

学位論文題名

低酸素下での

Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1-Like (ERO1-L)

の発現増強

学位論文内容の要旨

【緒言】

癌細胞の生体内で増殖は低酸素下の場合が多く、種々の適応遺伝子の発現が亢進すると言われている。これらの遺伝子の中には癌の進展、転移、血管新生、癌の治療抵抗性に関する遺伝子が報告されている。著者の属した研究グループは既に膀胱癌細胞の大部分が低酸素誘導転写因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF1 α)を恒常的に発現しアポトーシス抵抗性となっている事を報告している。今回の研究では、DNA microarray 法にて低酸素下で発現亢進することが判明した EST(expressed sequence tag)クローンから遺伝子を同定し、膀胱癌のアポトーシス誘導経路において働きうる因子の探索を目的とした。

【材料と方法】

1. 細胞株：膀胱癌細胞株 5 株, 乳癌, 子宮頸癌, 大腸癌細胞株, ヒト胎児腎細胞株 293 各 1 株を用いた。低酸素下培養は 1 % 酸素濃度下でおこなった。
2. 試薬：ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody は SIGMA 社より購入した。Flag 発現ベクターは当教室で作成した pCDNA3.1+vector を酵素処理して C-Flag sequence を組み込みシーケンスで確認された Pbx11vector を使用した。
3. DNA microarray は膀胱癌細胞株 PCI-10 を正常酸素分圧下, 低酸素分圧下で 16 時間培養し, Total RNA を TRIZOL Reagent を用い抽出した。抽出遺伝子の解析は, UniGEM human を用い低酸素下で 2 倍以上発現亢進した遺伝子を陽性候補とした。
4. RT-PCR, Real time PCR は細胞より抽出した total RNA より cDNA を作成後施行し、RTP-PCR はサーマルサイクラーにて増幅したあと行い、Real time PCR は ABI PRISM7900 HT を用いて行なった。
5. Western blot 法; lysis buffer で細胞を溶解後, 遠心して上清を回収し蛋白抽出液とした。サンプルを非還元条件下で 12% polyacrylamide gel を用いて電気泳動後, ニトロセルロース膜に転写した。blocking buffer にて非特異的結合を block 後、1次抗体で標識した。洗浄後 2次抗体と反応させ、ECL detection kit を用いて発色させた。
6. FACS 解析; アポトーシスは propidium iodide (PI) と annexin-V-FITC の 2 重染色後に FACS にて検討した。細胞を低栄養条件下 72 時間, 抗癌剤 cis-platinum 存在下で 48 時間培養後、FACS caliber flow cytometer にて死細胞を観察した。データ解析は Cell Quest を用いた。
7. ERO1L 発現株の樹立: ERO1L の全長塩基配列は primer により増幅し得られた断片をシーケンスで確認後、Pbx11 vector に BamHI と XbaI にて酵素処理して結合させた。細胞株

への導入はリポフェクタミンを用いG-418にて選択シクローンを得た。

【結果】

1. DNA microarrayにて見いだされた低酸素下で発現亢進する EST クローン 15 種類中, Real time PCR にて 2 種類の EST クローンは発現亢進する事が確認された。EST2 についてはコンピュータ上にて blast search を行った結果, endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like protein と相同遺伝子であることが判明した。

2. 低酸素下での ERO1-L mRNA 発現: real time PCR によって各種細胞株における ERO1-L mRNA 発現を定量的に比較検討し低酸素条件下で有意に増強することが判明した。

3. ERO1-L 発現株の樹立: MiaPaca2 細胞株に Flag-tag との融合蛋白として ERO1-L を強制発現させた細胞クローンを樹立した。導入細胞株の m-RNA 発現の確認には forward, ERO1-L sequence: AGCGCCAGATTTCAACTCT: reverse, FLAG sequence CTAGCTACTGTGCATCGTCCTTGTAATC を用いた。RT-PCR により導入遺伝子の mRNA を検討し, flag 抗体を用いた Western blot 法により蛋白発現を確認し, Pbx11ERO1LV4 と V6 を導入株として使用した。

