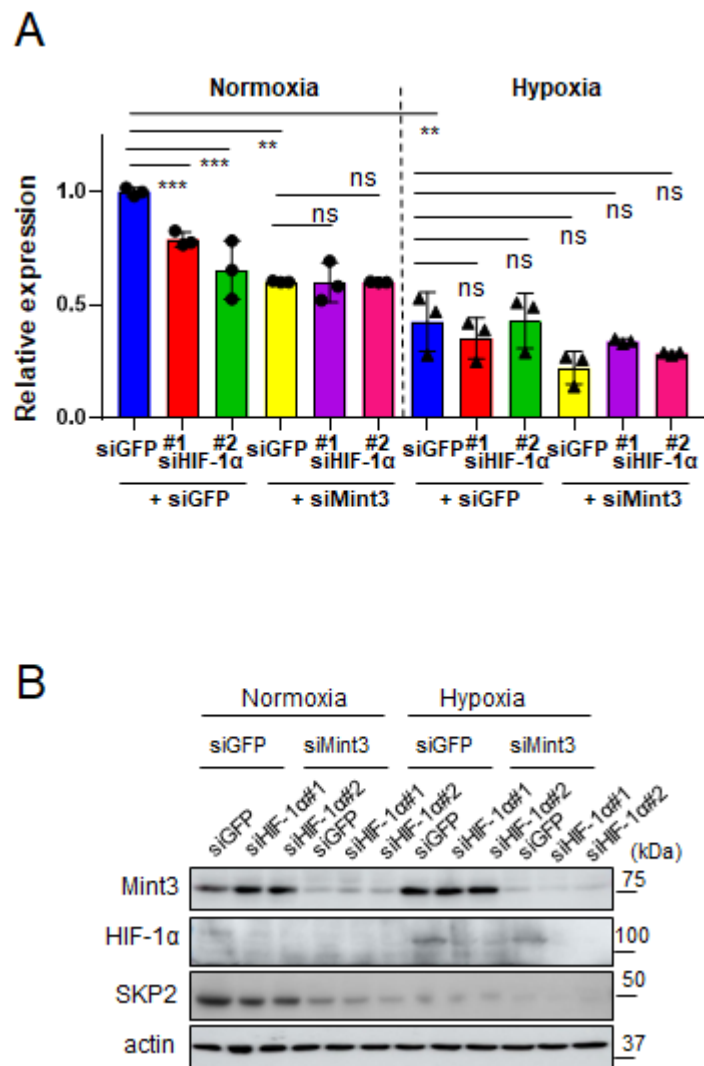


図 3.6.3 HIF-1 $\alpha$  抑制は膵癌細胞の細胞増殖を低下させる

BxPC-3 と PANC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA (siGFP) と HIF-1 $\alpha$  siRNA (siHIF-1 $\alpha$ #1、#2) をトランスフェクションして解析を行った。(A) HIF-1 $\alpha$ 、Mint3、SKP2、p21、p27、actin に対するウェスタンブロット解析。(B) SKP2 mRNA 発現に対するリアルタイム PCR 解析。 $\beta$ -actin mRNA を内在性コントロールとして使用した。(C) 細胞増殖アッセイ。24 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  の細胞を播種し、3、5、7 日後に細胞数を数えた。データは平均値  $\pm$  S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$ ) を示す。



**図 3.6.4 SKP2 mRNA は Mint3 により HIF-1 $\alpha$  依存的に制御される**

AsPC-1 細胞に一過性に siGFP、siHIF-1 $\alpha$ #1、#2、siMint3 を導入して 5 日後に解析を行った。

(A) SKP2 mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析。 $\beta$ -actin mRNA を内在性コントロールとして使用した。データは平均値 $\pm$ S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。(B) Mint3、HIF-1 $\alpha$ 、SKP2、actin に対するウェスタンブロット解析。



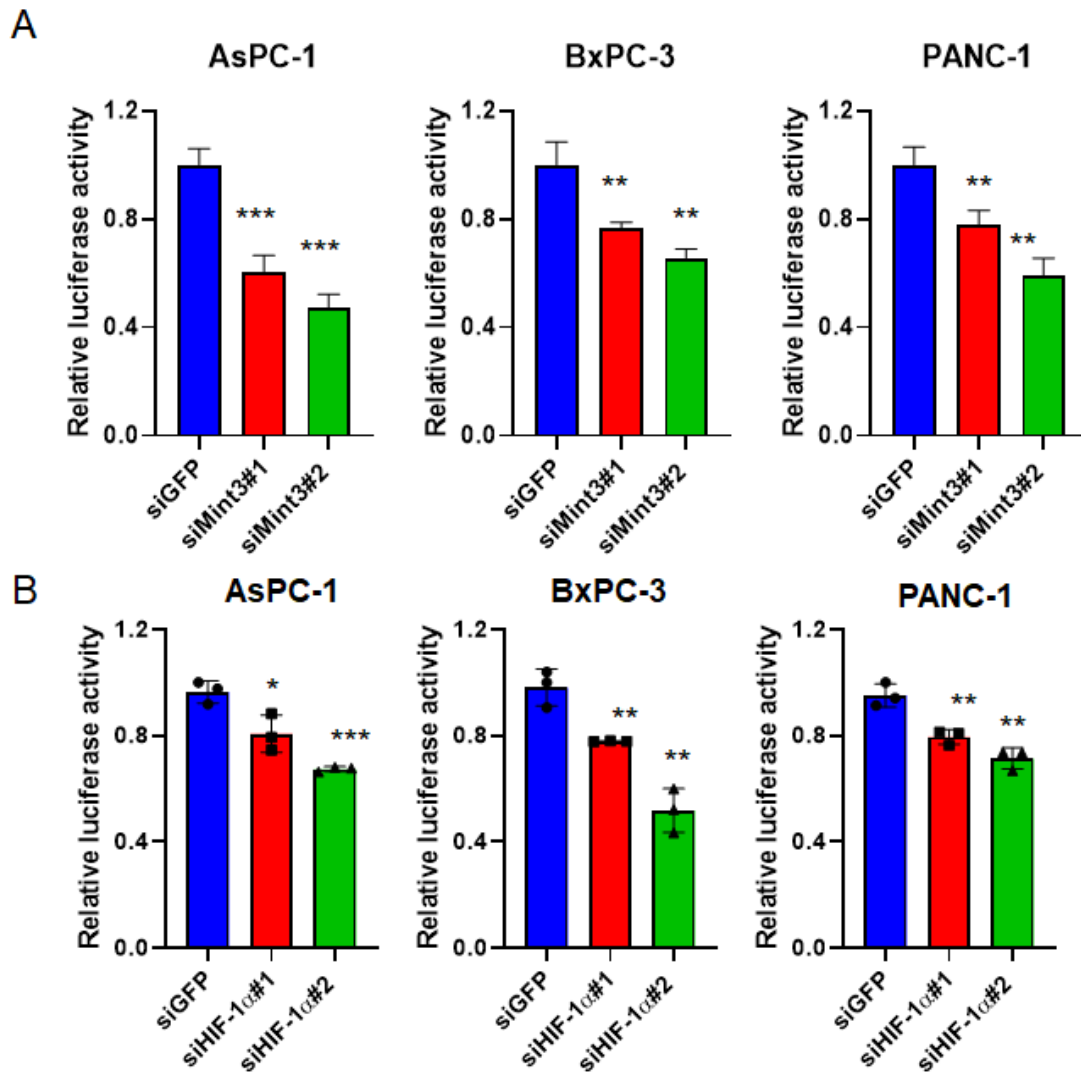


図 3.6.5 Mint3、HIF-1 ノックダウンにより SKP2 のプロモーター活性が抑制される

(A) 膵癌細胞にコントロール siRNA (siGFP) もしくは Mint3 ノックダウン siRNA (siMint3#1、#2)をトランスフェクションし、SKP2 プロモーター活性を解析した。(B) 膵癌細胞にコントロール siRNA (siGFP) もしくは HIF-1α ノックダウン siRNA (siHIF-1α#1、#2)をトランスフェクションし、SKP2 プロモーター活性を解析した。データは平均値±S.D. (n=3)。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001) を示す。

### 3.7 Mint3 ノックダウンは EMT マーカーを抑制する

ここまでの結果から膵癌細胞では、Mint3 ノックダウンにより SKP2 の mRNA 発現が低下し、p21 と p27 の発現が増加することで細胞周期が停止することが明らかとなった。膵癌の大きな問題は治療への抵抗性[63]であり、膵癌の治療への抵抗性を制御する因子として上皮間葉転換 (EMT) がある[64]。また SKP2 抑制は EMT マーカーを低下させる[50, 65]ことから、次にコントロールと Mint3 ノックダウン AsPC-1 細胞で EMT マーカーの発現に違いがあるかをウェスタンブロットで解析した (図 3.7.1)。その結果、Mint3 ノックダウン細胞では間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin、Slug が減少した。一方で、上皮系マーカーである E-cadherin に変化は見られなかった。また、BxPC-3 細胞や PANC-1 細胞でも同様に N-cadherin や Vimentin、Slug が Mint3 ノックダウンにより減少したが、細胞間によるばらつきも見られ、Slug の低下が最も顕著であった (図 3.7.2)。AsPC-1 細胞でこれらのマーカーの mRNA レベルを調べたところ、N-cadherin や Vimentin は Mint3 ノックダウンにより低下したのに対して、Slug は特に変化しなかった (図 3.7.3)。

次に、Mint3 ノックダウンによる Slug の低下が SKP2 や HIF-1 に依存するかを、ノックダウン実験により調べた。AsPC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA (siGFP) もしくは、SKP2 siRNA (siSKP2#1, #2)、HIF-1 $\alpha$  siRNA (siHIF-1 $\alpha$ #1, #2)、Mint3 siRNA (siMint3) を導入し、ウェスタンブロットで解析した (図 3.7.4)。そ

の結果、SKP2 と HIF-1 $\alpha$  のノックダウンにより顕著に Slug が減少し、さらに Mint3 ノックダウンをするとその差がほとんどなくなった。さらに Slug と SKP2 の関係をさらに確認するために、Mint3 ノックダウン細胞に SKP2 過剰発現を行うと、Slug 発現が復活した(図 3.7.5A)。また、Slug と Mint3-FIH-1 の関係を調べるために、Mint3 と FIH-1 を同時にノックダウンしたところ、Mint3 ノックダウンにより減少した Slug が Mint3 と FIH-1 同時ノックダウンすると回復した(図 3.7.5B)。さらに、Mint3 ノックダウン細胞に Mint3 を再発現させたところ、Mint3 の発現量依存的に Slug の発現が増えた(図 3.7.5C)。以上の結果から、Mint3 は FIH-1-HIF-1 $\alpha$ -SKP2 経路により Slug の発現を増加させることが示唆された。

SKP2 は p21 や p27 をプロテアソームにより分解する一方で、Twist の K63 を介するユビキチン化することでタンパクの安定化に関わる[50]。そこで、Mint3 が SKP2 を介して Twist と同じように Slug の K63 を介するユビキチン化に関わるか調べるために、Slug の免疫沈降を行い、K63 を介するユビキチン化をウェスタンブロットで解析した。その結果、Mint3 ノックダウンにより Slug の K63 を介するユビキチン化が減少することが明らかとなった(図 3.7.6)。以上のことから、Mint3 は SKP2 を介して Slug の安定化に関わることが示唆された。

