

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	高 橋 亮
論文題目	AFAP1L1, a novel associating partner with vinculin, modulates cellular morphology and motility, and promotes the progression of colorectal cancers. (ビンキュリンの新規相互作用因子 AFAP1L1 は細胞形態及び遊走能を変化させ、大腸癌進展を促進する)		
(論文内容の要旨) 【背景・目的】 AFAP1L1は、軟部肉腫に対するcDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイリングから、遠隔転移関連因子として新規に同定された。肉腫細胞株等を用いた解析では、AFAP1L1は細胞浸潤能や <i>in vivo</i> 腫瘍増殖能を亢進させることで肉腫の浸潤転移に寄与していることが示唆された。本研究は、AFAP1L1が上皮癌である大腸癌進展にも関与しているか検討すること、大腸癌進展における機能を解析すること、また分子標的治療ターゲットとしての可能性を探ることを目的とした。 【方法】 1) 大腸癌切除標本におけるAFAP1L1発現を定量的RT-PCR、免疫組織化学的染色で検討し、臨床病理学的因子との関連を統計解析した。2) 大腸癌細胞株RKO, SW480に対して強制発現安定株、同LoVoの発現抑制安定株を樹立し、 <i>in vitro</i> での表現型変化を評価した。マウス皮下異種移植、および形成した腫瘍に対してsiRNA局所投与による発現抑制実験を行った。3) 細胞免疫染色によって一過性強制発現AFAP1L1の細胞内局在を共焦点顕微鏡で評価した。4) 免疫沈降でAFAP1L1と共沈するタンパクを同定した。 【結果】 1) mRNA、タンパク両レベルで癌部でのAFAP1L1発現亢進を認め、隣接正常粘膜ではほとんど発現がなかった。多変量解析で、AFAP1L1強発現は直腸癌治療切除術後の再発リスクに関する独立して有意な因子であった。またリンパ節転移、脈管浸潤の有無という病理学的因子と組み合わせることで、より正確に再発予測が可能であった。 2) AFAP1L1強制発現、発現抑制によって細胞の <i>in vitro</i> 増殖能は変化しなかったが、マウス皮下異種移植では細胞株3種すべてでAFAP1L1発現と腫瘍増殖能に正の相関を認めた。AFAP1L1導入RKOで形成した皮下腫瘍にsiRNA局所投与してAFAP1L1発現を抑制すると、腫瘍増殖速度が抑制された。 <i>In vitro</i> では、AFAP1L1導入RKO細胞は平坦あるいは紡錘形から円形に形態変化をきたした。Time-lapse観察で、円形細胞は培養皿上の遊走能が亢進していた。円形のAFAP1L1導入細胞に対してsiRNAでAFAP1L1発現を抑制すると平坦・紡錘形に戻り、AFAP1L1が細胞形態を制御することが示された。AFAP1L1抑制LoVoにおいても、円形細胞が減少する傾向を認めた。 3) AFAP1L1は一部の細胞株で浸潤仮足形成を誘導し、同構造に局在することが知られているが、詳細な観察の結果、AFAP1L1は浸潤仮足のうち、アクチン主体のコア部分を取り巻くリング状構造に局在していた。 4) Vinculinノックアウト細胞は円形形態を呈し、2次元遊走能が亢進、またアノキスが阻害される。AFAP1L1導入細胞の表現型はこれと類似しており、またvinculinも浸潤仮足リング状構造に局在することから、この2因子が相互作用する可能性を疑って免疫沈降実験を行ったところ、強制発現系および内在性タンパク同士双方においてこれらの共沈を認めた。さらにAFAP1L1導入RKOの浮遊培養においてアノキス阻害を認め、AFAP1L1がvinculinの機能に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。 【結論】 AFAP1L1は治療切除術後の再発リスク予測に有効であり、また分子標的治療ターゲットの候補となる可能性がある。AFAP1L1は大腸癌細胞の遊走能や <i>in vivo</i> 増殖能亢進によって癌進展に寄与し、またこれにはvinculinとの相互作用が関与している可能性がある。			

(論文審査の結果の要旨)

AFAP1L1は軟部肉腫の遠隔転移関連遺伝子として同定され、その肉腫進展への関与が報告されてきた。AFAP1L1が上皮癌である大腸癌進展にも関与しているか、また分子標的治療ターゲットになり得るか検討すること、そして大腸癌進展における機能解析が本研究の主旨である。

大腸癌切除標本の癌部において、隣接正常粘膜に比べてAFAP1L1発現が亢進していた。AFAP1L1強発現は直腸癌治療切除後の再発に関する独立して有意な因子であり、またリンパ節転移の有無などとAFAP1L1発現を組み合わせることで、より再発予測力が向上することが示された。AFAP1L1発現はマウス皮下異種移植における腫瘍増殖能を亢進させ、これはsiRNA局所投与によって抑制された。AFAP1L1発現は細胞形態を丸く変化させるとともに、2次元遊走能を亢進させ、また接着斑を減少させた。更にアノキス阻害も認めた。これらはvinculinノックアウト細胞の表現型と類似しており、免疫沈降でこの2因子が共沈したため、高発現したAFAP1L1はvinculinに結合してその機能を抑制することで、大腸癌細胞の遊走能、*in vivo*増殖能亢進を通じて癌進展に寄与する可能性がある。

以上の研究は AFAP1L1 の大腸癌進展における機能の解明に貢献するとともに、治療切除後再発高リスク群の抽出や、新たな大腸癌分子標的治療薬の開発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 5 月 23 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