The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	淡明細胞型腎細胞癌のLOXL2 によるインテグリン発現制御機構
Author(s)	長谷, 拓明
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34400
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（長谷　拓明）	
論文題名	淡明細胞型腎細胞癌のLOXL2 によるインテグリン発現制御機構

論文内容の要旨

腎細胞癌(renal cell carcinoma : RCC) は腎臓に発生する腫瘍の80% 以上を占める癌である。好発年齢は50歳～70歳。10万人当たりの発症率は男性が8.5人、女性が3.2人となっており、女性よりも男性の罹患者数が多い癌である。リスク因子の喫煙や肥満、高血圧などが複合的に作用し発症に至っていると考えられており、罹患者数は年々増加している。RCCのなかでも淡明細胞型腎細胞癌(clear cell renal cell carcinoma : ccRCC) が最も高い頻度で見られる。ccRCC の5 年生存率はstage I では99% であり予後良好であるが、stage IV では約21% と低下し予後不良となる特徴を有する。治療は主に外科手術による根治的腎摘除もしくは腎部分切除術が行われている。しかし、stage IV のような進行した症例では外科手術が困難な事が多く、その場合は内科的な治療法が選択される。内科的治療法ではサイトカイン療法が標準的治療として使用されてきた。しかしサイトカイン療法は、奏功率が約15% であり、その上強い副作用が問題であった。そこで、近年では分子標的薬の使用が増えてきたが、これも奏功率は約30% 程度であり、ccRCC に対し有効で且つ副作用の少ない新規治療薬の開発が熱望されている。そこで重要な課題となるのはccRCC 癌細胞がどのようにして浸潤や転移を可能としているか、その分子基盤の理解である。

本研究ではccRCC 臨床検体とExon array を用いて非癌部に比べ癌部で発現亢進している遺伝子を網羅的に探索した。その結果、細胞外に分泌されてextracellular matrix (ECM) タンパク質であるコラーゲンとエラスチンの架橋反応を触媒する酵素として知られているlysyl oxidase like 2 (LOXL2) に着目した。LOXL2 は細胞外機能とともに、細胞内機能も知られつつある。LOLX2 遺伝子はccRCC 臨床検体においてstage 及びT stage (原発巣の大きさを示す分類) に相関して発現が増加していた。このことよりLOLX2 がccRCC の腫瘍増大や浸潤転移に寄与している可能性が推測された。ccRCC 細胞株である786-0 細胞においてsiRNA を用いたLOXL2 ノックダウン実験を行うと、細胞の顕著な形態変化が誘導された。そしてその時、細胞のストレスファイバーやfocal adhesion の形成が減弱されていることを認めた。ストレスファイバーは細胞に張力を与える機能を持つ繊維状の細胞内構造体であり、focal adhesion に接続している。focal adhesion は細胞がECM と接着する際に機能する細胞内構造の一つであり、細胞接着を増殖や運動性へと伝達するシグナルの起点としても機能する。つまり、これら細胞内構造の形成不全がみられたLOLX2 ノックダウン786-0 細胞は、その増殖や運動性の低下が起きることが予想された。そこで、細胞増殖リアルタイムモニタリング装置xCELLignece を用いた細胞増殖解析、wound healing assay による細胞遊走能解析、xCELLignece を用いた細胞浸潤能解析を試みたところ、いずれの細胞機能もLOLX2 ノックダウンにより有意に低下することが示された。このことからccRCC においてLOXL2 がfocal adhesion を介したシグナル伝達制御に重要な役割を果たしているがわかった。

次に、LOXL2 によるccRCC 促進的な機能は如何にして行われているのかについて解析を試みた。まず、focal adhesion 形成のコアになる膜タンパク質インテグリンに着目した。インテグリンはα サブユニットとβ サブユニットの2 種類のヘテロダイマーで機能する。α サブユニットは18 種類、β サブユニットは8 種類存在しており、それぞれの組み合わせにより認識するECM の種類が異なってくる。そこで、ccRCC でどのインテグリンの発現が亢進し、LOXL2 による影響を受けている可能性があるのか、Exon array データを参照し、臨床検体を用いたreal-time PCR 解析で検証した。その結果、LOXL2 とインテグリンα5 の発現に正の相関性が確認された。そこで786-0 細胞 におけるLOXL2 ノックダウン時のインテグリンα5 発現をreal-time PCR 及びwestern blot により解析した。その結果、LOXL2 ノックダウンによりmRNA レベルでは有意な差は認められなかったが、タンパク質レベルで顕著な発現低下を認めた。次いで、インテグリンα5 とヘテロダイマーとして機能するインテグリンβ1 についてもその発現をwestern blot で解析すると、インテグリンβ1 も同様にタンパク質レベルでの低下が示された。インテグリンα5、β1 のヘテロダイマーはECM のひとつであるフィブロネクチンの受容体として機能することが知られている。そこでフィブロネクチンに対する接着性を評価するとLOXL2 ノックダウン786-0 細胞は有意な低下を示し、インテグリン5 ノックダウン時とほぼ同様の程度であった。これはLOXL2 ノックダウンによりインテグリンα5、β1 の発現が低下し、その機能も低下していることを示唆するものと考えられた。さらに、786-0 細胞においてインテグリンα5 をノックダウンしその際の表現型を確認すると、