### AsPC-1

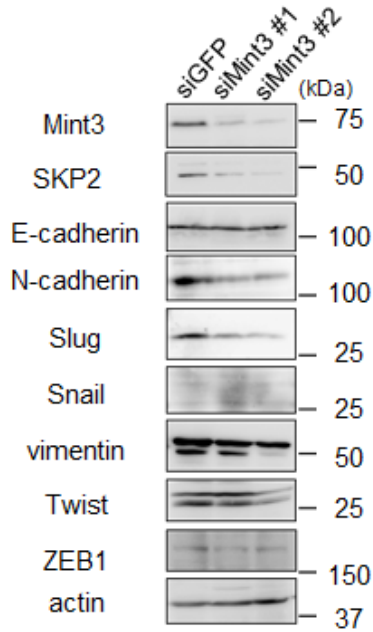


図 3.7.1 Mint3 ノックダウンは AsPC-1 細胞の間葉系マーカーを抑制する

AsPC-1 細胞の Mint3、SKP2、上皮系マーカーE-cadherin、間葉系マーカーN-cadherin、Slug、Snail、Vimentin、Twist、ZEB1、actin に対するウェスタンブロット解析。

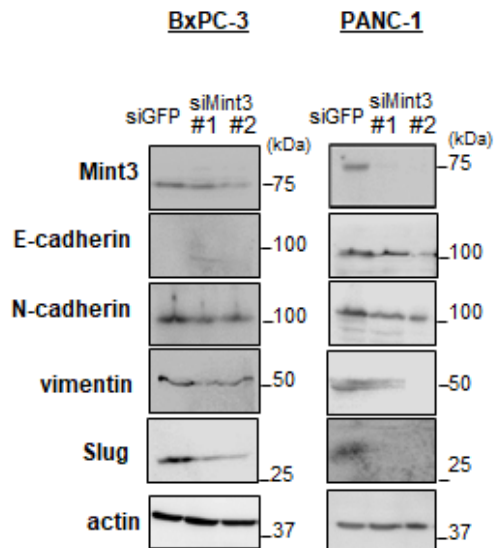


図 3.7.2 Mint3 ノックダウンは膵癌細胞の間葉系マーカーを抑制する

BxPC-3 細胞と PANC-1 細胞の Mint3、SKP2、上皮系マーカーE-cadherin、間葉系マーカーN-cadherin、Slug、Snail、Vimentin、ZEB1、actin に対するウェスタンブロット解析。

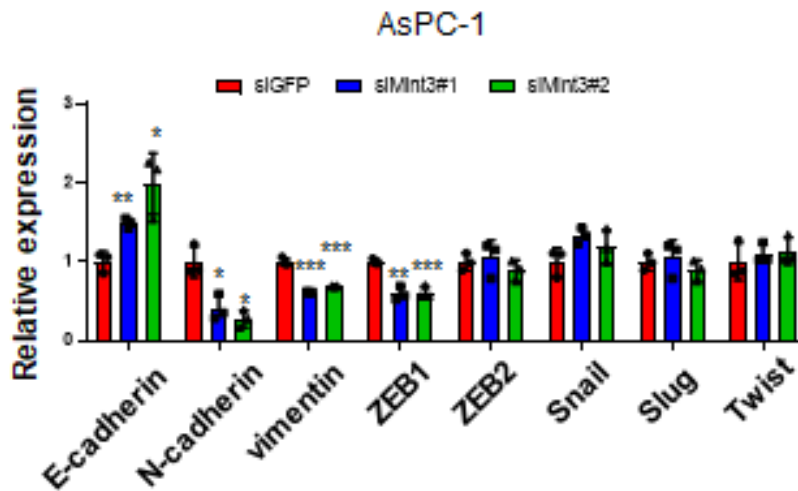


図 3.7.3 Mint3 ノックダウンは AsPC-1 細胞の間葉系マーカーを抑制する

AsPC-1 細胞の EMT マーカーのリアルタイム PCR 解析。β-actin mRNA を内在性コントロールとして使用した。データは平均値±S.D. (n=3)。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*;p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*;p<0.001) を示す。

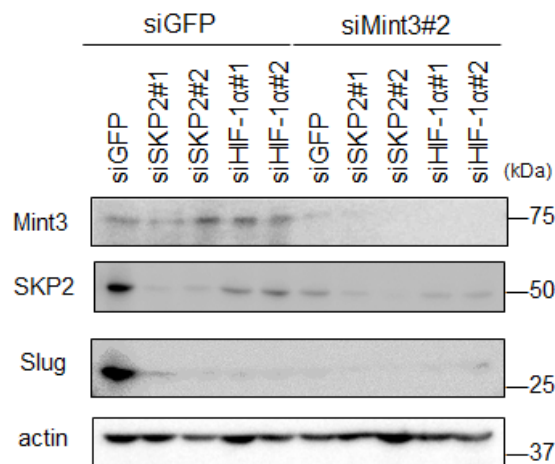


図 3.7.4 HIF-1、SKP2 ノックダウンにより Slug が減少する

AsPC-1 細胞に一過性に Mint3 siRNA (siMint3)、SKP2 siRNA (siSKP2)、HIF-1α siRNA (siHIF-1α) をトランスフェクションし、解析を行った。Mint3、SKP2、Slug、actin に対するウェスタンブロット解析。

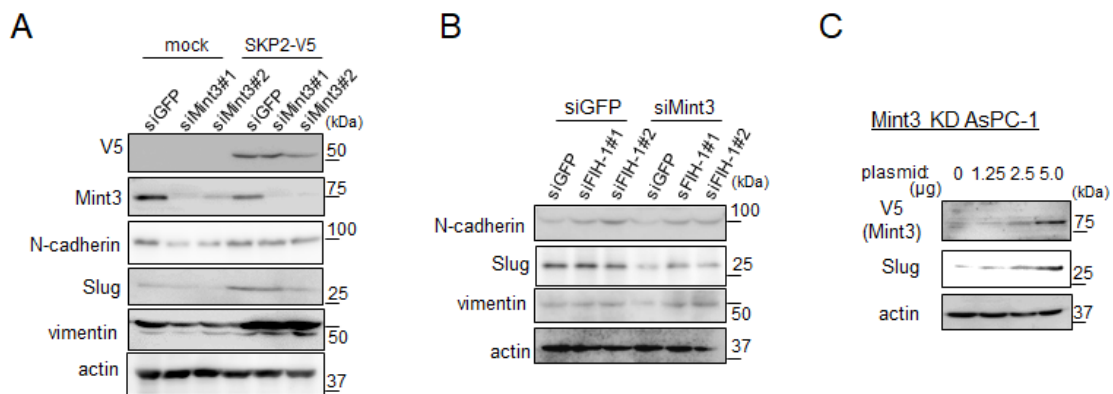


図 3.7.5 Mint3-FIH-1-SKP2 経路で Slug は制御される

(A) AsPC-1 細胞に一過性にコントロール (siGFP) もしくは Mint3 ノックダウン (siMint3) をし、さらにコントロール (mock) もしくは SKP2 (V5 タグ付) を導入し、ウェスタンブロット解析を行った。(B) AsPC-1 細胞に一過性にコントロール (siGFP) もしくは Mint3 ノックダウン (siMint3)、FIH-1 ノックダウン (siFIH-1) を行い、ウェスタンブロット解析を行った。(C) Mint3 ノックダウン細胞に Mint3-V5 を導入し、ウェスタンブロット解析を行った。

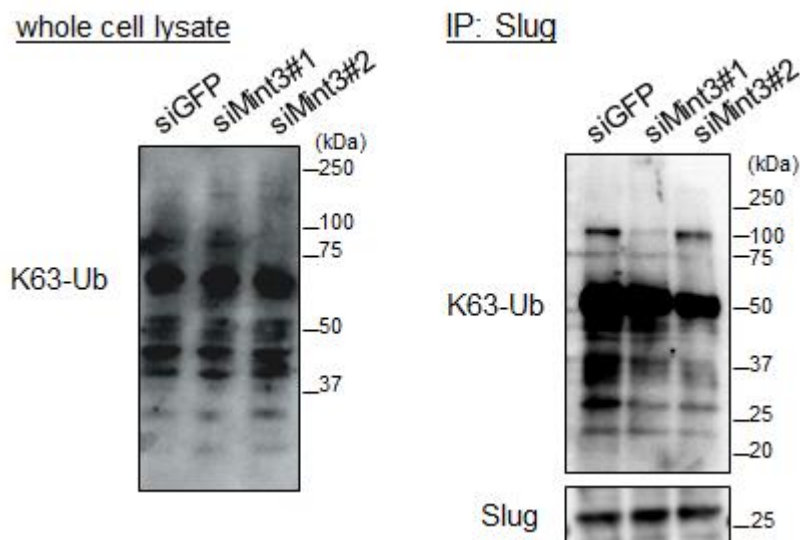


図 3.7.6 Mint3 ノックダウンは Slug の K63 を介するユビキチン化を減少させる

コントロール (siGFP) と Mint3 ノックダウン (siMint3#1, #2) AsPC-1 細胞の免疫沈降。Slug で免疫沈降を行い、K63 特異的なポリユビキチン化抗体でウェスタンブロットを行った。

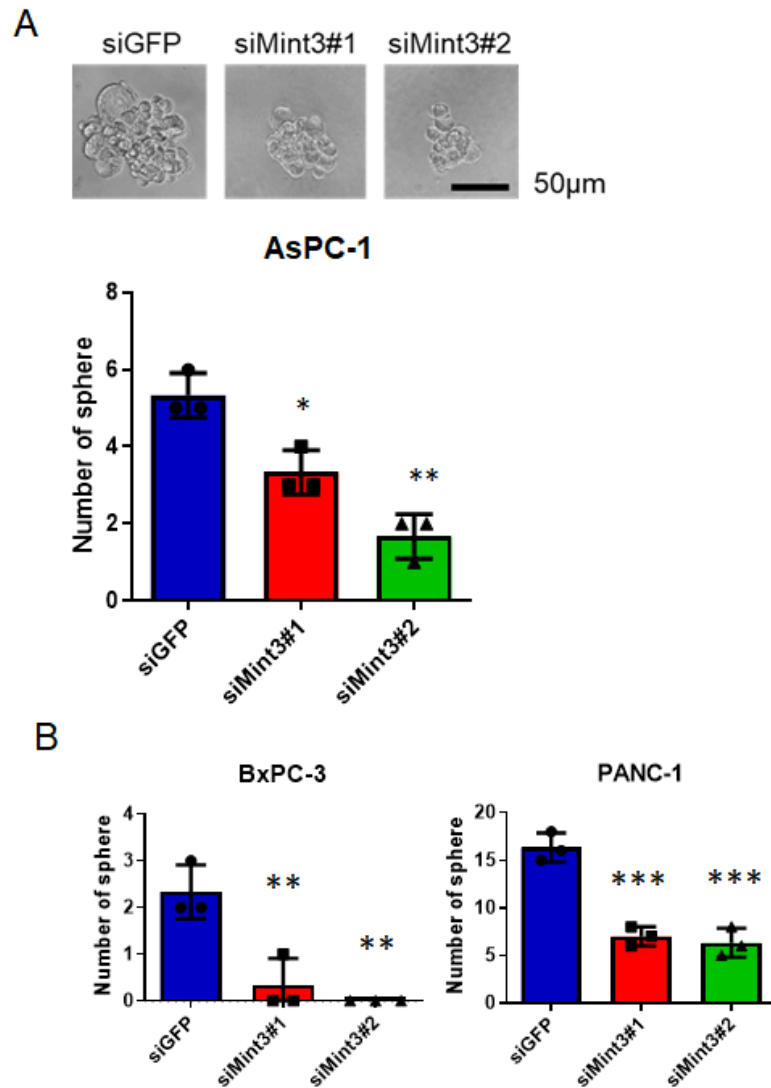
### 3.8 Mint3 ノックダウンは膵癌細胞の幹細胞性を抑制し、抗がん剤感受性を増加させる

