



Title	ヒト乳癌細胞MCF-7におけるMonadのknockdownは上皮-間葉転換を誘導する
Author(s)	吉田, 好紀
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49225
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 よし だ み き
吉 田 好 紀

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 9 2 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 20 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

歯学研究科統合機能口腔科学専攻

学 位 論 文 名 ヒト乳癌細胞 MCF-7 における Monad の knockdown は上皮-間葉転換を誘導する

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 丹羽 均

(副査)

教 授 上崎 善規 准教授 新谷 誠康 講 師 斉藤 正寛

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

Monad は我々がアポトーシス誘導遺伝子として新規にクローニングした分子である。本研究では、Monad の発現を種々のヒト正常組織と腫瘍組織および培養細胞株で検討することで、アポトーシスとの関連を調べた。また、ヒト乳癌細胞において Monad の knockdown および overexpression が与える影響ならびにそのメカニズムを解明することで、Monad が乳癌の診断マーカーおよび治療のターゲット分子のひとつとなる可能性を検討した。

[方法]

1. ヒト組織における Monad の発現

Cancer profiling array を用いて種々のヒト正常組織と腫瘍組織における Monad の発現を調べた。

2. ヒト乳腺上皮細胞およびヒト乳癌細胞における Monad の発現

Monad の発現は特異的抗体を用いた Western Blotting および realtime PCR により定量した。ヒト乳腺上皮細胞として MCF-10A 細胞、ヒト乳癌細胞として MCF-7 細胞、MDA-MB-231 細胞、ZR-75 細胞、T-47D 細胞、SKBR3 細胞を用いた。

3. 細胞の形態変化の観察

細胞培養プレートおよびガラス上でヒト乳癌細胞 MCF-7 細胞を培養し、蛍光顕微鏡を用いて細胞形態を観察した。

4. MCF-7 細胞における Monad の knockdown および overexpression

knockdown には Monad を標的分子とする small interference RNA (siRNA) を合成してリポフェクション法により MCF-7 細胞に導入し、overexpression はアデノウイルスを MCF-7 に感染させて行った。

5. Monad が増殖速度に与える影響

Monad を knockdown および overexpression することによる増殖速度への影響を MTT assay により検討した。

6. Monad が細胞浸潤能に与える影響

浸潤能の検討には Boyden chamber 法を用い、Monad の knockdown および overexpression させた細胞で比較検討した。

7. 上皮-間葉変換への関与

Monad の knockdown および overexpression による上皮-間葉転換に関与するタンパク質の発現の変化を Western Blotting により定量し比較検討した。

8. 乳癌患者組織における Monad の発現

乳癌患者の癌組織より調製した cDNA を用い、realtime PCR により Monad mRNA の発現を定量した。

[結果および考察]

Cancer profiling array の結果、正常乳腺組織よりも腫瘍乳腺組織に Monad が高発現していることを確認し、さらに Western Blotting によりヒト乳腺上皮細胞と比較し、種々のヒト乳癌細胞において Monad が高発現していることが確認された。

siRNA 処置による Monad の knockdown により、MCF-7 細胞の細胞増殖能には変化が見られなかったが、細胞浸潤能は亢進が認められた。また、細胞の形態にも変化が認められ、間葉系への変化を示唆するアクチンの stress fiber の伸長が見られた。

一方、アデノウイルス処置により Monad を overexpression すると、細胞増殖能には変化がなかったが、細胞浸潤能が低下した。

さらに、Monad の knockdown により E-Cadherin の発現には変化がみられなかったのに対し、N-Cadherin の発現に増加傾向が認められた。また、間葉系への変化を調節している転写因子 Snail の発現も増加傾向が認められた。その調節経路として GSK-3 β の発現について検討したところ、Monad の knockdown により、それ自体の発現には変化が見られなかったが、GSK-3 β (Ser9) のリン酸化の発現に増加傾向が認められた。

以上の結果より、MCF-7 細胞において Monad は、GSK-3 β のリン酸化を抑制することで GSK-3 β を活性化させ、Snail の発現を抑制するものと推測された。この経路を介して、Monad が腫瘍細胞において上皮-間葉転換を抑制すると考えられた。

また、約 100 例の乳癌患者の癌組織をリンパ節非転移群と転移群に分類し、Monad の発現を検討した結果、非転移群に比べて転移群において Monad の発現が減少しているという傾向が認められた。これは Monad の発現低下が乳癌の浸潤・転移に関与している可能性を示唆する。

これらの結果より、新規アポトーシス誘導遺伝子 Monad の発現低下が乳癌の進行と関連している可能性が示唆され、Monad が乳癌の浸潤・転移能に対する診断マーカーの候補になりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

乳癌細胞において、アポトーシス誘導因子として新規に見出された Monad を knockdown することで上皮-間葉転換を示す細胞形態の変化、細胞浸潤能の亢進が認められた。

その際、間葉系への変化を調節している転写因子 Snail のタンパク質発現が増加し、その調節経路について検討したところ、GSK-3 β (Ser9) のリン酸化が増加していた。これにより、MCF-7 細胞において Monad は、GSK-3 β のリン酸化を抑制することで GSK-3 β を活性化させ、Snail の発現を抑制するものと推測された。この経路を介して、Monad が腫瘍細胞において上皮-間葉転換を抑制的に制御していると考えられた。

以上の結果は、乳癌における Monad の働きの一部を解明したものであり、博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。