ストレスファイバーやfocal adhesion の形成低下、及び遊走能の低下が確認され、LOLX2 ノックダウンにより見られたこれら表現型はインテグリンα5 の発現低下に由来する可能性が示唆された。LOXL2 はコラーゲンとエラスチンの架橋反応を触媒し、ECM の再構成に寄与する分子であることから、その反応を細胞内シグナルとして伝えるインテグリンの発現を制御し得る事は細胞にとって意義深いと考えられる。しかし、その機序については不明であることからLOXL2 によるインテグリンα5、β1 発現制御機構についての解析を行った。膜タンパク質をビオチン化させストレプトアビジンビーズでプルダウンする実験を行ったところ、細胞膜表面インテグリンα5、β1 に対しLOLX2 ノックダウンは影響を及ぼさなかった。また、LOLX2 ノックダウンによって見られたインテグリンα5、β1 の発現低下はプロテアーゼ阻害剤であるleupeptin、プロテアソーム阻害剤であるMG132 いずれの処理においても回復傾向が見られた。これらのことからLOX2 によるインテグリンα5、β1 の発現制御は細胞膜表面のインテグリンではなく生合成後、細胞膜へと輸送される課程においてリソソームやプロテアソームによる分解を抑制する機構であることが示唆された。

ccRCC 臨床検体を用いてLOXL2 及びインテグリンα5 の発現についてwestern blot によりタンパク質レベルで解析したところ発現の相関性が見られ、なおかつgrade（癌の悪性度の指標）が高まるにつれ増加する傾向も認めた。これらの研究結果より、ccRCC において高発現するLOXL2 は癌細胞内においてインテグリンα5 発現誘導や安定化を介して癌細胞の浸潤転移に寄与していることが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　長谷　拓明　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	辻川　和丈
	副 査　教 授	八木　清仁
	副 査　教 授	水口　裕之
	副 査　教 授	土井　健史

論文審査の結果の要旨

腎細胞癌（renal cell carcinoma：RCC）は腎臓に発生する癌の80% 以上を占める悪性腫瘍である．RCC の病期(Stage）は原発巣の大きさや所属リンパ節或いは遠隔転移の有無より分類されている．初期段階のstage Ⅰ では5 年生存率が99%であるが，後期のstage Ⅳ においては 5 年生存率が約21%となり，とたんに予後不良性を示すようになる特徴を有する．そこでこの高Stageの症例における治療法を考えるうえでは，致死率が急激に高くなる原因の分子基盤の理解が必要になる．RCC は病理学的診断により，淡明細胞型の腎細胞癌（clear cell renal cell carcinoma, ccRCC）がその8 割を占めている.そこで本研究では大阪大学医学部泌尿器科と協力しccRCCの増殖や浸潤転移に関する分子メカニズムの理解を行うことを目的として研究に着手し，以下の結果を得た.

1. ccRCC 臨床検体を用いた遺伝子網羅的発現解析によりLysyl oxidase like 2 (LOXL2)の癌部における高発現を認めた.
2. ccRCC細胞で高発現するLOXL2のノックダウンにより，ccRCC細胞の増殖，浸潤，転移能の抑制が認められた.
3. LOXL2はインテグリンα5/β1の 発現を亢進させることを突き止めた.また腎癌臨床検体においてもLOXL2とインテグリンα5の発現とが正に相関することも示した.
4. LOXL2によるインテグリンα5の発現誘導は，ccRCC細胞の浸潤・転移能の亢進に寄与していることが示された.
5. LOXL2によるインテグリンβ1の 発現制御は，小胞体上に存在するp97を介したタンパク質レベルでの影響によるものであった.
6. 小胞体における酸化的フォールディングを制御するEro1Laは,LOXL2によりその発現制御がなされていることを示した.

これらの研究成果は,LOXL2の高発現はこれまで知られていた分泌タンパク質としてコラーゲンとエラスチンの架橋反応を担う機能以外に,細胞質におけるインテグリンα5/β1の発現誘導や安定化を介して，ccRCC細胞の悪性化に寄与していることを明らかにしたものである.

よって，上記研究成果は博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考える.