ここまで Mint3 が部分的に EMT に関与することが示唆された。EMT は癌細胞の幹細胞性や抗がん剤感受性に関与することが知られている[66, 67]。そこで、次に Mint3 ノックダウンにより幹細胞性が変化するかをスフィアフォーメーションアッセイにより調べた。その結果、膵癌細胞で Mint3 ノックダウンによりスフィアの形成能が顕著に減少した (図 3.8.1A,B)。次に、スフィア形成能が HIF-1 $\alpha$  や SKP2 依存的かを調べるために、コントロール (siGFP) もしくは Mint3、HIF-1 $\alpha$ 、SKP2 siRNA をトランスフェクションし、スフィアフォーメーションアッセイを行った。その結果、HIF-1 $\alpha$  ノックダウンと SKP2 をノックダウンにより、スフィアの数が増加したが、さらに Mint3 ノックダウンをするとその差がなくなった (図 3.8.2)。以上のことから、Mint3 は HIF-1 $\alpha$ –SKP2 依存的にスフィア形成能を増加させることが示唆された。Mint3 はスフィア形成能に関与することから、次に癌細胞の幹細胞マーカーについてリアルタイム PCR で解析を行った。その結果、Mint3 ノックダウンにより一部の幹細胞マーカー Sox2、Nanog、LGR5 が減少したことが明らかとなった (図 3.8.3)。

つぎに、Mint3 ノックダウンにより抗がん剤感受性に影響が見られるかを調べた。近年、膵癌治療においては、Gemcitabine と Paclitaxel の併用療法が標準的な治療法

として用いられている[68]ことから、Mint3 ノックダウンした場合に Gemcitabine、Paclitaxel それぞれとその併用のときの抗がん剤感受性を調べた。その結果、AsPC-1 細胞、BxPC-3 細胞、PANC-1 細胞すべてで、Mint3 ノックダウン細胞では抗がん剤処理により生細胞が有意に減少した (図 3.8.4)。さらに膵癌細胞を様々な濃度の Gemcitabine と Paclitaxel 単剤処理をし、50%生存濃度 (IC50) を算出したところ、Mint3 ノックダウンにより IC50 が低下することが示された (図 3.8.5)。次に Mint3 による抗がん剤感受性が HIF-1 $\alpha$  や SKP2 依存적かを調べるために、コントロール (siGFP) もしくは Mint3、HIF-1 $\alpha$ 、SKP2 siRNA をトランスフェクションし、抗がん剤感受性を調べたところ、HIF-1 $\alpha$  ノックダウンや SKP2 ノックダウンによって抗がん剤感受性が増加したが、さらに Mint3 を同時にノックダウンするとその差はほとんどなくなった (図 3.8.6)。一方で、Mint3 ノックダウンにより SKP2 の発現に変動が見られなかった MDA-MB-231 細胞や HT1080 細胞においては、Mint3 ノックダウンをしても抗がん剤感受性に変化は見られなかった (図 3.8.7)。以上のことから、膵癌細胞において Mint3 ノックダウンは HIF-1 $\alpha$ –SKP2 依存的に癌幹細胞性が抑制し、抗がん剤感受性を増加させることが示唆された。





**図 3.8.1 Mint3 ノックダウンはスフィア形成能を抑制する**

(A) AsPC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA もしくは Mint3 siRNA (siMint3#1, #2) をトランスフェクションし、スフィアフォーメーションアッセイを行った顕微鏡写真と 50 µm 以上のスフィアをカウントした結果。(B) BxPC-3 細胞と PANC-1 細胞のスフィアフォーメーションアッセイ。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。

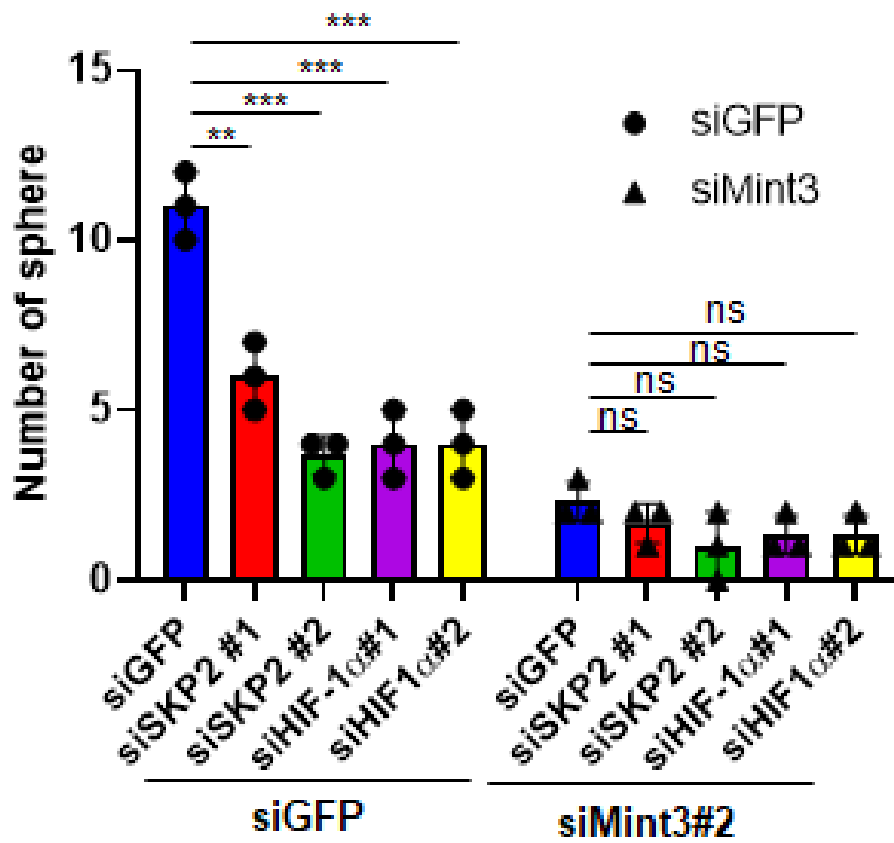


図 3.8.2 Mint3 ノックダウンは HIF-1 $\alpha$ 、SKP2 依存的にスフィア形成能を抑制する

AsPC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA もしくは Mint3 siRNA (siMint3#2) もしくは、HIF-1 $\alpha$  siRNA (siHIF-1 $\alpha$ #1, #2)、SKP2 siRNA (siSKP2#1, #2)をトランスフェクションし、スフィアフォーメーションアッセイを行い、50  $\mu$ m 以上のスフィアをカウントした。データは平均値 $\pm$ S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。

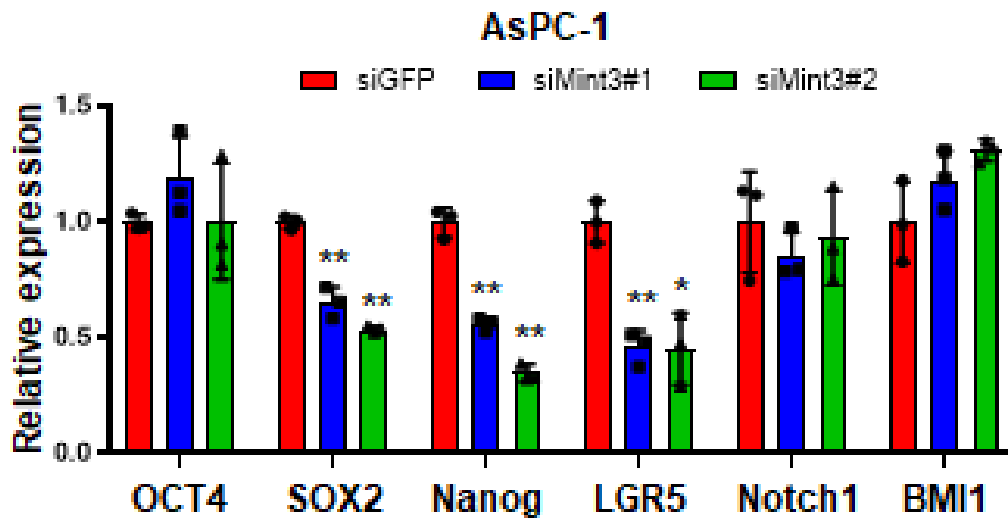


図 3.8.3 Mint3 ノックダウンにより癌幹細胞マーカーの mRNA 発現が抑制される

AsPC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA もしくは Mint3 siRNA (siMint3#1, #2) をトランスフェクションし、リアルタイム PCR により解析した。β-actin mRNA を内在性コントロールとして使用した。データは平均値±S.D. (n=3)。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001) を示す。

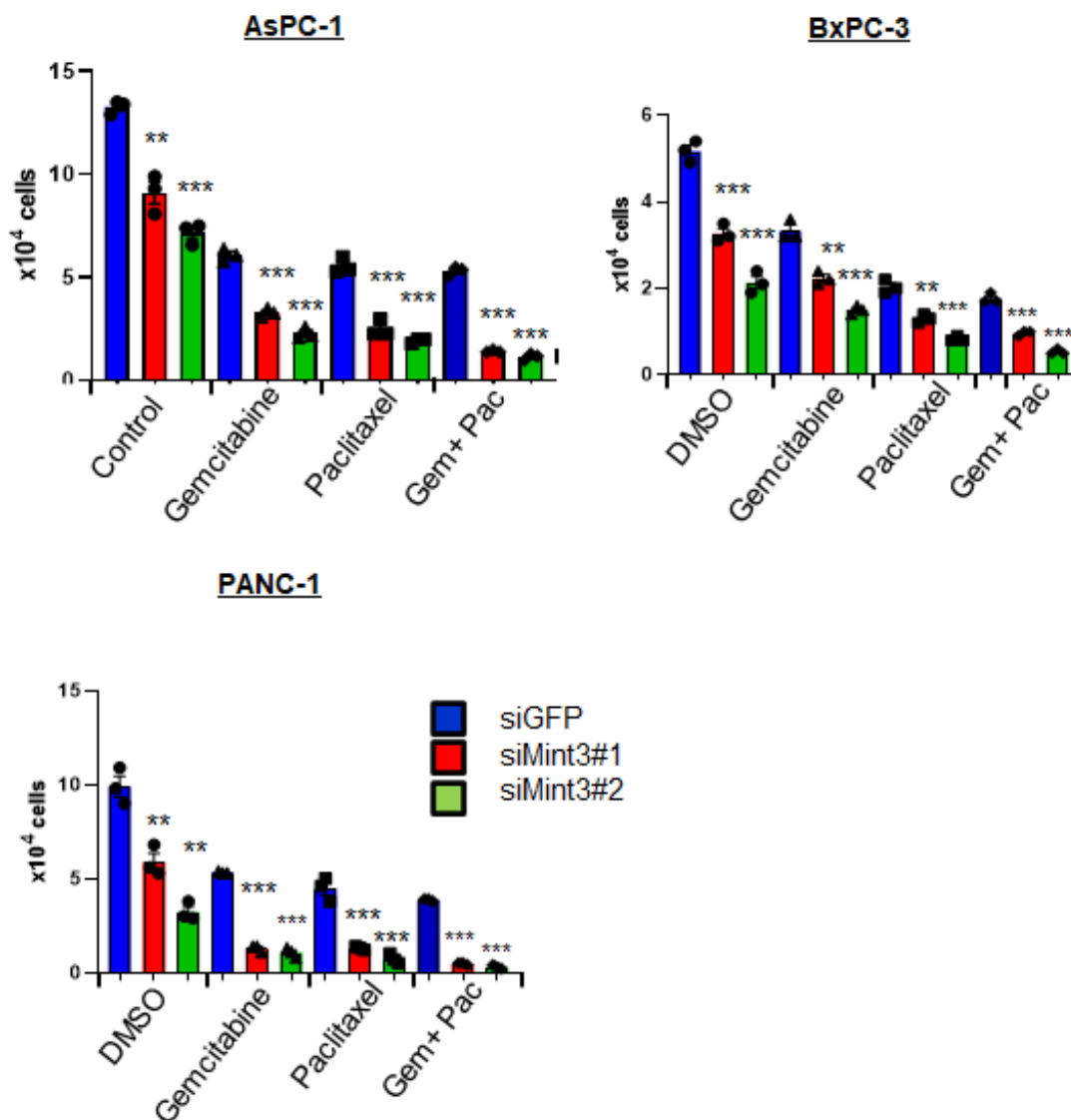


図 3.8.4 Mint3 ノックダウンにより膵癌細胞の抗がん剤感受性が抑制される

AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA (siGFP) もしくは Mint3 siRNA (siMint3#1, #2) をトランスフェクションし、3 日間コントロールの溶媒のみ、もしくは Gemcitabine (AsPC-1 と PANC-1 は 50  $\mu$ M、BxPC-3 は 50 nM) もしくは Paclitaxel (AsPC-1 と PANC-1 は 50  $\mu$ M、BxPC-3 は 5 nM) もしくは両方で処理し、細胞数を測定した。データは平均値  $\pm$  S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。