4. アポトーシス感受性: 低栄養条件下 72 時間 (Glucose-Free DMEM+10%FCS: グルコース 13mg/dl), cis-platinum 10 μ M 48 時間処理後, FACS 解析した結果では ERO1-L 発現株においてはアポトーシス細胞比率が減少していた。

【考案】

本研究にて, (1) 低酸素下で癌細胞株での ERO1-L 発現が亢進すること, (2) ERO1-L の強制発現によって抗癌剤や低グルコース誘導アポトーシス感受性が低下する結果が得られた。ヒト ERO1-L の遺伝子は 2002 年にクローニングさればかりでまだプロモーター領域のクローニングには至っていないために, 今回は低酸素誘導転写因子 HIF1 α との関連について明らかにすることができなかった。今後の課題として検討されるべきと考えられる。ERO1-L は蛋白のジスルフィド結合形成過程を触媒する酵素として働いていると考えられている。ジスルフィド結合は, 多くの分泌蛋白や膜蛋白質の細胞質外のドメインに見出され, 生物機能発現や高次構造の安定化に重要な働きをしている。ジスルフィド結合の形成は, 主として真核細胞では小胞体内腔で, 蛋白質の膜通過の直後あるいは透過プロセスに共役して行われるがこの形成過程の解析はいまだそれほど進んでおらず, 酵母を用いた解析が進められている。酵母小胞体においては, Pdi1p (protein disulfide isomerase, チオレドキシン様たんぱく質) が, 基質である蛋白のジスルフィド結合を直接触媒する。Pdi1p は試験管内では自身の酸化・還元状態に応じて, ジスルフィドの形成・異性化・還元反応とともに触媒できるが, 生体内では, 膜表面蛋白質 ERO1p によって酸化型に維持されているためにジスルフィドの形成に働くため PDI とともに ERO1L が必須とされる。最近, PDI が低酸素によって誘導されること及びアポトーシス抵抗性に関与することが報告された。この機序として, 蛋白のジスルフィド結合による折りたたみと蛋白の安定性の増加が何らかの関与をしていると想像されている。今回著者が得た成績は, これまでの PDI の抗アポトーシス効果と矛盾しない成績であり, ERO1L によって PDI が酸化型に維持されてジスルフィド結合形成を促進し, 蛋白の安定化にかかわり, 最終的にアポトーシス抵抗性をもたらしていると考えられる。今後生体内の癌組織における ERO1L 発現, 細胞内局在の確認, siRNA による抑制などの検討を加えることによって, より機能を明らかにすることが必要と思われる。

【結語】低酸素下で ERO1-L 発現が亢進し, アポトーシス抵抗性を誘導することを明らかにした。低酸素という腫瘍環境が, ERO1-L 発現亢進を介して癌の生体内生存を可能にしている可能性があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

低酸素下での

Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1-Like (ERO1-L) の発現増強

癌組織は低酸素下にあることが多く、種々の適応遺伝子の発現が亢進する。これらの遺伝子の中には癌の進展、転移、血管新生、治療抵抗性に関する遺伝子が報告されている。本研究は癌の低酸素適応に関与する遺伝子を調べるためにDNA microarray法で低酸素下での発現亢進を認めたESTクローンから遺伝子全長を同定し、膀胱癌において抗アポトーシスに働きうる因子の探索を目的とした。DNA microarray法にて低酸素下で発現亢進することが判明したEST(expressed sequence tag)クローン15種類からReal time PCRによりEST2が低酸素下で発現亢進する事を確認した。EST2はコンピューター上にてblastsearchを行った結果、endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like protein(ERO1-L)と相同遺伝子である事が判明した。結果として1. 低酸素下で発現亢進するEST2がendoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like protein (ERO1-L) と相同遺伝子であることを確認した。2. ERO1-L mRNAの低酸素下での発現亢進をreal time PCRによって確認した。3. MiaPaca2細胞株よりERO1-L導入クローンを樹立した。4. ERO1-L導入株では低栄養条件や抗癌剤で誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を獲得していた。ERO1-Lはタンパクのジスルフィド結合形成過程を触媒する酵素で小胞体内腔でPDI (protein disulfide isomerase) と共役しておりPDIは低酸素発現が亢進しアポトーシス抵抗性に関与することが既に明らかになっているが本研究によりERO1-Lの強制発現によってアポトーシス抵抗性を獲得するというこれまでの報告と矛盾しない結果が得られた。ヒトERO1-Lがアポトーシス抵抗性をもたらす機序は明らかではないがERO1-LによってPDIが酸化型に維持されてジスルフィド結合形成を促進し、蛋白の安定化にかかわり、最終的にアポトーシス抵抗性をもたらしていると考えられる。今後生体内の癌組織におけるERO1L発現、細胞内局在の確認、siRNAによる抑制などの

