



Title	Low mitochondrial DNA copy number induces chemotherapy resistance via epithelial-mesenchymal transition by DNA methylation in esophageal squamous cancer cells
Author(s)	久保, 祐人
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91812
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	久保 祐人
論文題名 Title	Low mitochondrial DNA copy number induces chemotherapy resistance via epithelial-mesenchymal transition by DNA methylation in esophageal squamous cancer cells (食道扁平上皮癌細胞において、ミトコンドリアDNAコピー数低下がDNAメチル化による上皮間葉転換を介して化学療法抵抗性を誘導する)
論文内容の要旨	
〔目 的 (Purpose)〕	
食道癌は手術・化学療法・放射線治療を含む集学的治療が実施されるものの未だ予後不良であり、難治性癌の一つとされる。エネルギー産生、シグナル伝達、アポトーシスなどの細胞機能において重要な役割があるミトコンドリアには独自のDNA(mtDNA)が存在し、さまざまな癌種でmtDNAコピー数の減少と腫瘍の進行や予後不良との関連性が報告されている。先行研究で、食道扁平上皮癌 (ESCC)において、mtDNAコピー数の低下が上皮-間葉転換(EMT)を誘導し、化学療法抵抗性や転移能の獲得に関連する可能性を報告してきた。しかし、mtDNAコピー数低下がEMTを誘導する詳細な機序は不明である。本研究では、EMT誘導作用機序としてミトコンドリア機能の重要な指標である膜電位(MMP)と核DNAの遺伝子発現を制御するDNAメチル化に着目した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
① 食道癌切除検体を用いたmtDNAコピー数と化学療法抵抗性の検討	
当科で術前化学療法後に根治切除を施行したESCC検体88例を用いて、検体のFFPEをLaser MicrodissectionでゲノムDNA(gDNA)を抽出し、mtDNAコピー数をqPCRで測定した。中央値をcut offにした2群間で治療効果と無再発生存期間(RFS)を比較検討した。mtDNAコピー数低下群で、病理学的治療効果のGrade0, 1aの割合が有意に多く(p=0.019)、RFSが有意に短く(p=0.027)、予後不良であった。	
② 食道扁平上皮癌細胞株を用いたミトコンドリア膜電位とEMTの作用機序に関する検討	
ミトコンドリア転写因子A (TFAM) のノックダウン(sh-TFAM)により、mtDNAコピー数が60%減少した食道扁平上皮細胞株TE11(TFAM-sh)を樹立し、chemosensitivity assayとapoptosis assayを行ったところ、TE11-fam-shにおいてIC50の増加とアポトーシス細胞割合の低下を認め、化学療法抵抗性が確認された。次にmtDNAコピー数とMMPの関連を蛍光免疫染色とcomplex activity assay(MMPを制御する電子伝達酵素“複合体(complex)”の活性化を評価)を用いて検討した。その結果、TE11-fam-shにおいて、MMPの低下、複合体の活性低下を認め、mtDNAコピー数は複合体を介してMMPを低下させることが示唆された。さらに脱分極剤“CCCP”を用いて、mtDNAコピー数の低下は生じない状態において、MMPを低下させ、qPCR、Western blottingでEMTの関連遺伝子の発現を検討した。その結果、上皮系マーカー(CDH1)の発現が減少し、間葉系マーカー(CDH2, Vimentin, ZEB1)の発現増加を認めた。	
③ DNAメチル化とEMTの作用機序に関する検討	
mtDNAコピー数低下、MMP低下によるEMTの誘導メカニズムにおいて、DNAメチル化酵素(DNMT)との関連性について検討を行った。Western blottingでTE11-fam-shとCCCP 40μMを投与したTE11でDNMTの発現増加を認めた。またDNAメチル化率を評価するMethylated DNA Quantification Kitで、TE11-fam-shのDNAメチル化率の増加が確認された。一方、TE11-fam-shにてDNMT阻害薬(Zebularine)100μM投与によりWestern blotではCDH1の増加、CDH2, Vimentinの減少が確認された。また、chemosensitivity assayにおいては、TE11-fam-shに対するZebularine投与により、IC50の低下を認め、化学療法抵抗性の改善が確認された。	
④ 動物モデルを用いたDNAメチル化酵素阻害薬の抗腫瘍効果	
免疫不全マウスでTE11-fam-shの皮下腫瘍モデルを作成し、治療群はシスプラチン“CDDP”(2mg/kg)とZebularine(100mg/kg)を単剤もしくは併用、非治療群はPBSを3-4日毎に腹腔内投与し、投与開始14日後に4群間で抗腫瘍効果を検討した。CDDPとZebularineの併用投与により腫瘍増殖が有意に抑制された。また、摘出標本の免疫染色でCDH1の発現が増加、CDH2, Vimentinの発現は低下し、EMT誘導の抑制が認められた。	
〔総 括(Conclusion)〕	
食道扁平上皮癌におけるmtDNAコピー数減少は、ミトコンドリア膜電位およびDNAメチル化を介してEMTが誘導され、治療抵抗性を有することが示唆された。DNMTの抑制は、EMT誘導の抑制および治療抵抗性を改善させる可能性がある。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 久保 祐人				
論文審査担当者	(職)		氏 名	
	主 査	大阪大学教授	土岐 祐一郎	署 名
	副 査	大阪大学教授	猪俣 寿典	署 名
	副 査	大阪大学教授	島津 研三	署 名

論文審査の結果の要旨

食道癌は手術・化学療法・放射線治療を含む集学的治療が実施されるものの未だ予後不良であり、難治性癌の一つとされる。エネルギー産生、シグナル伝達、アポトーシスなどの細胞機能において重要な役割があるミトコンドリアには独自のDNA(mtDNA)が存在し、先行研究で、食道扁平上皮癌において、mtDNAコピー数の低下が上皮-間葉転換(EMT)を誘導し、化学療法抵抗性や転移能の獲得に関連する可能性を報告してきた。本研究では、mtDNAコピー数低下がEMTを誘導する詳細な機序の解明に着目し、食道扁平上皮癌におけるmtDNAコピー数減少は、ミトコンドリア機能の重要な指標である膜電位および核DNAの遺伝子発現を制御するDNAメチル化を介してEMTが誘導され、治療抵抗性を有することが示唆された。さらに、DNAメチル化酵素の抑制は、EMT誘導の抑制および治療抵抗性を改善させる可能性があることを示した。本研究は、食道癌に対する新規治療戦略の指標となりうる大変重要な研究であり、よって学位に値するものと認める。