

論文の内容の要旨

論文題目 膵癌における HIF 活性化分子 Mint3 の機能解析

氏名 金森 茜

【研究背景】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り、治療法の開発が早急な課題である。低酸素誘導性因子 HIF-1 (Hypoxia inducible factor) は膵癌を含めてさまざまな癌において過剰発現し、予後不良と関連することが示唆されており、膵癌の治療標的として近年注目を集めている。しかし、HIF-1 は正常な臓器の発生や維持に必要な分子であることから、HIF-1 を標的とした多くの治療薬は有害事象の報告がされている。Mint3 は通常酸素下で、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。そこで本研究は、膵癌での 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。

【結果】HIF-1 は低酸素下で活性化することが知られているが、増殖因子やがん遺伝子などによっても活性化することが報告されている。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 の標的遺伝子はあまり分かっていない。そこで、膵癌同所移植モデルにおいて、低酸素領域と HIF-1 α の関係を調べるために、低酸素マーカー pimonidazole と HIF-1 α 、増殖マーカーである Ki67 の染色を行った (図1)。その結果、HIF-1 α と Ki67 陽性領域、解剖前に尾静脈注射することで血管付近を可視化した Hoechst33342 陽性領域はほとんど重なっていたが、pimonidazole 陽性領域とはあまり重なっていなかった。以上のことから、膵癌において HIF-1 α 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、増殖がさかんであることが示唆された。

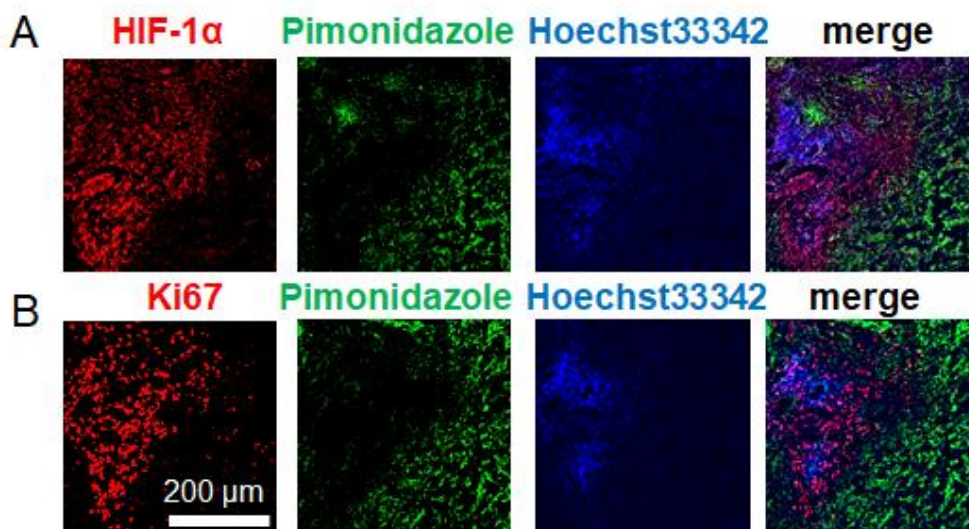


図1 マウス膵癌同所移植切片の染色

次に膀胱癌細胞において Mint3 の機能を調べるために、Mint3 を安定的にノックダウンしたところ、細胞増殖が低下することが明らかとなった。その原因を調べたところ、アポトーシスではなく、G0/G1 期で細胞周期停止していることが明らかとなった。さらに細胞周期関連タンパク質をウェスタンブロットにより調べたところ、細胞周期のブレーキ役であるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 と p27 タンパクが増加していることが示された (図 2)。p21 と p27 は主に転写促進による mRNA レベルの制御とプロテアソームでの分解によるタンパクレベルの制御が知られる。そこで、p21 と p27 の mRNA 発現を調べたところ発現に変化は認められなかった。一方、p21 と p27 の K48 を介するポリユビキチン化は、Mint3 ノックダウン細胞において低下することが明らかとなった。さらに、p21 と p27 をプロテアソームによる分解を引き起こすことが知られているユビキチンリガーゼ S-phase Kinase Associated Protein2 (SKP2) 発現を調べたところ Mint3 ノックダウン細胞で mRNA、タンパク共に低下することが明らかになった。以上のことから、Mint3 は膀胱癌において SKP2 の発現を促進し、p21 と p27 の分解を引き起こすことが示唆された。