検討を加えることによって、よりERO1Lの機能を明らかにすることが必要と思われる。

公開発表後、副査の吉木教授より低酸素誘導転写因子 HIF1 α と ERO1-L の関係 についての質問があった。申請者は ERO1-L の遺伝子はまだプロモーター領域のクローニングには至っていないために、今回はルシュフェラーゼアッセイなどで低酸素誘導転写因子 HIF1 α との関係について明らかにすることができなかったが今後の課題として検討されるべきと考えられると解答した。次に HIF1 α も同じように抗アポトーシス作用があるかについての質問があり申請者は HIF1 α も同様に抗アポトーシス作用があり、特に HIF1 α の下流にある Pim1 遺伝子が抗アポトーシス作用を持っていると解答した。次に ERO1-L を臨床的に応用する事についての質問があり申請者は dominant negative ERO1-L との TAT fusion protein をネーキッド DNA に細胞内で産生させて臨床応用を考えていると解答した。最後に生体の癌での ERO1-L の発現についての質問があり申請者は ERO1-L の抗体がなく今回はまだ調べる事が出来ませんでした。今後、検討すべき課題と考えていると解答した。次いで副査の長嶋教授より ERO1-L は protein disulfide isomerase (PDI) の所に作用していると思われませんがこの PDI を強発現させるとどうなるのかとの質問があり申請者は PDI (protein disulfide isomerase) を強発現させると同様に抗アポトーシス作用になる事はすでいくつかの論文で報告されており、PDI の下流において抗アポトーシス作用を示す蛋白として Ubiquilin がその候補と考えられているがしかしながら Ubiquilin がどのようにして抗アポトーシス作用を示すのかについては明らかではないと解答した。次に ERO1-L の発現は膵癌以外の癌、特に乳癌についてはどうかとの質問があり申請者は乳癌の細胞株でも同様に低酸素下で ERO1-L の発現が強く増強されたと解答した。さらに主査の浅香教授から解糖系酵素 Aldolase , Glut1 が低酸素下で発現が亢進するが ERO1-L が発ガンと同時にでてくるのかあるいは Aldolase , Glut1 の発現が亢進するために出現してくるのかとの質問があり申請者は癌は無秩序なタンパク質をつくっているため ERO1-L は発ガンと同時に発現亢進していくと考えられると解答した。次に血流豊富な癌 hepatocellular carcinoma での ERO1-L の発現についてはどうかの質問に対し申請者は膵癌の低酸素での発現増強より肝臓癌の細胞株では増強の程度は低かったと解答した。最後に Pim1 との抗アポトーシスの違いについての質問があり申請者は anoxia のときのアポトーシス機序はミトコンドリアを介した経路と言われており Pim1、ERO1-L についても同様にこの経路のどこかに阻害的に働く作用があると考えられると解答した。

本研究は ERO1-L が低酸素下で発現が増強されアポトーシス抵抗性に密接に関連する事を初めて明らかにしたもので、今後の癌の治療抵抗性に関する因子として臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。