

学位論文の要旨			
学位の種類	博 士	氏 名	藤井 瑞恵
学 位 論 文 題 目 Intercellular contact augments epidermal growth factor receptor (EGFR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-activation which increases podoplanin-expression in order to promote squamous cell carcinoma motility (細胞間接着依存性のEGF受容体-STAT3活性化はポドプラニン発現誘導を介して有棘細胞癌由来細胞株の運動性を亢進する) 共 著 者 名 本間大, 高橋英俊、山本明美、飯塚一 未 公 表 研 究 目 的 ポドプラニン(PDPN)は38KDの膜貫通型糖タンパクで、リンパ管内皮などの正常組織や有棘細胞癌(SCC)を含む種々の腫瘍でその発現が亢進し(引用文献1)、細胞遊走、浸潤に参与している。この細胞運動性亢進に関しては、細胞膜外ドメインを介するdirectional migration(参考文献1)、細胞質内ドメインとエズリン、モエシン、ラディキシン(ERMタンパク)との結合によるRhoA活性化を介した細胞遊走能亢進機構が関与すると考えられている(参考文献2)。しかしながら、その発現調節機構についてはいまだ不明な点が多い。今回、我々は、特に細胞密度に注目し、SCC細胞株におけるPDPN発現調節機構について検討を行った。 材 料 ・ 方 法 1. <u>細胞培養</u> 不死化ヒト表皮角化細胞(HaCaT)、各種ヒトSCC細胞株(A431、HSC2、HSC4およびHSQ 89)は10%牛胎児血清含Dulbecco変法Eagle培地(DMEM)を用いて継代培養した。 2. <u>免疫組織染色</u> ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて各種免疫組織染色を行った。 3. <u>Western blotting</u> RIPA bufferで抽出した各検体をSDS-PAGE後、PVDF膜へ転写した。特異抗体および化学発光を用いて目的タンパクを検出した。得られた結果はdensitometryを用いて定量化した。 4. <u>RT-PCR</u> Total RNA (5µg)を用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、特異的primerおよびExTaq DNA polymeraseを用いてPCR反応を行い、目的遺伝子を得た。増幅DNAは2%アガロースゲル上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで可視化した。			

5. Matrigel™ invasion assay

BD BioCoat Matrigel™ invasion chamberを用いて、細胞浸潤能を測定した。細胞4千個をチャンバー上部に添加し、48時間後に浸潤細胞数を計測した。

6. Adenovirus vector合成および各培養細胞への感染

COS-TPC法を用いてPDPN及びSTAT3特異的shRNA oligomerを組み込んだ組み換えadenovirus vectorを作成し、multiplicity of infection (MOI) 20で各virus vectorをSCC細胞株に感染させた。

成 績

1. PDPNの発現量と浸潤能は細胞密度の上昇に比例して増加する。

A431、HSC2およびHSC4細胞において、細胞密度依存性にPDPNの発現誘導が生じた。一方HaCaTおよびHSQ89細胞ではこの細胞密度依存性のPDPN発現誘導は認められなかった。前者では細胞密度上昇時に有意にMatrigelに対する浸潤能亢進を認めたが、後者では細胞密度を変化させても浸潤能に有意な変化は認めなかった。

2. 細胞密度依存性に誘導されるPDPNは細胞の浸潤に関与する。

PDPNが細胞密度上昇時の細胞遊走能亢進に関与するか否かを検討するため、shRNAを用いたノックダウン実験を行った。A431およびHSC2において、細胞密度上昇時にPDPN発現抑制を行うと浸潤能亢進が消失したことから、細胞密度依存性のPDPN発現増強は腫瘍細胞の浸潤能亢進に寄与することが明らかとなった。

3. 細胞密度依存性のPDPN発現誘導はEGFRおよびStat3リン酸化亢進と相関する。

細胞密度依存性のPDPN発現誘導がおこるA431、HSC2およびHSC4細胞ではEGFRの発現亢進がみられるが、PDPN発現誘導が観察されないHaCaTおよびHSQ89細胞ではEGFR発現が低いことが示された。また、正常ヒト表皮角化細胞においてSTAT3がPDPN発現誘導に重要であること（引用文献2）に加え、EGFR活性化がSTAT3の上流に位置することが示唆されていることから、EGFR-STAT3の経路に注目して検討を行ったところ、A431、HSC2およびHSC4細胞においては、細胞密度依存性のPDPN発現誘導が、EGFRおよびStat3のリン酸化亢進とともに生じることが明らかとなった。

4. 細胞密度依存性のPDPN発現誘導はEGFR-STAT3活性化に依存する。

細胞密度依存性のPDPN発現誘導がEGFRおよびStat3の活性化に依存するか否かを明らかにするため、EGFRのキナーゼ阻害剤であるAG1478とSTAT3特異的shRNAによるノックダウン実験を行った。この結果、AG1478添加によりEGFRのkinase活性が阻害されると、培養細胞密度を上げてもStat3の活性化及びPDPNの発現誘導を生じないこと、またStat3ノックダウンにより同様に細胞密度依存性のPDPN発現誘導が抑制されることが示され、細胞密度依存性のPDPN発現誘導がEGFR-STAT3経路を介することが明らかとなった。

