

Title	Activation of nuclear factor-kappa B by linear ubiquitin chain assembly complex contributes to lung metastasis of osteosarcoma cells
Author(s)	友永, 真人
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59016">https://hdl.handle.net/11094/59016</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	ともなが まさと 友永 真人
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 25137 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Activation of nuclear factor-kappa B by linear ubiquitin chain assembly complex contributes to lung metastasis of osteosarcoma cells (LUBAC による NF- $\kappa$ B 活性化は骨肉腫細胞の肺転移を促進する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 菊池 章 教授 月田早智子

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

骨肉腫は青少年期に発生する骨原発悪性腫瘍の中で最も頻度が高い疾患であり、近年の集学的治療により生命予後は改善しているが、肺転移を認める症例の5年生存率は3割と極めて悪く、肺転移機構の解明、治療法の開発が骨肉腫患者の更なる生命予後改善に必須である。

我々はこれまで骨肉腫肺転移機構解明のため、マウス骨肉腫細胞株Dunnよりin vivo selectionにて高肺転移株LM8を樹立し解析を行ってきた。LM8では恒常的にNF- $\kappa$ Bが活性化されており、NF- $\kappa$ Bによって制御される*VEGF*、*ICAM-1*などの転移関連遺伝子の発現が上昇していた。さらにNF- $\kappa$ B阻害剤投与により肺転移が抑制されることより、肺転移成立にNF- $\kappa$ Bの活性化が関与していることを報告してきたが、NF- $\kappa$ Bの活性化機序は十分には明らかではなかった。一方HOIP/HOIL-1/SHARPINよりなる新規ユビキチンリガーゼLinear Ubiquitin chain-Assembly Complex (LUBAC) が、従来になく直鎖状ポリユビキチン修飾によりNF- $\kappa$ B活性化を制御することを明らかとなった。本研究の目的は未だ疾患との関連が知られていないLUBACの役割を、LM8骨肉腫肺転移モデルを用いて明らかにすることである。

## 〔 方法ならびに成績 〕

はじめに、マウス骨肉腫細胞株Dunnおよびその高肺転移株LM8におけるHOIL-1L/HOIP/SHARPINの発現とNF- $\kappa$ B活性をそれぞれWestern blot、luciferase reporter assayで評価した。LM8は親株と比較しHOIL-1L/HOIP/SHARPINいずれの発現も亢進し、NF- $\kappa$ B活性は亢進していた。次に、LM8の高肺転移能がLUBACを介したNF- $\kappa$ B活性化に依るものであるかを明らかにするため、HOIL-1Lを定期的にknockdown(KD)しNF- $\kappa$ B活性を抑制したLM8亜株を樹立し解析を行った。in vitroでの増殖能についてはcolony formation assayで評価し、浸潤能については、gelatin zymographyでのMMP2/9活性、Western blot でのICAM-1発現量、Matrigel invasion chamberでの浸潤細胞数で評価した。LUBACを介したNF- $\kappa$ B抑制により、足場非依存性増殖の抑制を認め、MMP2活性、ICAM-1の発現量、浸潤細胞数の抑制を認めた。in vivoでは皮下腫瘍移植モデルでの肺転移能について組織学的に検討し、HOIL-1L KDにより有意な肺転移の抑制を認めた。さらにLUBACを介したNF- $\kappa$ B活性化が転移初期における腫瘍細胞の肺への接着・浸潤に与える影響を評価するため尾静脈注射後の腫瘍細胞の肺での停留をIn vivo imaging systemを用いて経時的に評価した。尾静脈注射後の肺に停留する腫瘍細胞の経時的評価では、HOIL-1L KDによるLUBACの発現抑制によりコントロールと比較し投与後1時間では変化を認めないが、24時間後では有意な集積抑制を認め、1週間後の肺転移も抑制された。LUBAC発現抑制により肺への接着、浸潤が強く抑制された原因としてICAM-1に着目した。ICAM-1は種々の癌で転移に関与することが報告されている膜タ

ンパクで、HOIL-1L KDで発現が抑制されており、HOIL-1L KDした細胞にICAM-1を過剰発現させると尾静脈注射後24時間での肺への集積と1週間後の肺転移が回復した。以上より、LM8細胞の肺への接着・浸潤にLUBACを介したNF- $\kappa$ B活性化によるICAM-1の発現上昇が関与している可能性が示唆された。

## 〔 総 括 〕

LM8マウス骨肉腫肺転移におけるNF- $\kappa$ B活性化はLUBACを介している事が明らかとなった。本研究の成果は、新規骨肉腫肺転移治療薬の開発に応用されることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、新規ユビキチンリガーゼlinear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) によるNF- $\kappa$ B活性化と骨肉腫の肺転移との関連を、in vivo 及び in vitroで検討した。申請者らは以前より、骨肉腫肺転移機構解明のため、マウス骨肉腫細胞株Dunnよりin vivo selectionにて高肺転移株LM8を樹立し解析を行い、骨肉腫細胞株の肺転移成立にNF- $\kappa$ Bの活性化が関与していることを報告してきたが、NF- $\kappa$ Bの活性化機序は十分には明らかにされていなかった。近年、LUBACが、従来になく直鎖状ポリユビキチン修飾によりNF- $\kappa$ B活性化を制御することが明らかとなったことに着目し、LUBACによるNF- $\kappa$ B活性化が骨肉腫肺転移モデルに与える影響について検討した。マウス骨肉腫細胞株Dunn及びその高肺転移亜株LM8のLUBACの蛋白発現を解析したところLM8でLUBAC発現が亢進していた。次にLUBACを定常的にノックダウンしNF- $\kappa$ B活性を抑制したLM8亜株を樹立し、足場非依存性の増殖能、浸潤能を評価したところ増殖能と浸潤能の抑制を認めた。in vivoではマウス背部皮下移植後の肺転移能について組織学的に評価し、肺転移数、肺転移サイズの抑制を認めた。更に肺への接着・浸潤能を評価するため尾静脈注射後の腫瘍細胞の肺での停留を経時的に評価し、LUBAC機能抑制により投与後24時間で有意な集積抑制を認め、1週間後の肺転移も抑制された。以上の結果よりマウス骨肉腫肺転移モデルにおけるNF- $\kappa$ B活性化経路はLUBACを介することが示唆されると結論づけた。本研究の成果は、骨肉腫肺転移新規治療薬の開発につながりうるという点で、博士 (医学) の学位授与に値すると考える。