




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第606号	氏名	岩崎和範
審査委員会委員	主査氏名	石崎敏理	
	副査氏名	杉尾賢二	
	副査氏名	松尾哲孝	

論文題目

Chronic hypoxia-induced Slug promotes invasive behavior of prostate cancer cells by activating expression of Ephrin-B1

(長期低酸素環境に曝された前立腺癌細胞では Slug を介した Ephrin-B1 の発現により浸潤能が亢進する)

論文掲載雑誌名

Cancer Science

論文要旨

進行性固形腫瘍ではその進行、治療にともない低酸素環境に曝されることがある。特に癌細胞は、低酸素状態に適応して、抗がん剤や放射線に抵抗性を示すうえに、浸潤・転移・再発の原因となる。従って、低酸素下での細胞挙動の解析は治療戦略を考えるうえで不可欠なものである。実際の腫瘍ではその増大に伴い長期間低酸素状態に曝されていると考えられるが、従来の研究では比較的短時間での低酸素環境下での検討が多い。そこで本研究では、まず前立腺癌細胞 LNCaP を用い、長期間低酸素状態での細胞の特性の変化について解析を実施した。Normoxia (21%O<sub>2</sub>; N)、Acute hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 48 時間; AH)、chronic hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 6 か月; CH) の条件で培養した細胞を対象に遊走・浸潤を検討したところ、CH 条件下では細胞は顕著な遊走・浸潤能の亢進を認めた。この亢進は、上皮間葉転換との関与が示されているため、CH 条件下での上皮間葉転換関連転写因子の発現変化を確認したところ、Slug 遺伝子の発現が特異的に上昇していることを見出し、さらに、RNAi 法を用い Slug を枯渇させることにより遊走・浸潤亢進の抑制が認められた。次いで、CH 条件下での Slug 遺伝子の役割を検討した。Slug は Zn-finger 領域を有する転写調節因子であることから、Slug の発現上昇に伴って発現が正に調節を受けている遺伝子群を網羅的に解析した。著者らは発現上昇を認め、かつ細胞運動に関与する遺伝子の中でも EphrinB1 に着目した。EphrinB1 の発現は、他の条件に比して CH 条件下で発現が上昇するとともに、RNAi 法による EphrinB1 の枯渇は CH 条件下での遊走・浸潤能亢進の抑制が認められた。Slug による EphrinB1 発現誘導の機序を調べるため、EphrinB1 のプロモーター領域を用いた Luc assay、ChIP assay を実施したところ、プロモーター領域内の 2 つの E-Box 配列に Slug が結合し、発現を上昇させていることが判明した。ホルモン療法施行後のヒト前立腺癌組織を用いた免疫組織染色により、長期間低酸素状態におかれた際、誘導されることが報告されている CAIX 発現細胞で Slug および EphrinB1 の発現亢進が確認された。このことは、ホルモン療法により腫瘍内血管が障害されることにより腫瘍が低酸素環境に曝されることと矛盾しない結果であった。これらの結果から、長期間の低酸素状態では Slug の発現が上昇することで EphrinB1 の発現誘導がおこり、細胞の遊走・浸潤能の亢進を惹起することが判明した。

本研究は今後の進行性前立腺癌治療に向けた新たな治療標的分子の同定に大いに貢献するものであり、審査委員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 岩崎 和範

## 論 文 題 目

Chronic hypoxia-induced Slug promotes invasive behavior of prostate cancer cells by activating expression of Ephrin-B1.

