

氏名	難波 友里		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5930号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Depletion of Lipid Efflux Pump ABCG1 Triggers the Intracellular Accumulation of Extracellular Vesicles and Reduces Aggregation and Tumorigenesis of Metastatic Cancer Cells (脂質排出ポンプ ABCG1 の抑制による細胞外小胞蓄積の誘導および転移性癌細胞における細胞凝集塊形成の抑制)		
論文審査委員	長塚 仁 教授	柳 文修 教授	伊原木 聡一郎 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【背景・目的】

ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーは、様々な物質輸送を担う膜タンパク質であり、その中でABCG1は細胞外への脂質の輸送を担うことが知られている。また、細胞内に脂質が増加することでアポトーシスの誘導や細胞周期移行の阻害等、がん細胞の生存が阻害されることが明らかになっている。そこで、ABCG1発現を阻害することにより、癌細胞からの脂質の排出を阻害し、抗腫瘍効果を得られないかとの着想を得た。本研究では、生体内組織に近似しうる三次元培養系を用い、腫瘍細胞凝集、内部低酸素、細胞増殖、脂質二重膜を持つ細胞外小胞の取り込みへの脂質排出ポンプABCG1の腫瘍における役割を検討した。また、がん患者におけるABCG1高発現の予後への影響を検討した。

【方法】

マウス大腸癌細胞株Colon26, その高転移性亜株LuM1, 低転移性亜株NM11の形態比較および全50種のABCファミリーの発現比較を行った。ABCG1 mRNAを標的とする小分子抑制性RNA (siRNA) および非標的コントロールsiRNAをエレクトロポレーションを用いて導入したLuM1を二次元及び三次元で培養し、細胞凝集、凝集内部の低酸素性、細胞増殖への影響の検討を行った。三次元培養には、ナノカルチャープレート, 低接着プレートおよび幹細胞誘導培地を用いた。細胞凝集はハイコンテツスクリーニング系にてリアルタイム評価を行った。低酸素性は、蛍光低酸素プローブおよびHIF-1 α 免疫組織化学にて検討した。ABCG1 mRNAを標的とする小分子抑制性RNA (siRNA) および非標的コントロールsiRNAをエレクトロポレーションを用いて導入したLuM1をBALB/cマウス皮下に同種移植し、腫瘍形成性, ABCG1およびHIF-1 α の発現・局在を免疫組織学的に検討した。

また、LuM1を培養している培地からLuM1が放出した細胞外小胞を回収し蛍光標識した上で培地に添加して、二次元培養及び三次元培養を行った。細胞内凝集の取り込みを認める細胞の割合および細胞凝集当たりの蛍光強度を、二次元培養においては3時間後と24時間後に測定し、三次元培養においてはハイコンテンツスクリーニング系にてリアルタイム評価した。また、臨床データベースを用いて、各種がん患者においてABCG1高発現群とABCG1低発現群における生存率を比較検討した。

【結果】

siRNAを導入したLuM1からタンパク質を回収し、RT-qPCRおよびウェスタンブロッティングにてABCG1の発現抑制を比較検討したところ、ABCG1の発現抑制を確認出来た為、以降の検討に用いた。二次元培養および三次元培養において、LuM1はABCG1高発現で内部低酸素な細胞凝集を呈した。siRNA導入によるABCG1発現抑制下では、細胞凝集と細胞増殖が抑制された。LuM1移植マウスの腫瘍内部にHIF-1 α 高発現および広範囲壊死領域を認めたのに対し、ABCG1標的siRNA導入LuM1移植マウスの腫瘍においては、HIF-1 α の発現抑制および内部壊死領域の縮小を認めた。LuM1が放出した細胞外小胞を培地に添加して3時間後の時点ではABCG1標的siRNA導入による細胞外小胞の取り込み増加を認めたが、24時間後では非標的コントロールsiRNA導入群と同等であった。また、二次元培養及び三次元培養において、ABCG1標的siRNA導入により細胞外小胞の取り込みレベルが低下した。乳癌、頭頸部癌および大腸癌においてABCG1高発現による予後不良の傾向が認められた。

【考察】

転移性大腸癌において ABCG1 は低酸素腫瘍塊形成や細胞外小胞の取り込みに寄与することが明らかとなった。ABCG1 標的 siRNA により大腸癌細胞の増殖と凝集が抑制された。以上より、ABCG1 が悪性腫瘍治療における標的となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーは、様々な物質輸送を担う膜タンパク質であり、その中でABC sub-family G member 1 (ABCG1) は細胞外への脂質の輸送を担うことが知られている。細胞内への脂質の蓄積はアポトーシスの誘導や細胞周期移行の阻害と関連しており、がん細胞の生存も阻害されることが明らかになっている。

本研究はABCG1発現を阻害することにより、がん細胞での脂質排出阻害による抗腫瘍効果の可能性について検討したものである。

マウス大腸がん細胞株Colon26の高転移性亜株LuM1を使用し、ABCG1 mRNAを標的とする低分子干渉RNA (siRNA) および非標的コントロールsiRNAを導入したLuM1を二次元及び三次元培養し、細胞凝集、凝集内部の低酸素性、細胞増殖への影響の検討を行っている。また、ABCG1 mRNA標的siRNAおよび非標的コントロールsiRNAを導入したLuM1をBALB/cマウス皮下に同種移植しABCG1および低酸素誘導因子HIF-1 α の発現・局在を免疫組織学的に検討している。さらに、LuM1の細胞外小胞を回収し蛍光標識した上で二次元および三次元培養の培地に添加して、細胞内への取り込みを認める細胞の割合および細胞凝集当たりの蛍光強度の測定を行っている。

主要研究結果は以下の内容である。LuM1はABCG1を高発現しており、二次元および三次元培養において内部低酸素状態の細胞凝集を呈した。siRNA導入によるABCG1発現抑制下では、細胞凝集と細胞増殖が抑制された。LuM1移植マウスの腫瘍内部にHIF-1 α 高発現および広範囲壊死領域を認めたのに対し、ABCG1標的siRNA導入LuM1移植マウスの腫瘍においては、HIF-1 α の発現抑制および内部壊死領域の縮小を認めた。ABCG1標的siRNA導入により、培地への細胞外小胞添加3時間後では取り込みが増加したが、24時間後では同等であった。また、二次元及び三次元培養において、ABCG1標的siRNA導入により細胞外小胞の取り込みレベルが増加した。

転移性大腸がんにおいてABCG1は内部低酸素細胞塊形成や細胞外小胞の取り込みに寄与し、ABCG1の抑制により高転移性大腸がん細胞の増殖と凝集が抑制されることが明らかとなった。ABCG1の発現抑制は細胞外小胞や脂質を細胞内へ蓄積させ、細胞の増殖や凝集の抑制、凝集塊内部の低酸素性改善など、細胞抑制的に作用することが示唆された。

本論文は ABCG1 が悪性腫瘍治療における標的となる可能性を示唆するものであり、極めて有用な知見を与えている。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。