

京都大学	博士 (医学)	氏 名	幸 長 弘 子
論文題目	Slow fluctuation of Rac1 activity is associated with biological and transcriptional heterogeneity of glioma cells (Rac1 活性のゆっくりとしたゆらぎはグリオーマ細胞の性質や遺伝子発現の多様性に関与している)		
(論文内容の要旨) 腫瘍細胞はモノクローナルな遺伝的背景を持つ。しかしながら、腫瘍組織は性質の異なる多種類の腫瘍細胞の集団であることが指摘されており、この不均一性が癌を根治するための大きな障害となっていることが分かってきた。例えば、腫瘍細胞ごとにその浸潤・転移能や薬剤耐性能などの生物学的性質には大きな差があることが示されている。このような腫瘍細胞集団の不均一性を生じさせる分子機構については、遺伝子増幅や点変異などの遺伝的变化に加えて、エピゲノム変化が知られている。これらの現象に加えて確率論的なシグナル伝達分子活性のゆらぎも腫瘍細胞の不均一性をもたらす原因の一つではないかと仮定を立て検証を行った。 対象として、グリオブラストーマ（神経膠芽腫）の浸潤様式の不均一性をテーマとした。グリオブラストーマは悪性度の高い予後不良の疾患であり、その最大の要因は極めて高い浸潤能にある。C6 グリオーマ細胞は、ラット由来の癌細胞であり、グリオブラストーマに似た性質を持つことから、古くからグリオブラストーマの研究に用いられている。”揺らぎ”の研究対象とする分子としては、細胞の遊走、浸潤を制御する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の一つ、Rac1 を用いた。Rac1 の活性は Förster resonance energy transfer (FRET) バイオセンサーを用いたライブイメージングによって測定した。FRET バイオセンサーを恒常的に発現する C6 グリオーマ細胞をラット脳内に移植し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、血管周囲の細胞は Rac1 活性が低く、一方、脳実質内に浸潤する細胞は Rac1 活性が高いことが分かった。さらに、1 細胞における Rac1 活性を 5 日間にわたって観察した結果、Rac1 活性のゆっくりとしたゆらぎを見出した。接着状態と浮遊状態で、Rac1 の細胞間の相対的な活性差が保たれることを確認したのち、セルソーターで Rac1 活性の高い細胞群と低い細胞群を分取した。プルダウン法や TLC 法などの生化学的手法を用いて、確かに Rac1 活性に基づいて分取できているかどうか確認した。また、Rac1 活性の高い細胞群は低い細胞群よりもマトリゲル中を速く浸潤した。このことは、ラット脳内で観察した現象と一致している。Rac1 活性に応じて分取した細胞を、次世代シーケンサーを用いて解析したところ、Rac1 活性の高い細胞群と低い細胞群での遺伝子発現パターンの違いが明らかになった。siRNA を用いたノックダウン実験により、Rac1 活性の高い細胞群で発現が有意に上昇していた 14 個の膜たんぱく質関連の遺伝子のうち、4 個の遺伝子がグリオーマ細胞の浸潤能と Rac1 活性に関与していることが分かった。また、Rac1 活性の高い細胞群で発現が上昇していた転写因子の Egr2 が上記の 4 個の遺伝子の発現を正に制御していることが分かった。これらシグナル伝達ネットワークは、グリオーマ細胞の Rac1 活性のゆらぎと浸潤能の多様性を引き起こすものの一因だと考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac1 の活性がゆらぐことによって C6 グリオーマ細胞の不均一性がもたらされるのではないかという仮説を立て、その検証を行った。Rac1 活性をモニターする FRET バイオセンサーを安定発現させる C6 グリオーマ細胞を用いて、Rac1 活性と浸潤能に相関があること、Rac1 活性は細胞周期よりも長い時定数でゆらいでいることを見いだした。次に、Rac1 活性の高い細胞群と低い細胞群を分取する技術を確立した。分取された Rac1 活性の高い細胞群は Rac1 活性の低い細胞群より浸潤度が高いことが確認できた。そこで、Rac1 活性のゆらぎの機構を解明するために次世代シーケンサーを用いて Rac1 活性に応じて遺伝子発現の変化する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子のうち、細胞膜に局在する遺伝子を中心にノックダウン実験を行い、C6 グリオーマ細胞の浸潤度、Rac1 活性、他の遺伝子の発現量への影響を解析し、ポジティブフィードバック、ネガティブフィードバックを含むシグナルネットワークの存在を明らかにした。このシグナル伝達ネットワークが、グリオーマ細胞における Rac1 活性のゆらぎと浸潤能の多様性を引き起こすものの一因である可能性がある。

以上の研究はグリオーマ細胞の Rac1 活性のゆらぎと浸潤能の多様性の解明に貢献し揺らぎのもたらす癌の多様性の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 3 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降