

学位論文審査結果の報告書

氏 名 富樫 庸介

生年月日 昭和 57 年 1 月 18 日

本籍(国籍) 日本


学位の種類 博 士 (医 学)


学位記番号 医 第 118 / 号


学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)


論文題目 Frequent amplification of *ORAOV1* gene in
esophageal squamous cell cancer promotes an aggressive
phenotype via proline metabolism and ROS production.


審査委員

(主 査) 西尾和人 

(副主査) 河藤彰彦 

(副主査) 下代昌紀 

(副 査) 

(副 査) 

論文内容の要旨

【目的】

染色体 11q13 領域は食道扁平上皮癌を含む多くの癌種で増幅が報告されている。*Oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1)* 遺伝子は同領域で同定され、最近の酵母の研究で ROS 産生と関係することが報告されているが、ヒトでのその詳細な機能は明らかでない。そこで本研究はヒト食道扁平上皮癌での同遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】

レトロウイルスを用いて *ORAOV1* 遺伝子強制発現食道扁平上皮癌細胞株を作成し、表現型を検討した。また maltose binding protein (MBP) との融合タンパクを作成しペプチドマスフィンガープリント法を用いて結合タンパク質を検索した。さらに食道扁平上皮癌臨床検体について、TaqMan コピーナンバーアッセイにより *ORAOV1* 遺伝子の増幅を調べ、その臨床病理学的背景との相関を検討した。

【結果】

ORAOV1 遺伝子強制発現株ではコントロールに比較して *in vivo* では増殖・コロニー形成能が亢進した。また *in vivo* でも腫瘍増殖・形成能が亢進し、さらに病理学的に低分化な組織型を示した。MBP を用いたペプチドマスフィンガープリント法では *ORAOV1* タンパク質とプロリン代謝・ROS 産生に関わるピロリン-5-カルボン酸還元酵素との結合が示唆され、免疫沈降抗体法でも確認された。*ORAOV1* 遺伝子強制発現株では過酸化水素による酸化ストレスに対して耐性であり、ピロリン-5-カルボン酸還元酵素をノックダウンすることでその耐性がキャンセルされた。さらに *ORAOV1* 遺伝子強制発現株では細胞内プロリン濃度が上昇し ROS 産生能が低下していた。94 例のⅢ期食道扁平上皮癌臨床検体では 49/94 (53%) で *ORAOV1* 遺伝子増幅を認め、低分化な組織型と口側食道からの発祥と関係し ($P = 0.033, 0.012$)、生存期間が短い傾向にあった ($P = 0.16$)。

【考察】

本研究では *ORAOV1* がピロリン-5-カルボン酸還元酵素を介してプロリン代謝に関わることが示された。プロリンは ROS を補足することで酸化ストレスからがん細胞などを守ることが報告されており、今回の実験での *ORAOV1* 遺伝子強制発現株で細胞内プロリン濃度が上昇し ROS の産生が低下するという結果とも矛盾しない結果であった。ROS にはアポトーシスの誘導・細胞周期の停止といった作用があるため、ROS の産生が低下することでこれらの作用が抑制され、がんに促進的に働いていると考えられた。さらに *in vivo* でも臨床検体でも *ORAOV1* 遺伝子は低分化な組織型と関連しており、*ORAOV1* により ROS の分化誘導能が阻害されるためと考えられた。

【結論】

ORAOV1 遺伝子は食道扁平上皮癌で高頻度に増幅しており、プロリン代謝・ROS 産生を通じ腫瘍増殖・形成能を亢進し、さらに低分化な組織型と関係する。*ORAOV1* 遺伝子は食道扁平上皮癌の新たな治療標的となり得る。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2013年 12 月 30 日 公 表 (doi : not available)	出版物名
	公 表 内 容	Oncotarget Vol. 5 No. 10 p.2962-2973
	全 文	2014年 5 月 30 日 発 行

論文審査結果の要旨

論文内容の要旨

本論文では染色体11q13に位置する*ORAOV1*という遺伝子がプロリン代謝を通じてROSの産生に関わることで、癌促進的な作用を有すること、さらに食道扁平上皮癌で高頻度に増幅が見られ、新たな治療標的の可能性があることが示されている。

1. 食道扁平上皮癌と*ORAOV1*について

食道扁平上皮癌は消化器癌の中で最も予後不良な癌の一つであり、特に進行癌の薬物治療については分子標的薬含め進歩があまり見られていないのが現状である。*ORAOV1*は染色体11q13に存在する遺伝子であるが頭頸部癌や食道扁平上皮癌での関与が報告されている。しかしながら詳細な機能は明らかにされていない。

2. 実験的手法を用いた解析

正常組織や癌組織での*ORAOV1*の発現を見るために種々のcDNAを用いてReal Time RT-PCR法によるmRNAの発現を調べたところ、正常組織での発現はあまり見られず、11q13の増幅が見られる食道扁平上皮癌細胞株での高発現が観察された。次に*ORAOV1*の表現型への関与を調べるために、レトロウイルスベクターを用いた*ORAOV1*強制発現株をもとに*ORAOV1*の発現が低い食道扁平上皮癌細胞株で複数作製している。MTTアッセイとコロニーフォーメーションアッセイを用いて細胞増殖能・コロニー形成能を比較したところ強制発現株では両者ともに亢進していることが観察された。一方で、接着能や遊走能には変化が認められなかった。マウスでの腫瘍形成能と腫瘍増殖能が亢進し、さらにHE染色では低分化な組織型を示すという知見が得られている。