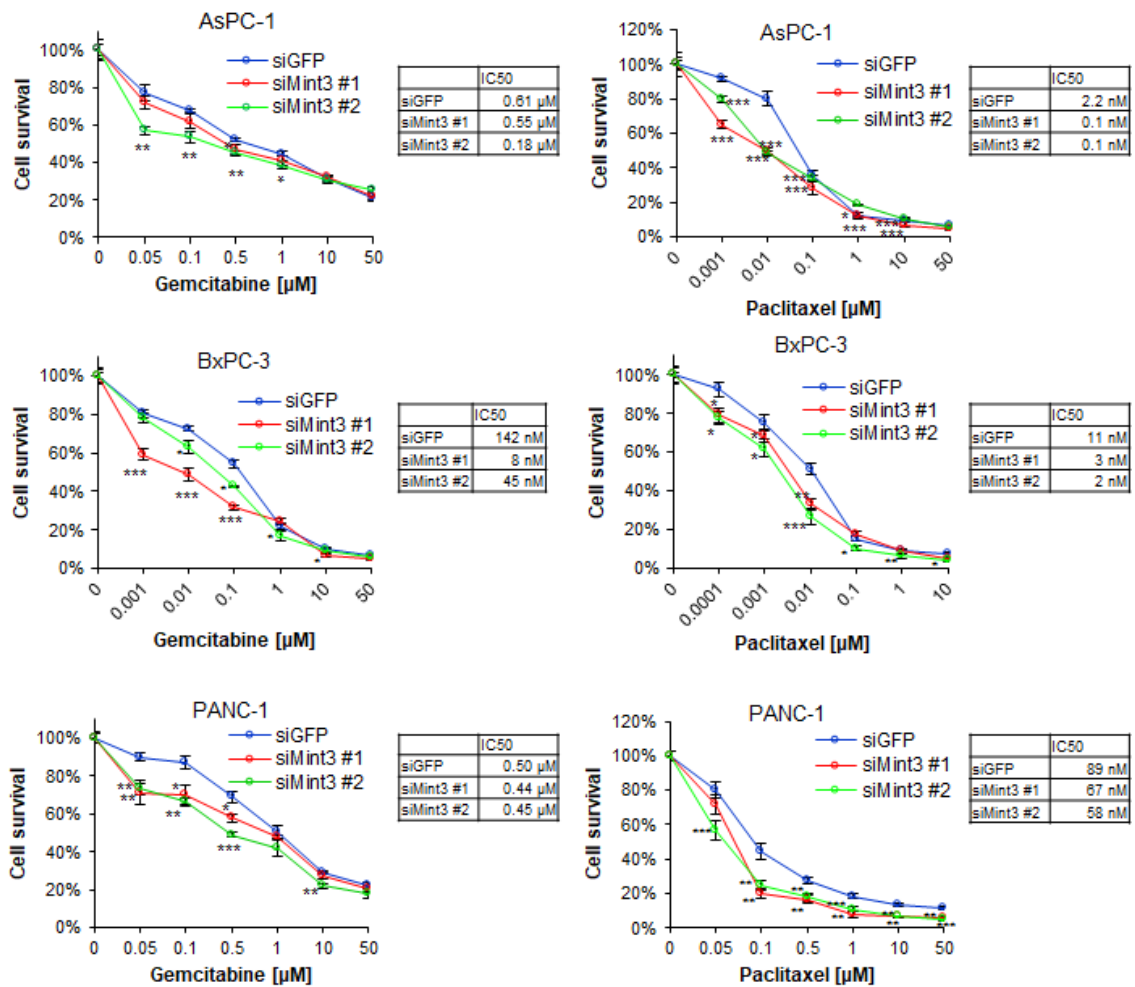


図 3.8.5 Mint3 ノックダウンにより抗がん剤感受性が抑制される

AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA (siGFP) もしくは Mint3 siRNA (siMint3#1, #2) をトランスフェクションし、3 日間 Gemcitabine もしくは Paclitaxel で処理し、細胞数を測定した。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。

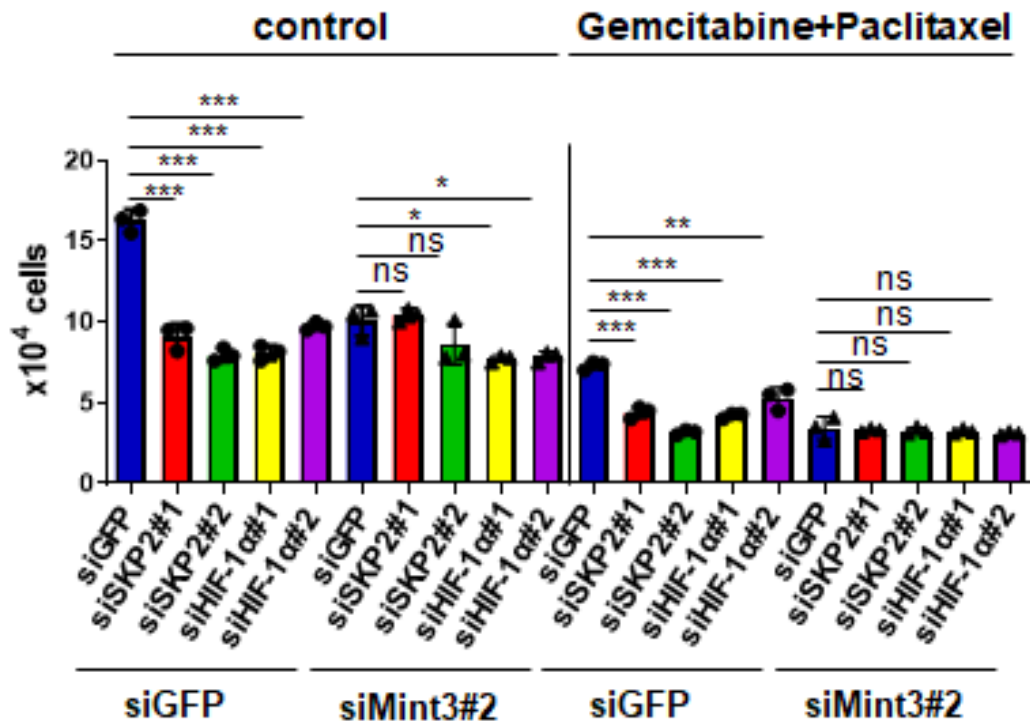


図 3.8.6 Mint3 ノックダウンは HIF-1 $\alpha$ 、SKP2 依存的に抗がん剤感受性を増加させる

AsPC-1 細胞に一過性にコントロール siRNA もしくは Mint3 siRNA (siMint3#2)、HIF-1 $\alpha$  siRNA (siHIF-1 $\alpha$ #1, #2)、SKP2 siRNA (siSKP2#1, #2)をトランスフェクションし、コントロールの溶媒のみもしくは 50  $\mu$ M Gemcitabine+50  $\mu$ M Paclitaxel で 3 日間処理し、細胞数を測定した。データは平均値 $\pm$ S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。

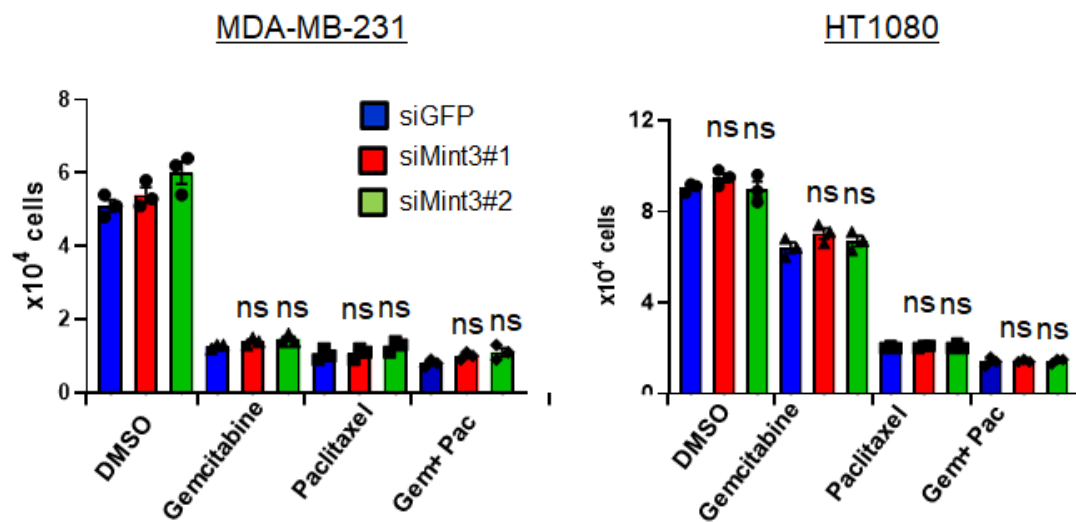


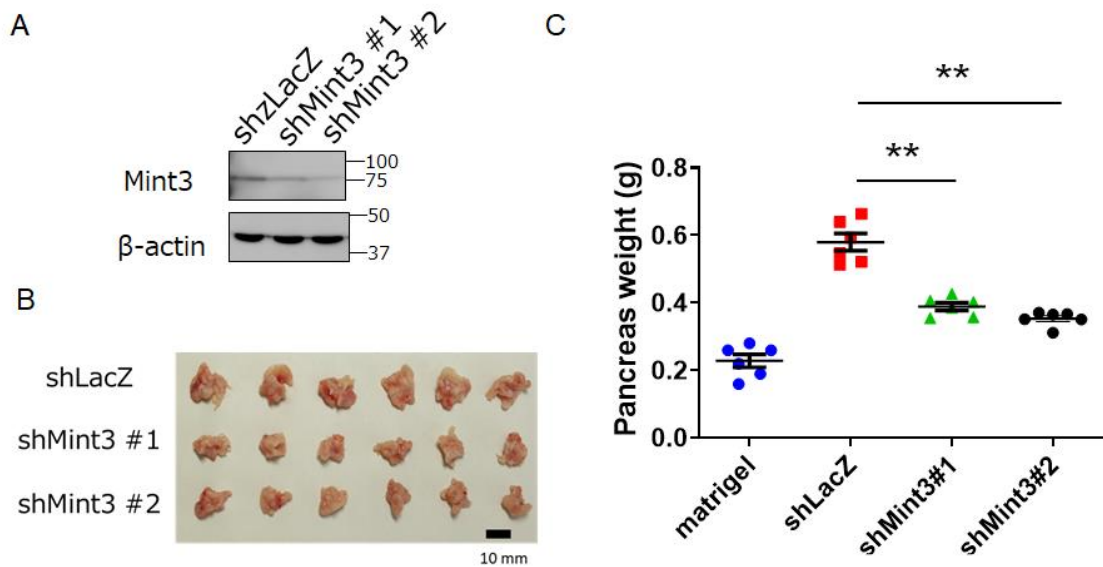
図 3.8.7 Mint3 ノックダウンにより SKP2 が影響を受けない細胞では抗がん剤感受性は変化しない

