

氏名(本籍) なん そんう
南 星旭 (大韓民国)

学位の種類 博士(医学)

報告番号 甲第1500号

学位授与の日付 平成26年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当(課程博士)

学位論文題目

Regulation of the Aerobic Glycolysis by Amphiregulin in
Tumorigenesis of Colorectal Cancer

(大腸癌の腫瘍形成における好氣的解糖系の Amphiregulin による制御)

論文審査委員 (主査)	福岡大学	教授	宮本 新吾
(副査)	福岡大学	教授	岩崎 昭憲
	福岡大学	教授	松井 敏幸
	福岡大学	教授	芝口 浩智

審査の結果の要旨

本論文は、大腸癌において発現が亢進しており標的分子になりうる epidermal growth factor (EGF)ファミリーの一つの Amphiregulin (AREG)を中心とした大腸癌の分子機構を解明し、AREGが大腸癌の発癌から増殖まで関与している分子であることを証明したものである。

AREGが大腸癌の腫瘍形成に関与するかを三次元培養法を用いて確認し、その後、大腸癌の増殖に AREG と共に寄与する遺伝子群を microarray を用いて網羅的に解析を行った。その結果、近年癌との関連性について研究が進められている糖代謝との間で AREG を中心とした共通の遺伝子ネットワークが形成されており、大腸癌の増殖に寄与していることが証明された。また、AREG の発現を亢進させる転写因子 MLX 及び転写制御エレメントの ChoRE を同定した。

以上のことから、AREG を標的とした標的治療薬と糖代謝治療薬の併用療法は新たな大腸癌の治療戦略となることが期待される。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

1. 斬新さ

糖反応性の転写因子 MLX 及び転写制御エレメントの ChoRE が AREG の発現を亢進させ、大腸癌の腫瘍形成に糖代謝との間で AREG を中心とした遺伝子ネットワークが形成されていることで、AREG が大腸癌の発癌から増殖まで関与している分子であることを明らかにした初めての研究成果である。

2. 重要性

EGF ファミリーに対しては受容体を標的とした様々な標的治療薬が開発されてきているが、一つを受容体を抑制するだけでは、他の受容体やチロシンキナーゼ型受容体からのシグナルを抑制できないため、十分な抗腫瘍効果が得られない。近年、癌と代謝異常の間では共通のネットワークが存在することが考えられているが、今回、大腸癌の腫瘍形成には AREG だけでなく、糖代謝に関わる遺伝子群も寄与していることと、糖反応性の転写因子が AREG の発現を増加させることを証明し、その成果は今後の大腸癌治療戦略の発展につながるものである。

3. 実験方法の正確性

本研究に用いた実験方法は細胞実験においていずれも確立された方法であり、実験も複数回行い、同様の結果が得られていることから再現性があることも示している。また、各実験において同一の事象を異なる方法、手技で内容の正確性を証明しており、十分な正確性があると考えられる。

4. 表現の明確さ

本論文は、研究の背景、目的、方法、結果及び考察が所定の書式に沿って明瞭に記載されており、明瞭性が高い。

5. 主な質疑応答

① 質問： 大腸癌以外の癌でも AREG を介した増殖機構を示す癌があるのか？

回答： あると考えている。AREG の発現が特異的に亢進している膵癌等で同様の結果を示すと考えられる。

② 質問： AREG を介したこのような代謝と関連して増殖機構を示すとの報告は今までにあるのか？

回答： 今までの報告ではない。今回同定した転写因子 MLX も癌に関わるとの報告はほとんど認めていない。

③ 質問： 最初に 6 種類の大腸癌細胞株を用いて解析を進めており、その後アレイを行う際は 2 種類に絞り込み、最終的には 1 つの細胞株を用いて検討を行っているがその様な細胞株の選定はよく行われる方法なのか？

