



Title	RFPL4A increases the G1 population and decreases sensitivity to chemotherapy in human colorectal cancer cells
Author(s)	内藤, 敦
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51973
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	内藤 敦
論文題名 Title	RFPL4A increases the G1 population and decreases sensitivity to chemotherapy in human colorectal cancer cells (RFPL4A遺伝子は大腸がん細胞のG1期の割合を増加させ、抗がん剤感受性を低下させる)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
がん治療において化学療法や放射線治療に対するがんの治療抵抗性が問題となっている。がんの治療抵抗性には、がん幹細胞の存在が重要な役割を果たしていると考えられている。がん幹細胞は細胞周期のG0期に留まる性質を有し、分裂期の細胞を標的とした既存の治療に対する抵抗性を持つと考えられている。本研究は細胞周期を可視化しリアルタイムに観察することを可能とする蛍光プローブを用いて、静止期に留まる細胞の解明を行い、静止期に留まる細胞集団の性質の解明、さらに新規治療への応用を目的としている。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
2色の蛍光プローブFucciをヒト大腸癌細胞株(HCT116)に遺伝子導入し、細胞周期をリアルタイムに可視化(G1期-赤、S期-黄、G2/M期-緑)した。共焦点顕微鏡を用いて細胞周期変化の長時間観察を行った。少なくとも56時間赤(G1)の細胞のまま細胞周期が回らない細胞の存在が確認された(HCT116のdoubling time 20時間)。次にFlow cytometryを用い、赤のまま留まる細胞(RR)とG1期の細胞(R)、S/G2/M期の細胞(G)に分離し、RR細胞群の性質を調べた。Cell counting kitを用いての細胞増殖能はRRが最も低かった。次に幹細胞性試験であるSphere形成能と活性酸素を調べた。Sphere形成能は無血清培地、無接着dishに100 cellsずつ撒き、2週間時点で直径100直径を超えるものをSphereと定義し、個数を比べた。活性酸素はCellRoxを用いてFlow cytometryで蛍光強度を比べた。RRはSphere形成能が高く、活性酸素を抑制していた。これらから、RR細胞群は、静止期に留まり、幹細胞様の性質を持つことが予想された。 RRの性質を調べるためにMicroarrayを用いて遺伝子解析を行った(RR vs. R)。2倍以上の発現差を認めた518の遺伝子が同定され、特に上皮間葉転換(EMT)や抗がん剤耐性に関わる遺伝子としてFGF1(40倍)、TGF1(40倍)、SNAIL2(7倍)、DLL3(5倍)等がRRに高発現していた。G1期に留まる細胞(RR)に優位に発現している RFPL4A(17倍)という遺伝子に注目した。RFPL4AはcyclinBに対するubiquitin ligaseとしての働きが報告されており、M期からG1期への移行に関与すると考えられる。また、RFPL4Aは他の大腸がん細胞株(HT-29, DLD-1)や非がん細胞株(HFK293)においてもRRでの高発現が見られた。 RFPL4AのOver-expression, Knock-down HCT116株をretro virus systemを用いて作成した。細胞周期割合(共焦点顕微鏡, Flow cytometry)、細胞増殖能(in vitro ; time-lapse, cell counting kit, in vivo ; NOD/SCIDマウス皮下腫瘍)、幹細胞性(sphere形成能, 活性酸素)、抗がん剤感受性(5-FU in vitro ; time-lapse, in vivo ; NOD/SCIDマウス皮下腫瘍)を調べた。Over-expression株はG1期の細胞割合の増加、細胞増殖能の低下、Sphere形成能の増加、活性酸素抑制、5-FU感受性の増強が見られ、Knock-down株では全て逆の結果が得られた。	
〔総括(Conclusion)〕	
抗がん剤耐性の原因となる静止期維持因子としてRFPL4A遺伝子を同定した。RFPL4Aを抑制することによって静止期に留まる細胞の細胞周期を進め、抗がん剤の感受性を増強させることができる。RFPL4Aと抗がん剤の併用療法は既存の治療で根治できないがん細胞の新たな治療戦略として期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 内藤 敦	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 森 正 樹
	副 査 大阪大学教授 野 口 眞 三 郎
	副 査 大阪大学教授 小 川 和 孝

論文審査の結果の要旨

本研究では細胞周期を可視化しリアルタイムに観察することを可能とする蛍光プローブ (Fucci) を用いて、静止期に留まるがん細胞の解析を行った。

Fucciをヒト大腸がん細胞株(HCT116) に遺伝子導入し、リアルタイムで観察したところ通常の細胞周期20時間に対し、56時間 G1期に留まる細胞の存在が確認された。次にFACSを用い、G1期に留まる細胞(RR)を分離し性質を調べた。RRは静止期の割合が多く、幹細胞様の性質を有していた。

さらに、Microarrayを用いてRRに優位に発現しているRFPL4A(17倍) という遺伝子を同定した。

RFPL4Aを強制発現させた大腸がん細胞株はG1期の細胞割合の増加、細胞増殖能の低下、Sphere形成能の増加、活性酸素抑制、5-FU感受性の増強が見られ、抑制株では全て逆の結果が得られた。

RFPL4Aを抑制することによって静止期に留まるがん細胞の細胞周期を進め、抗がん剤の感受性を増強させることができる。RFPL4Aと抗がん剤の併用療法は既存の治療で根治できないがん細胞の新たな治療戦略として期待され、学位の授与に値すると考えられる。