The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Localization of KRAS downstream target ARL4C to invasive pseudopods accelerates pancreatic cancer cell invasion
Author(s)	原田, 昭和
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87849
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	原田昭和
論文題名 Title	Localization of KRAS downstream target ARL4C to invasive pseudopods accelerates pancreatic cancer cell invasion （ARL4Cの浸潤突起先端部への局在が膵癌の浸潤転移を制御する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

癌の発生母地は上皮組織であり、腫瘍化した上皮細胞が周囲の間質に浸潤し、続いて遠隔臓器へ転移することを大きな特徴とする。間質への浸潤は病態に強く寄与するが、腫瘍形成だけではなく、正常発生過程で上皮細胞が中空構造を伴って上皮管腔組織を形成する際にも類似した過程が認められる。実際、正常の管腔形成機構の制御異常の結果、癌の異常構造の形成をきたすことが知られている。つまり癌の悪性化の細胞機構の解明のためには、正常上皮管腔組織の分子基盤の理解が必須である。これまでの先行研究で私たちは、正常上皮細胞やマウス胎児組織を用いて、EGFシグナルとWntシグナルの協調的作用によって低分子量Gタンパク質であるArl4cが発現することを見出してきた。Arl4cは細胞運動や細胞増殖を促進し、上皮組織の管腔構造形成を制御することを明らかにした。胎生期において発現を亢進させるEGFシグナルとWntシグナルの両者は癌において異常活性化することが知られており、特にその傾向が顕著であるのが膵癌である。膵癌ではKRasの変異を9割以上の症例で認めることに加え、Wntシグナルの活性化もみられることから、Arl4cが膵癌の異常構造構築に関与するか明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ヒト膵癌患者検体を用いた免疫組織化学染色の結果、正常膵臓と比較して、膵癌腫瘍部ではArl4cが高発現していることが分かった。またArl4c高発現は全生存率において予後不良と有意に相関した。膵癌細胞株でもArl4cの高発現が確認され、WntシグナルとEGFシグナルを阻害することによって、Arl4cの発現を阻害することができた。さらに患者検体の病理組織学的指標の解析から、Arl4c高発現は神経周囲浸潤と有意に相関しており、Arl4cが浸潤に関与する可能性が示唆された。次に膵癌細胞株を用いてBoyden chamber assayにより運動能と浸潤能の評価を行ったところ、Arl4cの発現抑制により、浸潤能がより高度に抑制されることが分かった。膵癌の浸潤機構としてInvadopodiaと呼ばれる浸潤突起の形成がよく知られているが、Invadopodia assayを行ったところArl4c高発現細胞株ではInvadopodiaの形成を認めなかったことから、Arl4cを介した新規の浸潤機序の存在が考えられた。そこで細胞外基質中の3次元培養下での浸潤過程について、共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行った。その結果、Invadopodiaとは構造的に異なる突起物を認め、その先端にArl4cが集積することが分かった。また、細胞外基質であるコラーゲンの分解を検出するDQcollagenを用いた観察によって、突起先端に局在したArl4cを中心にコラーゲンが分解されており、このような突起物をInvasive pseudopodと定義した。Arl4cの発現を抑制したところ、Invasive pseudopodの先端部分でのコラーゲン分解能が減弱したことから、Arl4cは同構造を介した浸潤機構を制御していることが示された。さらにArl4cの下流シグナルの同定のため、免疫沈降法、マス解析を用いて、Arl4cの新規結合タンパク質としてIQGAP1を同定した。IQGAP1はinvasive pseudopodの先端でArl4cと共局在していたが、Arl4cを欠失させるとIQGAP1の局在が損なわれることから、Arl4cは同部位へのIQGAP1のリクルートに関与していると考えられた。さらに細胞外基質を分解する酵素であるMMP14もinvasive pseudopodの先端でArl4cとIQGAP1と共局在した。Arl4c、IQGAP1をそれぞれ発現抑制するとMMP14の局在が損なわれたため、Arl4cとIQGAP1がMMP14の局在に必要であることが分かった。すなわちinvasive pseudopodの先端でArl4c-IQGAP1-MMP14のシグナル軸が細胞外基質の分解を制御しているといえる。次に免疫不全マウスにヒト膵癌細胞株を同所移植し、腸間膜へのリンパ節転移を評価した。このとき、Arl4cの発現を抑制するために、Arl4cに対する修飾型アンチセンス核酸(Arl4c-ASO)を用いており、腫瘍部への集積とArl4cの発現低下を確認した。Arl4c-ASO治療群ではリンパ節転移が抑制されており、免疫組織化学染色によって治療群ではリンパ管内への浸潤も抑制されていることが分かった。つまりマウス生体内において、Arl4cを介した浸潤制御機構の存在が示され、リンパ管を介した転移を制御していると考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

膵癌ではEGF-KRas-MAPKシグナルとWntシグナルによりArl4cが高発現しており、Invasive pseudopodの先端部分に局在し、Arl4c-IQGAP1-MMP14シグナル軸を介して浸潤転移を制御している。またArl4cは膵癌の治療標的にもなりうる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）	原田 昭和		
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	菊池 章
	副　査	大阪大学教授	竹田 潔
	副　査	大阪大学教授	谷内田 真一

論文審査の結果の要旨

本論文では正常臓器の組織構築を促進する因子であるArl4cが膵癌の悪性化に関与することを明らかにした。まず、ヒト膵癌患者検体の解析から、膵癌ではArl4cが高発現しており、浸潤転移に関与していることを示した。次に、膵癌細胞株を用いた実験から、Arl4cは浸潤突起の先端部に局在し、そこへ細胞外基質の分解に必要な分子群を集積させ、その結果細胞外基質を分解し、浸潤能を高めることが判明した。また、膵癌モデルマウスにおいて、Arl4cの発現を阻害する核酸医薬を投与すると膵癌の転移が抑制されたことから、Arl4cが生体内でも転移を促進しており、さらにArl4cが治療標的になる可能性も示した。以上、本論文はヒト患者検体の解析から得られた知見をもとに、実験生物学的手法を用いてArl4cを介する新規の膵癌浸潤機構を明らかにするとともに、Arl4cを標的とした膵癌の治療法にも言及した。臨床情報から基礎医学研究へと展開し、そして再び臨床応用へとつながる完成度の高い研究成果であり、学位の授与に値する。