さらに詳細な機能を解析する目的で*ORAOV1*との結合タンパク質の探索するために、*ORAOV1*とマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行っている。得られた候補タンパク質について質量分析による解析を行い結合タンパク質としてpyrroline-5-carboxylate reductase (PYCR)が同定された。

PYCRはプロリンの代謝を通じてROSの産生に関わることが報告されていたため、*ORAOV1*強制発現株を過酸化水素に暴露したところ、細胞内のプロリン濃度が上昇し、フローサイトメトリーではROSの産生が低下し、MTTアッセイにより過酸化水素ストレスに対して耐性であることが観察された。この耐性効果はPYCRをsiRNAを用いてノックダウンすることでキャンセルされていた。

3. 臨床サンプルを用いた解析

III期の食道扁平上皮癌の手術サンプルについてTaqManコピーナンバーアッセイを用いて*ORAOV1*の増幅を検討しているが、約半数で増幅が観察された。臨床背景としては*ORAOV1*の増幅が低分化な組織型と関与しており、有意差はなかったが予後不良な傾向が見られた。

4. 考察

本論文では*ORAOV1*遺伝子の癌促進的に作用する機能について新たな知見を示し、予後不良で未だ分子標的薬治療の導入が進んでいない食道扁平上皮癌において約半数で同遺伝子の増幅が見られることを証明し、今後のがん治療の発展に繋がり得る有意義な研究であると考えられた。

審査結果の要旨

ORAOV1遺伝子の癌促進的な機能を詳細に解析することを目的として、表現型の検討に加えて結合タンパクを同定するという基礎的な実験が申請者自身により実施されたかを問うた。

本研究では、ORAOV1の癌促進的な作用について、新たな機能としてプロリン代謝とROS産生に関わることを示している。その過程において、培養細胞、大腸菌及びタンパク質の取り扱い方法、レトロウイルスベクターを利用した強制発現系の構築方法、細胞株を用いたタンパク質発現の評価、フリーサイトメトリーによる評価、また適切なアッセイの選択、組み立てについて理解・習得していると考えられる。研究の過程では、得られた実験結果を解釈し、段階的に必要とされるデータを得るために論理的な思考で、さらなる実験を計画することができている。

また、本研究で得られた結果をもとに、腫瘍増殖能の亢進、予後との関係や低分化な組織型との関与、今後の応用などについて、視覚的な手法も交えて明快な議論を行っている。最終試験においては、PYCRの酵素活性についての検討、ROSと組織低分化性との関係性についての考察、予後との相関についての考察、具体的な標的としての意義、などについての質疑があり、いずれも申請者により適切な回答がなされた。以上により本研究が申請者の仕事であることを確認した。

最終試験の結果

最終試験では本学位論文が申請者の研究成果であることを確認した。

学位授与の可否に関する意見

以上のことから、学位授与に相応しいと判断した。

博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 27 年 2 月 9 日

審査委員

主査

西尾 初人



副主査

伊藤 彰彦



副主査

下代 昌紀



副査



学位申請者氏名

富樫 庸介

論文題目

Frequent amplification of ORAOV1 gene in esophageal squamous cell cancer promotes an aggressive phenotype via proline metabolism and ROS production.

要旨

本研究において申請者は染色体11q13に位置するORAOV1という遺伝子がプロリン代謝を通じてROSの産生に関わることで、がん促進的な作用を有することを明らかにするとともに、食道扁平上皮癌で高頻度に増幅が見られ、新たな治療標的の可能性を示した。公聴会ではまず申請者から①正常組織および様々ながん細胞株でのORAOV1のmRNA発現を調べたところ11q13の増幅を有する食道扁平上皮癌の細胞株で特に発現が高いこと、②レトロウィルスを用いてORAOV1強制発現株を作成したところ腫瘍形成能・腫瘍増殖能が促進し、低分化な組織型を示したこと、③ペプチドマスフィンガープリント法によりORAOV1との結合タンパクとしてプロリン代謝とROSの産生に関わるPYCRが見つかったこと、④ORAOV1強制発現株では過酸化水素によるストレスに耐性であり、そのことがPYCRをノックダウンすることでキャンセルされること、⑤ORAOV1強制発現株では細胞内プロリン濃度が上昇しており、ROSの産生が低下していたこと、⑥食道扁平上皮癌の手術検体においてORAOV1の増幅が高頻度に見られ、低分化な組織型と予後不良な傾向と関係していたこと、について明快な発表がなされた。その後、PYCRの酵素活性についての検討、ROSと組織低分化性との関係性についての考察、予後との相関についての考察、具体的な標的としての意義などについての質疑があり、いずれも申請者により適切な回答がなされた。またプロリンを培地に加えたり抜いたりする実験についての提案、PYCRの強制発現株を用いた実験についての提案などがあり、今後の研究につながる公聴会となった。以上より本研究は申請者による仕事として確認され、学位を授与するにふさわしいものであると判断された。