MDA-MB-231 細胞と HT1080 細胞に一過性にコントロール siRNA (siGFP) もしくは Mint3 siRNA (siMint3#1, #2) をトランスフェクションし、3 日間 50 nM Gemcitabine もしくは 50 nM Paclitaxel もしくは両方で処理し、細胞数を測定した。データは平均値±S.D. ( $n=3$ )。\*は両側検定による t 検定の統計的な有意差 (\*\*;  $p<0.01$ , \*\*\*;  $p<0.001$ ) を示す。

### 3.9 Mint3 ノックダウンは膵臓同所移植モデルの造腫瘍能を抑制する

膵臓同所移植モデルを使用してコントロール(shLacZ)および Mint3 ノックダウン (shMint3) AsPC-1 細胞の造腫瘍能の検討を行った。正常な膵臓を含めて重量を測定した結果、Mint3 ノックダウン細胞を移植したマウスの膵臓はコントロール細胞と比較して重量が有意に低下していた (図 3.9.1)。次に、膵臓腫瘍組織のパラフィン切片を HE 染色、および抗 Mint3、HIF-1 $\alpha$ 、SKP2、p21、p27 抗体を用いた免疫組織染色にて解析した (図 3.9.2)。抗 Mint3 抗体を用いた染色では Mint3 ノックダウン細胞を移植した組織中において Mint3 陽性部位が減少し、ノックダウンが確認された。また、抗 HIF-1 $\alpha$  抗体を用いた染色では Mint3 ノックダウンによる変化は認められなかった。抗 SKP2 抗体を用いた染色では、*in vitro* での実験結果と一致して、Mint3 ノックダウンの組織において SKP2 陽性領域が減少した。逆に、p21 と p27 は Mint3 ノックダウン組織において p21 陽性、p27 陽性領域が増加した。以上のことから、膵臓同所移植したモデルマウスにおいても、Mint3 ノックダウンにより SKP2 の減少と、p21 と p27 の増加が認められた。次に、この切片について EMT マーカーについて調べたところ、細胞レベルでの実験結果 (図 3.7.1) に一致して、Mint3 ノックダウンしたときに N-cadherin と Vimentin、Slug の発現が低下することが明らかとなった (図 3.9.3)。以上の結果から、マウスモデルにおいて Mint3 ノックダウンは造腫瘍能を抑制し、EMT マーカーが減少することが明らかとなった。





**図3.9.1 Mint3ノックダウン細胞はヒト膵癌AsPC-1細胞の腫瘍形成能を抑制する**

コントロール (shLacZ) と Mint3 ノックダウン (shMint3 #1、#2) AsPC-1 細胞を移植し、4 週間後膵臓を摘出し重量を測定した。(A) 移植に使用したコントロール (shLacZ) と Mint3 ノックダウン (shMint3 #1、#2) AsPC1 細胞の Mint3 のウェスタンブロット解析。(B) 摘出した膵臓の写真。(C) 摘出した膵臓の重量。データは平均値±S.D. (マトリジェルは  $n=5$ 、それ以外は  $n=6$ )。P 値はマン=ホイットニーの U 検定。\*\* $p<0.01$ 。

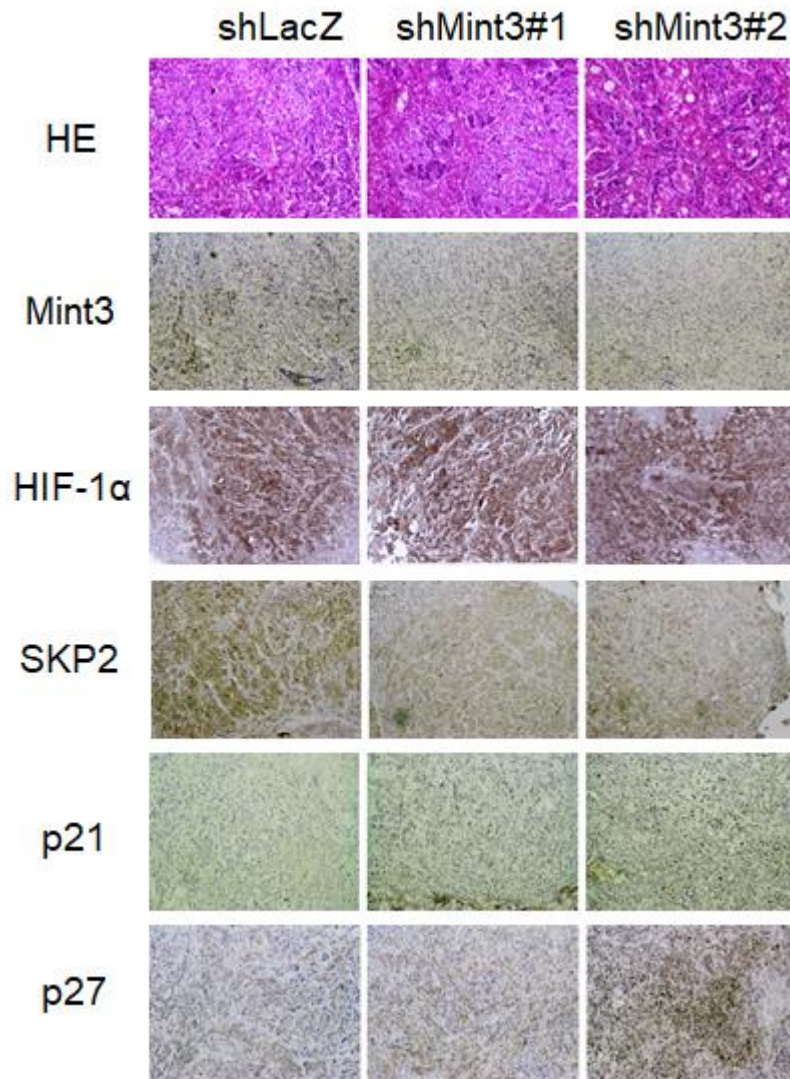


図 3.9.2 Mint3 ノックダウン細胞の同所移植による腫瘍組織切片は SKP2 が減少し p21 が増加する

1×10<sup>6</sup> の AsPC-1 細胞のコントロール (shLacZ) と Mint3 ノックダウン (shMint3 #1、#2) 細胞を移植4週間後に摘出した組織のパラフィン包埋切片の抗 Mint3、抗 HIF-1α、抗 SKP2、抗 p21、抗 p27 抗体に対する免疫組織学的解析。

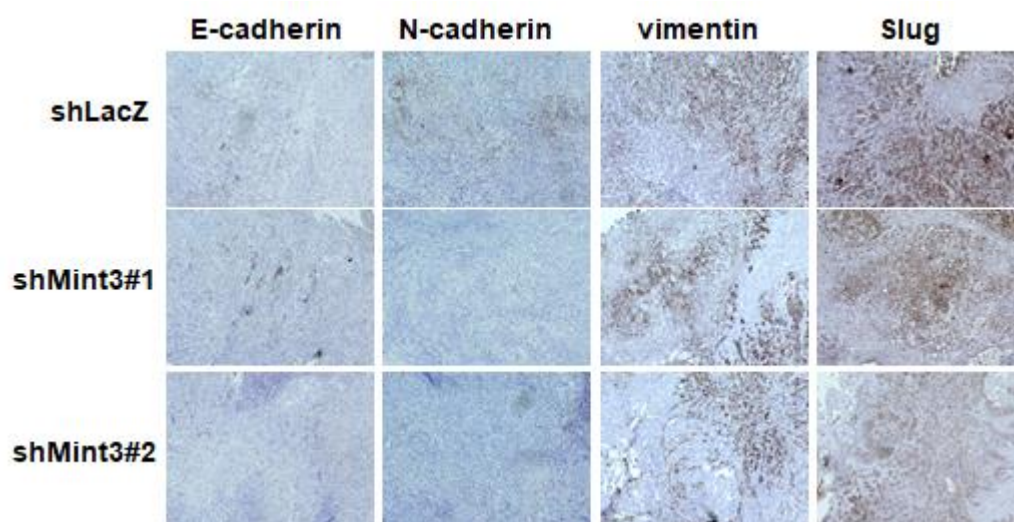


図 3.9.3 Mint3 ノックダウン細胞の同所移植による腫瘍組織切片は EMT マーカーの発現が減少する

1×10<sup>6</sup>の AsPC-1 細胞のコントロール (shLacZ) と Mint3 ノックダウン (shMint3 #1、#2) 細胞を移植 4 週間後に摘出した組織のパラフィン包埋切片の抗 E-cadherin、抗 N-cadherin、抗 vimentin、抗 Slug 抗体に対する免疫組織学的解析。

### 3.10 Mint3 ノックダウンは膵臓同所移植モデルの抗がん剤感受性を増加する

ここまでで、Mint3 ノックダウンが *in vitro* において抗がん剤感受性を増加させること、また *in vivo* においては Mint3 ノックダウンにより造腫瘍能が低下することが明らかとなった。そこで、次に膵臓同所移植モデルにおいて Mint3 ノックダウンが抗がん剤感受性に影響するかを調べた。コントロール (shLacZ) もしくは Mint3 ノックダウン (shMint3) した AsPC-1 細胞を移植したマウスに、移植後 1 週間から週 2 回 Gemcitabine と Paclitaxel の共投与し、4 週間後にマウス膵臓の重量を比較した。その結果、Mint3 ノックダウン AsPC-1 細胞移植マウスに、Gemcitabine と Paclitaxel 共投与のときの膵臓重量は、コントロール shLacZ 細胞移植マウスの膵臓重量に比べて有意に低下し、マトリジェル投与マウスの膵臓重量と同程度になることが明らかとなった (図 3.10)。以上のことから、Mint3 ノックダウンはマウスモデルにおいても抗がん剤感受性を増加させることが示された。

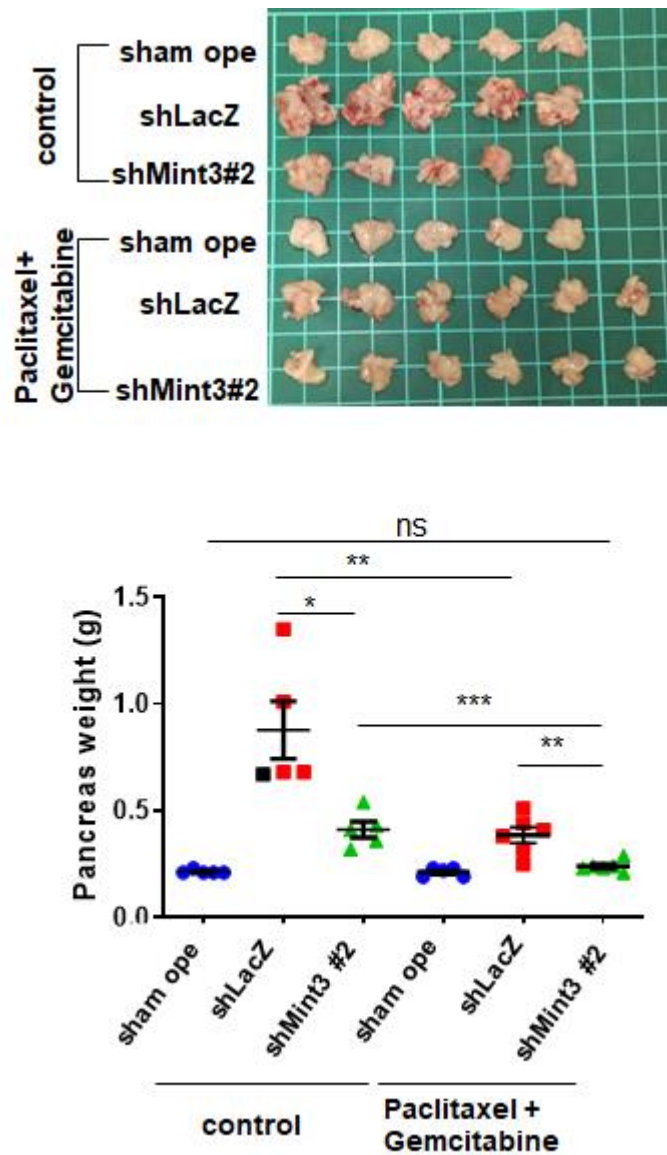


図 3.10 Mint3 ノックダウンは同所移植モデルマウスの抗がん剤感受性を増加する

免疫不全マウスにマトリジェル、もしくはコントロール (shLacZ) AsPC-1 細胞、Mint3 ノックダウン (shMint3#2) AsPC-1 細胞を移植し、1 週間後から溶媒のみもしくは Paclitaxel (2.5 mg/kg) と Gemcitabine (25 mg/kg) を1 週間に2 回、4 週間投与し、膵臓を摘出し重量を測定した。(上段) 摘出した膵臓の写真。(下段) 摘出した膵臓の重量。データは平均値±S.D.(各グループ  $n=5$  から 6)。P 値はマン=ホイットニーの U 検定。\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$ 、\*\*\* $p<0.001$ 。