次に、Mint3 による SKP2 の制御について調べた。先行研究において Mint3 は FIH-1 抑制を介して HIF-1 を活性化すると報告されているが、これに一致して Mint3 は FIH-1 の抑制を介して HIF-1 を活性化し、SKP2 の発現を促進していることが示された。また、Mint3 による SKP2 の発現促進は、膀胱癌細胞について認められたが、正常な膀胱腺房細胞では認められなかった。その原因として Mint3 のタンパク発現の差ではなく Mint3 が HIF-1 活性化のために必要な MT1-MMP の発現が関与していることが示唆された。さらに、乳癌細胞や線維肉腫細胞においては、Mint3 ノックダウンしても、SKP2、p21、p27 の発現に変動は見られなかったことから、Mint3 による SKP2 の制御は膀胱癌特異的であることが示唆された。

次に、Mint3 の膀胱癌悪性化における機能を調べた。膀胱癌の大きな問題は抗がん剤抵抗性であり、これを制御する因子として上皮間葉転換 (EMT) がある。そこで Mint3 ノックダウン細胞の EMT マーカーのタンパク発現を調べたところ、コントロール細胞と比較して Slug が顕著に低下し、N-cadherin や Vimentin なども低下していることが明らかとなった。そこで、これらの EMT マーカーの mRNA 発現レベルを調べたところ、N-cadherin と Vimentin は Mint3 ノックダウンにより低下したが、Slug は変化しなかった。さらに Mint3 ノックダウンによる Slug

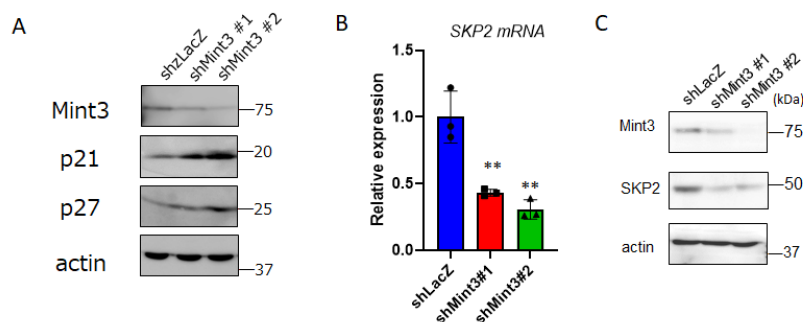


図 2 Mint3 ノックダウンにより SKP2 が低下し p21 と p27 の発現が増加する

の低下が SKP2 や HIF-1 に依存するか調べたところ、Slug の発現は HIF-1 や SKP2 に依存することが明らかとなった。SKP2 は K63 を介するポリユビキチン化をすることでタンパク安定化にも関わることが知られている。そこで、Slug が SKP2 の直接のターゲットか調べるために、免疫沈降により K63 を介するユビキチン化を調べた。その結果、Mint3 ノックダウンにより Slug の K63 を介するポリユビキチン化が減少したことから、Mint3 は SKP2 の発現促進を介して Slug タンパクの安定化にも関わ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わることから、次に Mint3 ノックダウン細胞の幹細胞性をスフィアフォーメーションアッセイや、幹細胞マーカーのリアルタイム PCR で調べた。その結果、Sox2 や、Nanog、LGR5 など一部の幹細胞マーカーの mRNA レベルの低下が認められた。次に、膵癌治療には Gemcitabine と Paclitaxel の併用療法がよく用いられることから、これらの抗がん剤を用いて細胞増殖アッセイによる抗がん剤感受性を調べた。その結果、コントロール細胞に比べて Mint3 ノックダウン細胞では、抗がん剤感受性の向上が認められた。また、これらの結果はすべて HIF-1、SKP2 に依存していることが明らかとなった。

最後に、マウス膵癌同所移植モデルを使用して Mint3 の造腫瘍能への影響を調べるために、コントロール細胞と Mint3 ノックダウン細胞を免疫不全マウスに同所移植した。その結果、移植 4 週間後の正常な膵臓を含めた腫瘍重量は、コントロール細胞移植群に対して Mint3 ノックダウン細胞移植群の方が有意に低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、*in vitro* での結果と一致して、Mint3 ノックダウン細胞を移植した組織では SKP2 陽性領域の減少や、p21 と p27 陽性領域の増加、Slug、N-cadherin、Vimentin などの EMT マーカーの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、Gemcitabine と Paclitaxel への感受性を、腫瘍を移植 1 週間後から 4 週間これらの抗がん剤を投与することで比較した。その結果、Mint3 ノックダウン細胞移植群の膵臓重量は、マトリジェ