(長期低酸素環境に曝された前立腺癌細胞では Slug を介した Ephrin-B1 の発現により浸潤能が亢進する。)

## 要 旨

(緒言) 進行性固形腫瘍は、腫瘍の進行や治療に伴い、しばしば低酸素環境に曝される。低酸素環境は腫瘍の悪性化に関わる主要な因子の一つであるが、従来の研究は 42~72 時間程度の短期間における低酸素環境と腫瘍の悪性化との関連を解析したものがほとんどである。実際の腫瘍はその増大に伴い長期に渡り低酸素環境に曝されるが、長期低酸素環境が腫瘍に与える影響を調べた研究はほとんどない。今回我々は前立腺癌細胞が長期低酸素環境によって Slug を介し Ephrin-B1 が発現することで、浸潤能を獲得することを解明したので報告する。

(方法) 前立腺癌細胞株 LNCaP を、normoxia(21% O<sub>2</sub>)、acute hypoxia (1% O<sub>2</sub> 48 時間)、chronic hypoxia (1% O<sub>2</sub> 6 か月)の条件において培養した。これらの細胞株を用い、Slug および Ephrin-B1 の発現を western blot、RT-qPCR、蛍光免疫染色にて解析した。遊走能や浸潤能はマトリゲルチャンバーを用いた migration assay、invasion assay にて解析した。また chronic hypoxia において、Slug および Ephrin-B1 を siRNA を用いて knockdown し、遊走能、浸潤能を解析した。一方、normoxia を用い

て **Ephrin-B1** 過剰発現細胞株を作製し、遊走能、浸潤能を解析した。**Ephrin-B1 promoter** 領域を用いた **luciferase reporter plasmid**、および **promoter** 領域に存在する **E-Box motif** に変異を加えた **reporter plasmid** を作成し、**Slug** 発現 **plasmid** とともに **normoxia** へ **transfection** させ、**luciferase assay** を行った。さらに **chronic hypoxia** を用いて **ChIP assay** を行い、**Slug** と **Ephrin-B1 promoter** 領域の **E-box motif** との関連性を解析した。最後にヒト前立腺癌組織を用い、**Slug** および **Ephrin-B1** の蛍光免疫染色を行い発現解析を行った。

(結果) まず、**chronic hypoxia** では上皮間葉転換 (EMT) 関連転写因子である **Slug** が特異的に発現していることが分かった。**chronic hypoxia** において **siRNA** を用いて **Slug** を **knockdown** すると前立腺癌細胞の遊走能や浸潤能が有意に低下することより、長期低酸素前立腺癌細胞の遊走能、浸潤能に **Slug** の発現が強く関わっていることが分かった。しかし、EMT に特徴的な **E-cadherin** の発現消失や間葉系マーカーの発現亢進はみられず、EMT 自体は起こっていないと考えられた。そこで、**Slug** により誘導される遺伝子を網羅的に探索したところ、受容体型チロシンキナーゼ **Eph** 受容体のリガンドの一つである **Ephrin-B1** の発現が **Slug** によって誘導されることが分かった。**chronic hypoxia** において **Ephrin-B1** を **knockdown** すると浸潤能、遊走能の低下がみられ、一方で、**normoxia** において **Ephrin-B1** を過剰発現させると浸潤能の亢進がみられた。また **ChIP assay**、**luciferase assay** により、**Ephrin-B1** の **promoter** 領域に存在する 2 つの **E-box motif** に **Slug** が結合することで **Ephrin-B1** の発現が制御されることが分かった。さらに、ヒト前立腺癌組織における免疫染色では、特に前立腺癌に対する主要な治療法の一つであるホルモン療法施行後の前立腺癌組織において、**Slug** および **Ephrin-B1** の発現が亢進しており、これらの組織では長期低酸素環境で誘導されることが知られている **CA IX** の発現が認められた。この知見はホルモン療法によって腫瘍内血管が傷害され、腫瘍が低酸素環境に曝されるというこれまでの報告に一致していた。

(結語) 長期低酸素前立腺癌細胞では **Slug** を介して **Ephrin-B1** の発現が誘導され、浸潤能を亢進させることが示唆された。さらに **Ephrin-B1** は進行性前立腺癌に対する治療標的となり得、ホルモン療法と併用することでさらなる治療効果が期待されると考えられる。