### 3.11 ヒト膵癌では Mint3 発現が高いほどに予後不良である

最後に、ウェブデータベース R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<https://r2.amc.nl>) を使用して、ヒト膵癌における Mint3 の発現と予後の解析を行った。その結果、Mint3 の発現が高いほど、膵癌患者の予後が悪くなることが明らかとなった (図 3.11A)。また、Mint3 (*APBA3*) と *SKP2* の mRNA 発現相関を調べたところ、Mint3 の発現が高くなるほどに *SKP2* の発現が高くなる傾向にあり、相関係数  $R=0.319$  と弱く相関していることが明らかとなった (図 3.11B)。

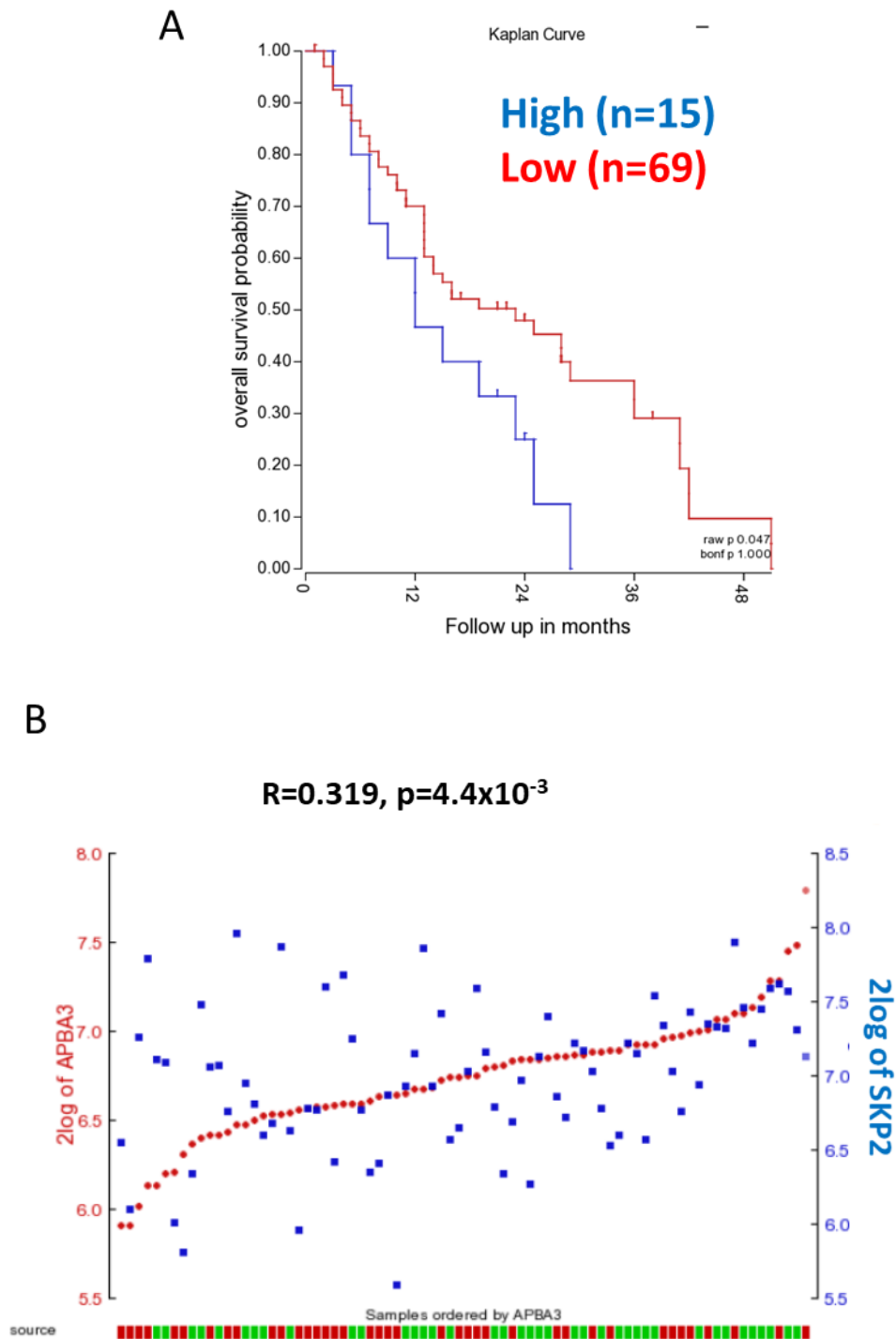


図 3.11 ヒト膵癌における Mint3 の発現解析

R<sup>2</sup>によるヒト膵癌発現解析。(A) RNA シーケンス dataset (Zhang 90)。Mint3 の発現と予後の関係。(B) The Cancer Genome Atlas database の Badaea 78 dataset。APBA3 (Mint3) と SKP2 の発現相関。相関係数  $R=0.319$ 、 $P=4.4 \times 10^{-3}$ 。

## 4 考察

本研究では膀胱癌において Mint3 の機能を解析し、癌治療の標的となりうるか評価した。その結果、Mint3 は HIF-1 を介して SKP2 の発現を促進し、p21 と p27 のプロテアソームによる分解を引き起こしていることが明らかとなった。

### 4.1 Mint3 による膀胱癌特異的な細胞周期制御

膀胱癌細胞で Mint3 をノックダウンすると SKP2 の発現が低下し、細胞周期停止を引き起こした。これまで、Mint3 は乳癌 MDA-MB-231 細胞や線維肉腫 HT1080 細胞で造腫瘍能に寄与するものの、細胞増殖には影響を及ぼさないと報告[32, 33]されていることから、Mint3 による細胞周期制御は膀胱癌細胞特異的なメカニズムであることが示唆された。実際、Mint3 ノックダウンでは MDA-MB-231 細胞や HT1080 細胞の SKP2 mRNA レベルに変化がなかったことから、Mint3 による SKP2 mRNA 発現制御の有無が、膀胱癌細胞でのみ Mint3 が細胞増殖を制御する原因だと考えられる。また、本研究で使用した膀胱癌細胞株はいずれも MDA-MB-231 細胞や HT1080 細胞に比べ SKP2 タンパクの発現レベルが低かった。The Cancer Genome Atlas (NIH) による癌種による SKP2 の発現を調べると、膀胱癌は相対的に SKP2 の発現が少ないことが分かる (図 4.1)。以上のことから、他の癌に比べ SKP2 発現の低い膀胱癌では、Mint3-HIF-1-HIF-1 経路を介して十分に SKP2 mRNA の転写が促進されることが、細胞増殖に大きな影響を与えている可能性が考えられる。Mint3 による HIF-1 の活



性化には癌特異的に発現している MT1-MMP が必要であると報告されている[33]が、実際に正常膵臓腺房細胞においては、MT1-MMP の発現は低く、Mint3 ノックダウンによる SKP2 の発現に変化は認められなかったことから、Mint3 による SKP2 の制御は膵癌特異的であると言える。本研究で使用した 4 種類のヒト膵癌細胞株の主な遺伝子変異と分化や転移状態[60]を表 4.1、4.2 に示す。遺伝子変異に関しては、膵癌で 9 割以上に見られる Kras 活性型変異や p16、SMAD4 は細胞株によって異なることから、これらの遺伝子変異による影響は膵癌特異的な Mint3 の SKP2 発現制御の原因にはなり得ないことが示唆される。一方、使用した 4 種類の膵癌細胞株で p53 の不活変異は共通していたが、p53 の不活変異は乳癌 MDA-MB-231 細胞にも見られる（データベース COSMIC ; [https://cancer.sanger.ac.uk/cell\\_lines](https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines) より）ことから、p53 不活性変異も、Mint3 による SKP2 発現制御の膵癌特異性の原因ではないことが推定される。さらに、使用した 4 種類の膵癌細胞株の分化度や由来となる患者の転移の有無にも一貫性はなかったことから、分化度・転移の有無も膵癌特異的に Mint3 が SKP2 を制御される原因にはなりにくい。Mint3 による SKP2 の転写促進は膵癌細胞固有の機構であることが推測されるが、そのメカニズムについては今後さらなる解析が必要である。

#### 4.2 Mint3 は膵癌細胞で SKP2 の発現を促進し、p21 と p27 タンパクを分解する

SKP2 は、細胞周期抑制因子である p21、p27、p57、p130 のほかに、細胞周期を促

進する E2F1、CyclinD、CyclinE、Myc など分解することが知られている[69]。本研究では Mint3 ノックダウンにより SKP2 の発現が低下し、膵癌細胞の細胞周期停止が引き起こされたことから、膵癌細胞での SKP2 は、細胞周期関連タンパクの分解を介して全体としては細胞周期促進の役割を果たしていると考えられる。本研究において Mint3 ノックダウン細胞で p21、p27 タンパクは K48 を介するポリユビキチン化が減少しその結果プロテアソームによる分解が減少したため、顕著に増加したことが膵癌細胞の細胞増殖低下に大きく影響していると示唆されたが、SKP2 の基質として報告されているその他の細胞周期関連分子が、膵癌細胞で Mint3/SKP2 によりどの程度分解制御を受けているかについてはさらなる検討が必要である。

#### 4.3 Mint3 による HIF-1 を介した SKP2 の転写制御

先行研究において、SKP2 は、Notch1-CBF1、IKK-NF- $\kappa$ B、PI3K-Akt-E2F1、FoxM1 などの経路により転写が活性化する[69]ことが報告されているが HIF-1 による SKP2 の制御に関する報告はされていない。本研究においては、Mint3 が SKP2 のプロモーター活性に関わり、HIF-1 が間接的もしくは直接的に SKP2 の制御に関わることを明らかにした。Luo らはヒト肺動脈平滑筋細胞において低酸素によりリン酸化 Akt の増加により SKP2 の転写が促進されたことなどを報告[70]しており、Xia らは SKP2 の転写促進する FoxM1 が HIF-1 $\alpha$ により転写促進されることが報告[71]している。HIF-1 は Akt のリン酸化を促進する[72]ことや、SKP2 が Akt-E2F1 の経