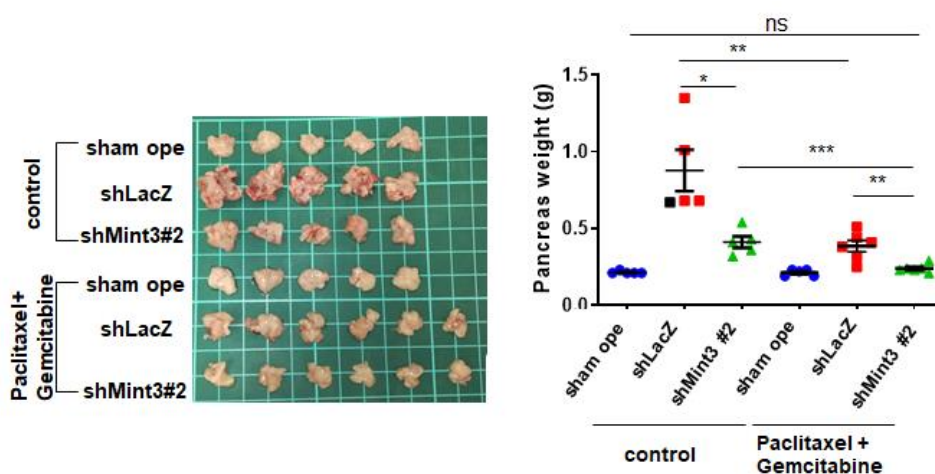


図 3 Mint3 ノックダウンは同所移植モデルマウスの抗がん剤感受性を増加する

ル投与群と同程度まで低くなることが明らかとなった。以上の結果から、Mint3 は膵癌においてマウスレベルでも Gemcitabine と Paclitaxel への抵抗性に関わることが明らかとなった（図3）。

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り、また Mint3 と SKP2 の相関を調べたところ、正の相関が認められた。

【結論】本研究では、膵癌細胞やマウス同所移植モデルによる実験から、Mint3 は膵癌において FIH-1 の抑制を介して HIF-1 を活性化し、SKP2 の発現を促進することで p21 と p27 のタンパク分解を引き起こし、細胞周期促進を引き起こすことが明らかにした。また、Mint3 により発現が促進された SKP2 は EMT や、幹細胞性、抗がん剤抵抗性を引き起こすことを示した（図4）。Mint3 は HIF-1-SKP2 依存的に癌悪性化に寄与するが、HIF-1 も SKP2 も生体の維持に必要な分子であることから、これらの阻害剤の多くは副作用が強い。Mint3 は膵癌において癌特異的に HIF-1-SKP2 を制御することから、副作用の少ない治療としての応用が期待される。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である。

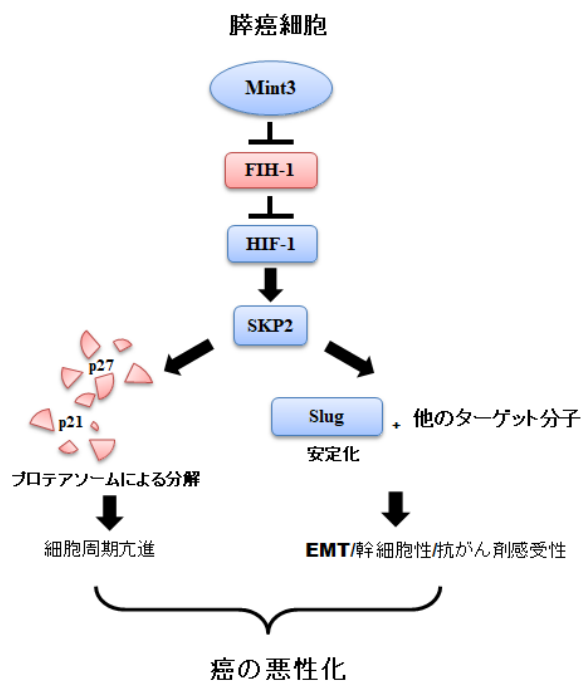


図4 Mint3 膵癌における機能