回答： よく行われる方法である。最初に 6 種類の細胞株を用いたのは全ての大腸癌で起こりうる事象であることを証明するためであり、次に 2 種類に選定したのは、大腸癌の発生機序として考えられている染色体不安定性及びマイクロサテライト不安定性をおこすと考えられている細胞株を、今までの論文報告で使用報告の多い細胞株を用いて検討した。最終的には、論文には 1 種類の細胞株の検討しか記載していないが、アレイに用いた 2 種類の細胞株で実験を行い、同様の結果を示している。

④ 質問： AREG に関与する遺伝子が大腸癌の腫瘍形成を調整しているとの内容の論文であるが、

今回の網羅的解析の結果最も上流にあり大腸癌の腫瘍形成を調整しているものはなにか？

回答：今回の結果から、AREGは大腸癌の腫瘍形成において中心的役割を果たしているため、最も上流にあるものとしてはAREGの発現を亢進させる転写因子のMLXになると考える。

⑤ 質問：今後の展開として、臨床的にどのように展開していくかを考えているのか？

回答：今後の方針としては、AREGの治療薬としてAREGの低分子化合物の作成を考えている。また、メトホルミン等の糖代謝治療薬が癌に対して効果があるとの報告もあり、今後は糖代謝治療薬との併用も考えている。

⑥ 質問：RT-PCRではGAPDHを内部標準として用いて定量化しているが、最近では数種類用いて平均等で内部標準を行うことが多いが、他の内部標準はもちいていないのか？

回答：今回は用いていない。今回の実験では、RNAを抽出しcDNAを合成したが、cDNAを合成する際にRNAを等量になるように調整しており、その結果、GAPDHも3回計測で確認しているが、大きな誤差を認めなかったため、今回はGAPDHのみを内部標準として用いている。

⑦ 質問：AREGの上清中の濃度を測定しているが、AREGは膜蛋白質なので、juxtacrineでの影響もあると考えられるが、細胞表面上の蛋白質を含めた総蛋白質で検討をする必要はなかったのか？

回答：必要ないと考えている。AREGは膜結合型の蛋白質として合成されるが、分泌型として機能するため上清中の蛋白質を測定することで十分と考えている。また、mRNAの測定も同時に行っており、上清中の発現と類似した結果を認めているので、検討としては十分であると考えている。

⑧ 質問：アレイによる網羅的検索で、糖代謝関連遺伝子として9種類同定されているが、今回の検討はSGLT1だけであるが、それ以外の8種類は検討しなかったのか？

回答：検討している。その中で、特に糖代謝において重要と思われる糖の取り込みに関与する

SGLT1 の解析を行った。それ以外の 8 種類も SGLT1 と同様の結果となっている。

- ⑨ 質問： GLUT1 はアレイの結果では、上がってきておらずアレイに使用した RNA を用いて Real-time PCR を行った結果三次元培養で発現が亢進してきたとの解釈でよいか？

回答： その通りであり、アレイは、DNA の発現変化量を見ており DNA プローブの配列によっては、アレイ上では発現が変化してこない場合もある。今回は、アレイのパスウェイ解析結果から解糖系に関わる遺伝子群の変化を認めており、解糖系に関わる遺伝子群を Realtime-PCR 法にて実際の発現量の変化を確認した。その結果、GLUT1 は今回の研究に重要な遺伝子であると判断している。

- ⑩ 質問： 転写制御エレメントを ChoRE に絞り込んでいるが、今回の解析の結果では 39 の転写因子結合エレメントと適合しているが他の 38 の転写因子に関しては、糖代謝に関連しなかったので今回の検討から外したのか？

回答： その通りで、今回用いたデータベースでは、他の 38 の転写因子は糖代謝と関連するとの記載がなく、今回の検討から外している。また、論文での報告で糖代謝との関連性が示唆されている c-MYC や CREB 等は siRNA 法を用いて AREG の発現解析を行ったが、AREG の発現には関与してなかった。

- ⑪ 質問： 今回の AREG の効果は EGFR を介したものかどうかの検討は行ったのか？

回答： 行った。EGFR の下流にある HIF を介して AREG が GLUT1 等の糖代謝遺伝子の発現を亢進させる結果となった。そのため、EGFR を介した作用であると考えている。

以上の発表及び討議の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。