



Title	Hic-5 affects proliferation, migration and invasion of B16 murine melanoma cells
Author(s)	野口, 史人
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59719
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉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

【91】

氏名	野口史人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第25917号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Hic-5 affects proliferation, migration and invasion of B16 murine melanoma cells (Hic-5はB16マウスメラノーマ細胞において増殖、遊走、浸潤に影響を与える)
論文審査委員	(主査) 教授 板見 智 (副査) 教授 片山 一郎 教授 細川 互

論文内容の要旨

〔目的〕

悪性黒色腫（メラノーマ）は最も悪性度の高い皮膚癌の一つであり、その発生頻度は国内外で増加傾向にある。初期段階で発見され適切な治療がなされた場合の予後は比較的良好であるが、進行期のメラノーマの予後は非常に悪く、未だ有効な治療が確立されていない。

Hic-5 (Hydrogen peroxide-inducible clone 5) は元々TGF- β および過酸化水素に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた、LIMドメインファミリーに属するアダプター分子である。Hic-5は細胞内において細胞接着斑・核内・アクチン骨格上と複数の局在を示し、その局在箇所によって多様な機能が報告されている。個体レベルでは皮膚、脳、腎、血管、子宮など複数の臓器で発現が報告されており様々な病態への関与が示唆されている。また前立腺癌や乳癌においても腫瘍の成長に関与している可能性が示唆されているが、これまでメラノーマにおけるHic-5の関与については報告がない。

そこで我々はメラノーマにおいてHic-5が何らかの機能をしている可能性を考え、本研究において検討した。

〔方法ならびに成績〕

ヒトの色素細胞系腫瘍におけるHic-5の発現を調べるために患者から得られた色素性母斑、メラノーマのサンプルでHic-5の免疫染色を行ったところ色素性母斑は5例中3例、メラノーマは7例中5例で陽性だった。ヒトのメラノーマの細胞株 (Mewo, G361, TXM18, 70W, SK-mel-24, SK-mel-23) におけるHic-5のmRNAの発現を調べるためにRT-PCRを施行したところいずれも発現を認めた。マウスのメラノーマの細胞株であるCloudmanS91とヒトメラノサイト、ヒトメラノーマの細胞株におけるHic-5の発現を調べるためにウェスタンブロットを施行したところいずれも発現を認めた。マウスのメラノーマの細胞株であるB16-F1においてHic-5の発現を調べるために免疫染色、ウェスタンブロットを施行したところ発現を認めた。そこでshRNAを用いてB16-F1におけるHic-5の発現を安定的にノックダウンした細胞株を2ライン作成し、その機能を解析した。in vitroのmigration assayではコントロールと比較して遊走能の有意な低下を認めた。Boyden chamberを用いたinvasion assayではコントロールと比較してMatrigelへの浸潤能の有意な低下を認めた。in vitroのproliferation assayではコントロールと比較して増殖能の有意な低下を認めた。これらの細胞株をC57BL/6マウスの背部皮膚に移植しIn vivoでの成長性を検討したところ、コントロールと比較して成長性の有意な低下を認めた。またこれらの移植を受けたマウスの生存率を検討したところ、Hic-5をノックダウンしたB16-F1を移植されたマウスの生存率はコントロールと比較して有意に改善された。コラーゲンIVをコーティングしたディッシュにおける二次元培養下での接着能はコントロールと有意差を認めなかった。またこれらの細胞株をC57BL/6マウスの尾静脈に静脈注射し肺転移巣の数を検討したところコントロールと比較して有意に転移能の低下を認めた。Hic-5をノックダウンしたB16-F1は細胞形態がアメーバ状であり細胞形態の可塑性の低下を認めた。これまでの報告からメラノーマの運動能にRho-ROCKシグナル経路が関与していることが分かっている。今回Hic-5をノックダウンしたB16-F1のウェスタンブロットにおいてコントロールと比べてP-RhoAの発現が亢進していたことから、Hic-5の発現を抑えたB16-F1においてRhoAのシグナル経路が活性化し、細胞形態の可塑性と運動能の低下を来したことで、転移能の低下を認めたと考えた。

〔総括〕

B16-F1マウスメラノーマ細胞においてHic-5の発現を安定的にノックダウンしたところ、in vitroでの増殖能と運動能の低下、マウス皮膚での腫瘍の成長性と静脈注射後の肺転移能の低下を認めた。Hic-5の発現をノックダウンしたB16-F1においてRhoAの活性化と細

胞形態の可塑性の低下を認め、運動能の低下に関与したと考えられた。これらの結果はHic-5がメラノーマの治療に関する新しいターゲットとなる可能性を示唆しており今後の更なる研究の発展が望ましい。

論文審査の結果の要旨

Hic-5はTGF- β および過酸化水素に応答し発現誘導される遺伝子としてクローニングされた、LIMドメインファミリーに属するアダプター分子である。Hic-5は細胞内において細胞接着斑、核内、アクチン骨格上と複数の局在を示し、様々な臓器で発がんを含む種々の病態の形成に関与している。本論文ではメラノーマにおけるHic-5の機能について解析した。まずヒトおよびマウスのメラノーマ細胞でHic-5の発現を同定した。そこでマウスのメラノーマ細胞株であるB16-F1細胞におけるHic-5の役割を知るためにその発現をshRNAを用いて抑制したところ、in vitroでの遊走能、浸潤能、増殖能の低下とin vivoでの増殖能、転移能の低下を認めた。またHic-5の発現を抑制したB16-F1細胞においてRhoAの活性化と細胞形態の可塑性の低下を認め、運動能の低下に関与したと考えられた。これらの結果はHic-5がメラノーマの治療における新しいターゲットとなる可能性を示唆しており、本論文は学位に値するものと認める。