



Title	悪性腫瘍進展過程におけるGATA6遺伝子の役割
Author(s)	高山, 峻
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87949
rights	
Note	

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

氏 名 （ 高 山 峻 ）	
論文題名	悪性腫瘍進展過程における <i>GATA6</i> 遺伝子の役割
論文内容の要旨 【緒言】 口腔癌を含む固形癌は一般的に進行すると切除不能となり、所属リンパ節や他臓器への転移も生じ、従来の治療法が奏功しない場合も多く、制御が困難となり予後不良となる。そのため、癌の進展過程の分子機構を理解し、新たな分子標的治療の候補遺伝子を同定することが重要である。 転写因子である<i>GATA</i>ファミリーは<i>GATA1</i>から<i>GATA6</i>の6つのタンパク質で構成されており、組織の恒常性と形態形成において重要な役割を担っている。その中でも<i>GATA6</i>については、近年、様々な癌との関連性が報告されており、注目されている。 口腔癌における頸部リンパ節転移の発生率は25～60%であり、口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）患者の再発リスクや生存率の低下と密接に関連しており、重要な予後因子である。リンパ節転移のない患者の5年生存率は約50～70%であるのに対し、リンパ節転移のある患者では30～50%と著しく低下しており、リンパ節転移の制御率を向上させることにより、再発や遠隔臓器への転移を防ぎ、OSCC患者の予後を改善できると考えられる。しかし、OSCCにおけるリンパ節転移のメカニズムに関しては依然として不明な点が多く残されている。 これまでに蛍光タンパクを安定発現させたOSCC細胞株V-SASとそのリンパ節高転移株であるV-SAS-LM8を利用した口腔癌リンパ節転移動物マウスモデルを用いて、OSCC細胞の上皮間葉転換（epithelial to mesenchymal transition: EMT）が頸部リンパ節転移を促進している可能性があることを報告してきた。しかしながら、<i>GATA6</i>とOSCCにおけるEMTやリンパ節転移との関連については不明である。 そこで、本研究では複数のOSCC細胞株での<i>GATA6</i>とEMT関連因子の発現を解析し、OSCCにおける<i>GATA6</i>とEMT、リンパ節転移との関連性について検討した。 【方法】 細胞：ヒトOSCC細胞株Ca9-22、V-SAS、V-SAS-LM8細胞を用いた。 OSCC細胞の過剰発現株およびノックダウン株の作製：目的遺伝子およびこれを標的とするshRNAを組み込んだpPBベクターをPiggyBac transposon systemでトランスフェクション試薬Lipofectamine3000を用いて遺伝子導入し、ピューロマイシンにより安定発現株を選別した。 遺伝子発現・タンパク発現の評価：遺伝子発現はRT-qPCR法にて評価し、タンパク発現はWestern-Blot法、免疫細胞染色法にて評価した。 RNA-seqおよびChIP-atlasによるデータベース解析：2種類の<i>GATA6</i>遺伝子ノックダウン株からRNAを抽出し、RNA-seq法にて遺伝子発現変化を網羅的に解析した。さらに<i>GATA6</i>の標的遺伝子探索をChIP-atlasを用いたデータベース解析にて行った。 口腔癌頸部リンパ節転移マウスモデル：Venus遺伝子を安定発現させたヒトOSCC細胞株をヌードマウスの舌に接種し、ライブイメージングでリンパ節転移を評価した。 【結果】 10種類のOSCC細胞における<i>GATA6</i>の発現を評価した結果、全ての細胞株で<i>GATA6</i>のmRNAレベルでの発現を認め、特にCa9-22細胞では高発現していた。次にCa9-22細胞とV-SAS細胞の<i>GATA6</i>ノックダウン株、V-SAS-LM8細胞の<i>GATA6</i>過剰発現株を作製し、EMTマーカー（E-cadherin、N-cadherin、vimentin）の発現変化を評価した。その結果、<i>GATA6</i>ノックダウン株では上皮系マーカーであるE-cadherinの発現は抑制され、間葉系マーカーの発現上昇が認められた。また、<i>GATA6</i>過剰発現株ではその反対の発現変化が確認された。続いて、V-SASの<i>GATA6</i>ノックダウン株とV-SAS-LM8の<i>GATA6</i>過剰発現株のリンパ節転移能をマウスモデルにて評価したところ、コントロール株と比較し、ノックダウン株ではリンパ節転移が亢進する傾向が認められ、過剰発現株ではリンパ節転移が減少する傾向を認めた。次に二つのノックダウン株から抽出したRNAを用いて、RNA-seq解析を行い、<i>GATA6</i>のノックダウンによる遺伝子	

発現変化を網羅的に解析し、二つの細胞株でコントロール株と比較し発現量が2倍以上減少した遺伝子を36個同定した。さらにChIP-atlasを用いた*GATA6*の標的遺伝子探索のデータベース解析の結果と合わせ、OSCCにおける*GATA6*の標的遺伝子候補と考えられる9個の遺伝子を同定した。9個のうちCa9-22の*GATA6*ノックダウン株で最も発現量が減少していた*AnnexinA10* (*ANXA10*) を標的としたshRNAをV-SAS細胞、Ca9-22細胞に導入し、ノックダウン株を作製、EMTマーカーの発現変化を評価したところ、E-cadherinとN-cadherinのmRNA発現は安定した変化が認められなかったが、vimentinはその発現が有意に上昇していた。同様に*ANXA10*過剰発現株を作製し、EMT関連マーカーを検討した結果、E-cadherinとN-cadherinのmRNA発現は変化しなかったが、vimentinはコントロール細胞と比較して、その発現が抑制されていた。これは、*ANXA10*が*GATA6*のEMT制御メカニズムにおけるvimentinの発現調節に関与している可能性を示唆するものである。

【結論】

本研究では、*GATA6*がOSCCにおけるEMTレギュレーターであることを確認し、*GATA6*発現はEMT誘導を抑制することにより、OSCCのリンパ節転移を抑制する可能性があることを示した。さらに、本研究結果は*GATA6*の標的遺伝子として同定された*ANXA10*が、*GATA6*によるOSCCのEMT誘導阻害機構におけるvimentinの発現抑制に関与している可能性を示唆している。*GATA6/ANXA10*カスケードは、EMT誘導を阻害し、リンパ節転移を抑制する可能性があり、OSCC患者のリンパ節転移に対する治療の潜在的な分子ターゲットとなる可能性がある。

(1985字)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (高 山 峻)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	鶴澤 成一
	副 査	教授	豊澤 悟
	副 査	准教授	前田 隆史
	副 査	講師	村上 智彦
論文審査の結果の要旨 本研究は、悪性腫瘍進展過程における GATA6 遺伝子の役割を解明することを目的とし、複数のヒト口腔扁平上皮癌（OSCC）細胞株を用いて GATA6 のノックダウン株および過剰発現株を樹立し、GATA6 の発現変化による影響を解析した。その結果、GATA6 は上皮間葉転換（EMT）誘導を抑制することにより、リンパ節転移を抑制する可能性があることを示した。さらに GATA6 のノックダウン株の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、GATA6 の標的遺伝子として ANXA10 を同定し、同遺伝子が GATA6 による OSCC の EMT 誘導阻害機構における vimentin 発現抑制に関与している可能性も見出した。 以上の研究結果は、GATA6 が OSCC における EMT レギュレーターであることを示し、OSCC 患者のリンパ節転移に対する治療の分子ターゲットとなる可能性があることを示している。 よって、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。			