5. SCC浸潤縁において、PDPN発現は活性化EGFRおよびSTAT3と共局在する。

日光角化症およびボーエン病から発生したSCC基底細胞層にPDPNの発現がみられ、その浸潤縁で特に強い発現が確認された。このようなPDPN発現部位の基底細胞層ではPDPN非発現部位と比べ、有意に細胞密度の増加を認めた。また、SCC連続切片においてPDPN、リン酸化EGFRおよびリン酸化STAT3が共局在していることが示された。以上の現象は1-4で示した*in vitro*の実験結果を支持する結果と考えられた。

考 案

今回、我々は、複数のSCC細胞株において、EGFR-STAT3経路活性化を介した細胞密度依存性のPDPN発現増強機構を明らかにした。また、実際に、このPDPN発現メカニズムはSCC細胞株の浸潤能増強に寄与することが明らかになった。細胞密度依存性のEGFR活性化機構については、これまでにintegrinを介する経路などが示唆されているが、詳細は不明である(参考文献3)。このPDPN発現誘導メカニズムの詳細についてはさらなる検討が必要であるが、我々が新規に示したPDPN発現誘導機構は*in situ*病変から浸潤病変にSCCが移行する過程で重要な機能を果たす可能性がある。

結 論

EGFR-STAT3経路活性化を介する細胞密度依性PDPN発現誘導はSCCにおいて浸潤能を増強する可能性が示唆された。

(3000字以内)

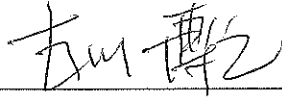
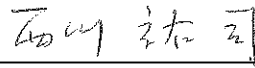
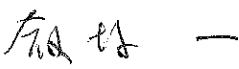
引用文献

- 1) Wicki, A., *et al.* (2007) The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 96, 1-5
- 2) Honma, M., *et al.* (2012) Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF-beta and STAT-3 activating cytokines, IFN-gamma, IL-6, and IL-22. *J Dermatol Sci* 65, 134-140

参考論文

- 1) Martin-Villar, E., *et al.* (2010) Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* 21, 4387-4399
- 2) Martin-Villar, E., *et al.* (2006) Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 119, 4541-4553
- 3) Yu, X., *et al.* (2000) Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J Cell Sci* 113 (Pt 12), 2139-2147

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	藤井 瑞恵
審査委員長   審査委員   審査委員  			
学 位 論 文 題 目			
Intercellular contact augments epidermal growth factor receptor (EGFR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-activation which increases podoplanin-expression in order to promote squamous cell carcinoma motility (細胞間接着依存性の EGF 受容体—STAT3 活性化はポドプラニン発現誘導を介して有棘細胞癌由来細胞株の運動性を亢進する)			
ポドプラニン(PDPN)は 38KD の膜貫通型タンパクで、リンパ管内皮など正常組織や有棘細胞癌(SCC)を含む種々の腫瘍でその発現が亢進し、細胞遊走、浸潤に関与している。藤井氏らは、特に細胞密度に着目して、SCC 細胞株における PDPN 発現調節機構について、1) PDPN の発現能と浸潤能と細胞密度との関係、2) PDPN と細胞の浸潤能とお関係、3) PDPN 発現誘導と EGFR および STAT3 リン酸化亢進との関係 4) PDPN 発現誘導 EGFR-STAT3 活性化との関係、5) 可溶性 EGFR リガ ンドによる PDPN 発現誘導の可能性、6) ヒトの SCC 浸潤癌における PDPN 発現ならびに細胞密度、PDPN 発現と活性化 EGFR および STAT3 との局在の関係について、詳細に検討した。			

結果として、1) PDPN の発現量と浸潤能は細胞密度の上昇に比例して増加すること、2) 細胞密度依存性に誘導される PDPN は細胞の浸潤に関与すること、3) 細胞密度依存性の PDPN 発現誘導は EGFR および STAT3 リン酸化亢進と相関すること、4) 細胞密度依存性の PDPN 発現誘導は EGFR-STAT3 活性化に依存すること、5) 可溶性 EGFR リガンドだけでは PDPN の発現が見られないこと、6) ヒトの SCC 浸潤癌の基底細胞層に PDPN の発現が見られ細胞密度の増加もみられ、PDPN 発現は活性化 EGFR および STAT3 と共局在することを明らかにした。このように、藤井氏らは、複数の SCC 細胞株において、EGFR-STAT3 経路活性化を介した細胞密度依存性の PDPN 発現増強機構を見だし、SCC における PDPN 発現誘導がその浸潤能を増強する過程で重要な働きを示していることを 実験だけでなく臨床でも明らかにした。

本研究は、SCC の浸潤において EGFR-STAT3-PDPN 系の発現がそのメカニズムとして重要な役割を果たしていることを示しており、SCC の進展を抑制する治療法としての EGFR-STAT3-PDPN 系阻害薬の開発に重要な基盤を提供する可能性がある。

申請者に対して、論文内容、関連領域について各委員から多数の試問がなされたが、これに対して丁寧かつ真摯に科学的な回答で対応しており、関連分野において広い知識を有していると判断しました。本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論分は申請者が積み重ねた努力の結果であり、学術的にも充分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論しました。