路により転写が増加する[69]ことから、直接転写を促進していること以外にも HIF-1 が Akt などを通して SKP2 を間接的に転写促進していることも考えられる。また、HIF-1 も SKP2 も解糖系を促進する[16],[49]ことから、HIF-1 が直接 SKP2 の転写を促進する以外にも、これらの分子が相互作用して腫瘍形成を促進している可能性も考えられる。HIF-1 による SKP2 の制御についてはさらなる解析が必要である。

#### 4.4 Mint3 ノックダウンは EMT マーカーを抑制

Mint3 ノックダウンにより間葉系マーカーである、N-cadherin、Vimentin、Slug のタンパクが低下していることが明らかとなった。本研究では Mint3 が HIF-1 $\alpha$  や SKP2 依存的に Slug を制御していることを見出した。SKP2 は K48 を介したユビキチン化によるタンパク分解のほか、SKP2 は K63 を介したユビキチン化により Akt[49] や Twist[50]を安定化することが報告されている。本研究においては、Mint3 ノックダウンにより Twist に顕著な変化は見られなかったが、Slug の K63 を介するポリユビキチン化が低下していたことから、膵癌細胞において Mint3 は Slug タンパクの安定性に関わることが明らかとなった。

EMT マーカーに関しては、膵癌細胞において細胞による程度の違いはあったものの、Mint3 ノックダウンにより N-cadherin や Vimentin なども低下していた。Akt や Twist は膵癌で EMT を促進することが知られており[73, 74]、Mint3 による膵癌

細胞の EMT 制御に、SKP2 による Akt/Twist の安定化が関わるかなどの検討も必要である。また、HIF-1 も SKP2 も EMT に関わる因子の発現を促進することから[65, 75, 76]、Mint3 による膵癌細胞の EMT 促進が SKP2 の発現増加によるものか、それとも SKP2 以外の HIF-1 標的遺伝子の発現を介したもののなのか、更なる解析も必要である。

#### 4.5 Mint3 ノックダウンは膵癌の抗がん剤感受性を増加する

EMT は抗がん剤の治療抵抗性に関わること[64]、SKP2 抑制すると間葉系マーカーが減少し、抗がん剤への感受性が増加すること[49, 56, 77]、SKP2 抑制により紡錘体チェックポイント分子 Mad2 の発現が低下し、微小管障害系の抗がん剤パクリタキセルの感受性が増加する[56]ことが報告されていたが、本研究において Mint3 ノックダウンにより HIF-1 $\alpha$  や SKP2 依存的に膵癌細胞の抗がん剤感受性が増加した。細胞増殖が低下した細胞は抗がん剤が効きにくいことはよく知られているが、Mint3 ノックダウン膵癌細胞においては、細胞増殖の抑制と Gemcitabine と Paclitaxel への感受性の向上が認められた。これは、G0/G1 周期停止の細胞は一部であり、それよりも EMT が減少したことにより抗がん剤感受性への寄与のほうが多いためであると考えられる。

#### 4.6 Mint3 ノックダウンは膵臓同所移植モデルの造腫瘍能を抑制する

これまで乳癌 MDA-MB-231 細胞や線維肉腫 HT1080 細胞の皮下移植モデルにおい

て、Mint3 ノックダウンにより腫瘍形成能が抑制されることが知られていた[32, 33]。本研究では膵癌同所移植においても Mint3 ノックダウンにより腫瘍形成能が抑制されることが明らかとなった。先行研究における皮下移植実験[32]に比べると、コントロールと Mint3 ノックダウンの差が小さかった。これは、パラフィン切片解析結果で Mint3 ノックダウン細胞が正常な腺房も含まれていることから分かるように、正常な膵臓ごと腫瘍を摘出したことに起因すると考えられる。腫瘍特異的に検出する方法としては、腺房や導管細胞特異的に発現する CK19 の染色などを行うことで、腫瘍の割合を定量することができると考えられる。

また、マウス同所移植モデルにおいても Mint3 ノックダウンによる抗がん剤感受性の増加が認められ、Mint3 ノックダウンした細胞を移植したマウスに抗がん剤を投与するとコントロールのマトリジェル移植したマウスの膵臓の重量と同程度になっていることが明らかとなり、治療への標的としての可能性が示唆された。

#### 4.7 Mint3 の治療標的としての可能性

本研究において、Mint3 は細胞増殖を亢進させ、EMT や幹細胞性に関わることが *in vitro* および *in vivo* の実験から明らかになり、Mint3 は治療標的となりうることが示唆された。現在 HIF-1 を標的とした治療薬の開発が進んでいるが、臨床研究段階である。HIF-1 は正常な臓器の維持や発達に必要であり、HIF-1 のノックアウトマウスが胎生致死である[23]ことから、HIF-1 を標的とすることは副作用という面

から課題が多く残る。また、SKP2 ノックアウトマウスは、腫瘍形成しにくいものの、細胞増殖低下による発育不全[78]、精子の受精力の低下[79]、p27 の異常蓄積による倍数体細胞の増加や中心体の異常複製[78]などが報告されていることから、SKP2 も治療標的としては副作用が懸念される。一方、Mint3 ノックアウトマウスは目立った異常が無く[30]、Mint3 自体はユビキタスに発現をしているものの、その活性には癌で発現が上昇している MT1-MMP の発現が必要不可欠であることから、正常組織に大きな影響を及ぼさずに膵癌特異的に治療できる可能性が示唆される。実際に、正常膵臓腺房細胞においては Mint3 ノックダウンにより SKP2 や p21、p27 に変化は認められなかった。本研究において、Mint3 抑制により膵癌細胞はアポトーシスではなく G0/G1 期細胞周期停止を誘導した。SKP2 は膵癌においてアポトーシス誘導に対して抵抗性を示す[80]こと、SKP2 抑制はハーセプチンやパクリタキセルなどの抗がん剤への感受性を増加させる[49], [56]など報告されており、実際に Mint3 ノックダウンにより Gemcitabine/Paclitaxel への感受性が向上したことから、Mint3 阻害は抗がん剤との併用により治療に貢献できる可能性が示唆された。いくつかの HIF-1 と SKP2 の阻害剤は現在臨床研究段階[19, 81]であり膵癌治療の標的として期待されているが、Mint3 を標的とすることで膵癌特異的に HIF-1、SKP2 を抑制できることから、副作用の少ない膵癌治療法が期待できる。しかしながら、現在のところ Mint3 の阻害剤に関しては市販されている薬剤がなく、今後、Mint3

の阻害剤の開発や、存在する薬剤のうち Mint3 を阻害できる薬剤の探査の必要がある。

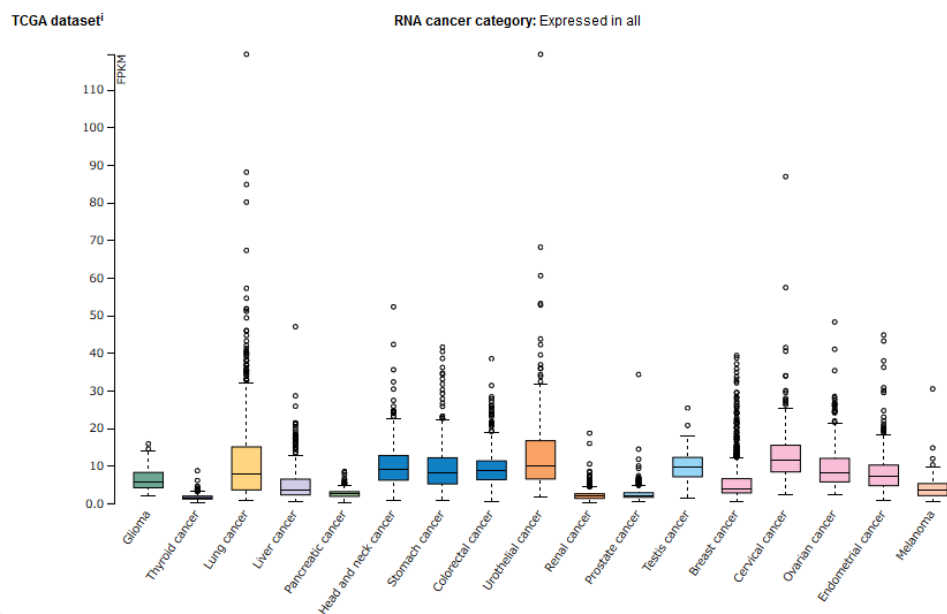


図 4.1 さまざまな癌種における SKP2 発現 (The Cancer Genome Atlas より)

表 4.1 ヒト膵癌細胞株の主な変異 (文献 34 から抜粋)

	<b>KRAS*</b>	<b>TP53</b>	<b>CDKN2A/p16</b>	<b>SMAD4/DPC4</b>
<b>AsPC-1</b>	12Asp	135 Δ1 bp8 Intron 4 Δ200 bp splice site, HD exon	WT \$2 bp HD	WT HD 100Thr
<b>BxPC-3</b>	WT	220 Cys	WT HD	HD
<b>PANC-1</b>	12Asp	273His 273Cys	HD	WT
<b>MiaPaCa-2</b>	12 Cys	248 Trp	HD	WT

\*KRAS はエクソン 1 についてのみ示す。WT は野生型、Δ は欠損、HD はホモ欠損を示す。

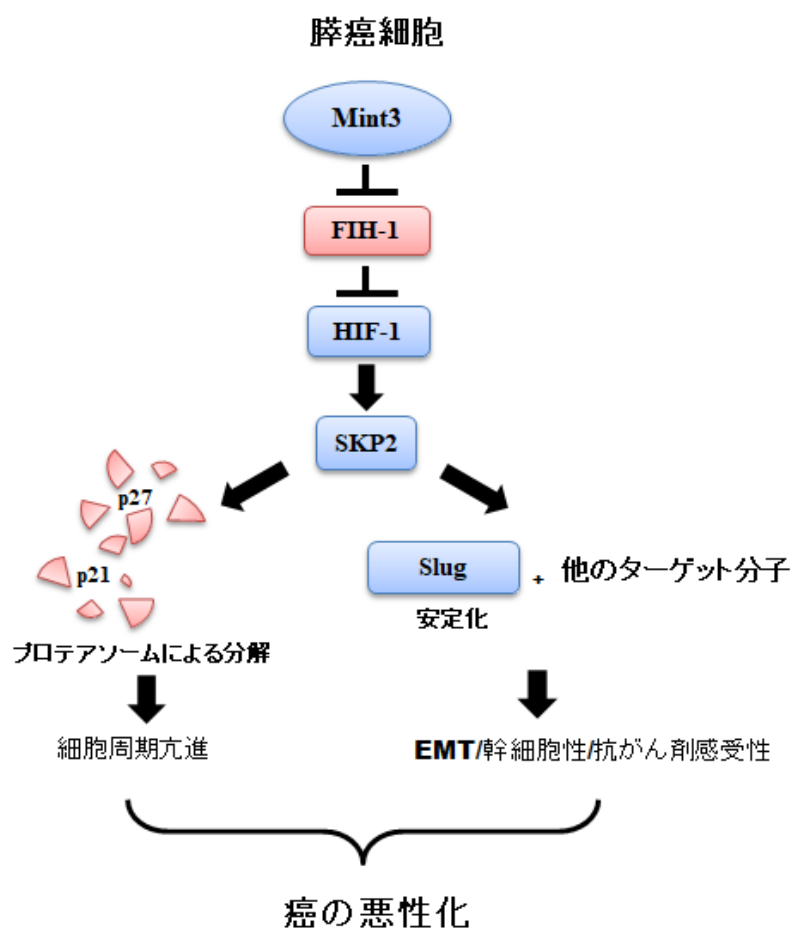
表 4.2 膵癌細胞提供者の情報 (文献 34 から抜粋)

	年齢	性別	由来	転移	分化
<b>AsPC-1</b>	<b>62</b>	女性	腹水	有	未分化
<b>BxPC-3</b>	<b>61</b>	女性	原発巣	無	中程度の分化
<b>PANC-1</b>	<b>56</b>	女性	原発巣	有	未分化
<b>MiaPaCa-2</b>	<b>65</b>	男性	原発巣	不明	未分化



## 5 総括

本研究では、膵癌細胞において Mint3 が HIF-1 を活性化し、SKP2 の mRNA の発現を促進することで、細胞周期抑制因子 p21 と p27 の分解を導いていることを示した。また、Mint3 は EMT や幹細胞性、抗がん剤抵抗性に関わることが明らかとなった。マウス同所移植モデルにおいて、Mint3 は膵癌の腫瘍形成能を促進することが明らかとなり、データベースを用いた解析から、ヒト膵癌においては Mint3 発現が高いほどに予後不良であることが明らかとなった。以上の結果から、Mint3 は膵癌治療の標的になる可能性が示唆された。



## 6 參考資料

1. Horii M, M.T., Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, et al., *Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project*. Japanese journal of clinical oncology. .
2. Perera, R.M. and N. Bardeesy, *Pancreatic Cancer Metabolism: Breaking It Down to Build It Back Up*. Cancer Discov, 2015. **5**(12): p. 1247-61.
3. Matsuda, T. and A. Matsuda, *Five-year relative survival rate of pancreas cancer in the USA, Europe and Japan*. Jpn J Clin Oncol, 2014. **44**(4): p. 398-9.
4. Wörmann, S.M. and H. Algül, *Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 282.
5. Lynch, H.T., et al., *Familial pancreatic cancer: a review*. Semin Oncol, 1996. **23**(2): p. 251-75.
6. Morris, J.P., S.C. Wang, and M. Hebrok, *KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 683-95.
7. Bardeesy, N. and R.A. DePinho, *Pancreatic cancer biology and genetics*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(12): p. 897-909.
8. Hidalgo, M., *Pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2010. **362**(17): p. 1605-17.
9. Shibaji, T., et al., *Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer*. Anticancer Res, 2003. **23**(6C): p. 4721-7.
10. Ye, L.Y., et al., *Hypoxia-inducible factor 1a expression and its clinical significance in pancreatic cancer: a meta-analysis*. Pancreatology, 2014. **14**(5): p. 391-7.
11. Brown, J.M. and W.R. Wilson, *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 437-47.
12. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
13. Keith, B., R.S. Johnson, and M.C. Simon, *HIF1a and HIF2a: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression*. Nat Rev Cancer, 2011. **12**(1): p. 9-22.
14. Semenza, G.L., *The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(3): p. 382-391.
15. Gu, Y.Z., et al., *Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha*. Gene Expr, 1998. **7**(3): p. 205-13.
16. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p.

- 1469-80.
17. Semenza, G.L., *Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 47-71.
  18. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(4): p. 207-14.
  19. Vaupel, P. and A. Mayer, *Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 225-39.
  20. Sobhanifar, S., et al., *Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in perinecrotic regions of solid tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7259-66.
  21. Kuschel, A., P. Simon, and S. Tug, *Functional regulation of HIF-1alpha under normoxia--is there more than post-translational regulation?* J Cell Physiol, 2012. **227**(2): p. 514-24.
  22. Paolicchi, E., et al., *Targeting hypoxic response for cancer therapy*. Oncotarget, 2016. **7**(12): p. 13464-78.
  23. Kotch, L.E., et al., *Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death*. Dev Biol, 1999. **209**(2): p. 254-67.
  24. Stroka, D.M., et al., *HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2445-53.
  25. Hu, Y., J. Liu, and H. Huang, *Recent agents targeting HIF-1alpha for cancer therapy*. J Cell Biochem, 2013. **114**(3): p. 498-509.
  26. Han, J., et al., *Interaction of Mint3 with Furin regulates the localization of Furin in the trans-Golgi network*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2217-23.
  27. Miller, C.C., et al., *The X11 proteins, Abeta production and Alzheimer's disease*. Trends Neurosci, 2006. **29**(5): p. 280-5.
  28. Sakamoto, T. and M. Seiki, *Mint3 enhances the activity of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in macrophages by suppressing the activity of factor inhibiting HIF-1*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30350-9.
  29. Nakaoka, H.J., et al., *NECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumourigenicity of Cancer Cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22784.
  30. Ho, A., et al., *Genetic analysis of Mint/X11 proteins: essential presynaptic functions of a neuronal adaptor protein family*. J Neurosci, 2006. **26**(50): p. 13089-101.
  31. Hara, T., et al., *Deletion of the Mint3/Apba3 gene in mice abrogates macrophage functions and increases resistance to lipopolysaccharide-induced septic shock*. J Biol Chem, 2011. **286**(37): p. 32542-51.
  32. Sakamoto, T., D. Niiya, and M. Seiki, *Targeting the Warburg effect that arises in tumor*

- cells expressing membrane type-1 matrix metalloproteinase.* J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14691-704.
33. Sakamoto, T., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 regulation through cross talk between mTOR and MT1-MMP.* Mol Cell Biol, 2014. **34**(1): p. 30-42.
  34. Nakaoka, H.J., et al., *Mint3-mediated L1CAM expression in fibroblasts promotes cancer cell proliferation via integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and tumour growth.* Oncogenesis, 2017. **6**(5): p. e334.
  35. Hara, T., et al., *Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(22): p. E4416-E4424.
  36. Bhoj, V.G. and Z.J. Chen, *Ubiquitylation in innate and adaptive immunity.* Nature, 2009. **458**(7237): p. 430-7.
  37. Komander, D. and M. Rape, *The ubiquitin code.* Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 203-29.
  38. Swatek, K.N. and D. Komander, *Ubiquitin modifications.* Cell Res, 2016. **26**(4): p. 399-422.
  39. Carrano, A.C., et al., *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(4): p. 193-9.
  40. Yu, Z.K., J.L. Gervais, and H. Zhang, *Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11324-9.
  41. Kamura, T., et al., *Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10231-6.
  42. Marti, A., et al., *Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(1): p. 14-9.
  43. Bhattacharya, S., et al., *SKP2 associates with p130 and accelerates p130 ubiquitylation and degradation in human cells.* Oncogene, 2003. **22**(16): p. 2443-51.
  44. Hiramatsu, Y., et al., *Degradation of Tob1 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitination.* Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8477-83.
  45. Kim, S.Y., et al., *Skp2 regulates Myc protein stability and activity.* Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1177-88.
  46. Huang, H., et al., *Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1649-54.
  47. Méndez, J., et al., *Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication.* Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 481-91.
  48. Kondo, T., et al., *Rapid degradation of Cdt1 upon UV-induced DNA damage is mediated by SCFSkp2 complex.* J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27315-9.

49. Chan, C.H., et al., *The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis*. Cell, 2012. **149**(5): p. 1098-111.
50. Ruan, D., et al., *Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist*. Oncogene, 2017. **36**(30): p. 4299-4310.
51. Reichert, M., et al., *Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4149-56.
52. Schneider, G., et al., *IKKalpha controls p52/RelB at the skp2 gene promoter to regulate G1- to S-phase progression*. EMBO J, 2006. **25**(16): p. 3801-12.
53. Wang, Z., et al., *Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer*. Front Oncol, 2012. **1**(57).
54. Gstaiger, M., et al., *Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5043-8.
55. Einama, T., et al., *High-level Skp2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: correlation with the extent of lymph node metastasis, higher histological grade, and poorer patient outcome*. Pancreas, 2006. **32**(4): p. 376-81.
56. Huang, T., et al., *Inhibition of Skp2 sensitizes lung cancer cells to paclitaxel*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 439-446.
57. Sakamoto, T. and M. Seiki, *Integrated functions of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in regulating cancer malignancy: Beyond a proteinase*. Cancer Sci, 2017. **108**(6): p. 1095-1100.
58. Jung, Y.S., Y. Qian, and X. Chen, *Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity*. Cell Signal, 2010. **22**(7): p. 1003-12.
59. Vervoorts, J. and B. Lüscher, *Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1)*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(20): p. 3255-64.
60. Deer, E.L., et al., *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2010. **39**(4): p. 425-35.
61. Bornstein, G., et al., *Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25752-7.
62. Sandelin, A., et al., *JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D91-4.
63. Vaccaro, V., et al., *Emerging pathways and future targets for the molecular therapy of pancreatic cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2011. **15**(10): p. 1183-96.
64. Gaianigo, N., D. Melisi, and C. Carbone, *EMT and Treatment Resistance in Pancreatic Cancer*. Cancers (Basel), 2017. **9**(9).

65. Chan, C.H., et al., *Pharmacological inactivation of Skp2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression*. Cell, 2013. **154**(3): p. 556-68.
66. Nieto, M.A., et al., *EMT: 2016*. Cell, 2016. **166**(1): p. 21-45.
67. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(10): p. 611-629.
68. Ciliberto, D., et al., *Role of gemcitabine-based combination therapy in the management of advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomised trials*. Eur J Cancer, 2013. **49**(3): p. 593-603.
69. Chan, C.H., et al., *Regulation of Skp2 expression and activity and its role in cancer progression*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 1001-15.
70. Luo, Y., et al., *Tanshinone IIA inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via Akt/Skp2/p27-associated pathway*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56774.
71. Xia, L.M., et al., *Transcriptional up-regulation of FoxM1 in response to hypoxia is mediated by HIF-1*. J Cell Biochem, 2009. **106**(2): p. 247-56.
72. Mao, Y., et al., *Twist2 promotes ovarian cancer cell survival through activation of Akt*. Oncol Lett, 2013. **6**(1): p. 169-174.
73. Xu, W., Z. Yang, and N. Lu, *A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition*. Cell Adh Migr, 2015. **9**(4): p. 317-24.
74. Chen, S., et al., *Hypoxia induces TWIST-activated epithelial-mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in nude mice*. Cancer Lett, 2016. **383**(1): p. 73-84.
75. Zhang, W., et al., *HIF-1 $\alpha$  Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129603.
76. Higgins, D.F., et al., *Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3810-20.
77. Yang, Y., et al., *Skp2 is associated with paclitaxel resistance in prostate cancer cells*. Oncol Rep, 2016. **36**(1): p. 559-66.
78. Nakayama, K., et al., *Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication*. EMBO J, 2000. **19**(9): p. 2069-81.
79. Fotovati, A., K. Nakayama, and K.I. Nakayama, *Impaired germ cell development due to compromised cell cycle progression in Skp2-deficient mice*. Cell Div, 2006. **1**: p. 4.
80. Schöler, S., et al., *SKP2 confers resistance of pancreatic cancer cells towards TRAIL-induced apoptosis*. Int J Oncol, 2011. **38**(1): p. 219-25.

81. Morrow, J.K., et al., *Targeting ubiquitination for cancer therapies*. *Future Med Chem*, 2015. 7(17): p. 2333-50.

この論文のデータの一部は<Kanamori, A., et al., Mint3 depletion restricts tumor malignancy of pancreatic cancer cells by decreasing SKP2 expression via HIF-1. *Oncogene*, 2020. 39(39): p. 6218-6230.>で発表された。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導いただきました東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野 村上善則教授、分子発癌分野 井上純一郎教授、病態医療科学分野 内丸薫教授に深謝申し上げます。また、直接ご指導いただいた坂本毅治准教授には、学術支援職員時代から大変お世話になり、深く感謝申し上げます。本研究の遂行にお力添えいただきました、中岡寛樹博士、林哲郎氏、鄭裕花氏、福井優也氏、Floriane Paquian 氏に心から感謝申し上げます。研究生活において様々な面でご協力いただいた東京大学医科学研究所分子発癌分野と人癌病因遺伝子分野の皆様には感謝いたします。

最後に、この学生生活を支えてくれた夫に感謝します。