

京都大学	博士 (医学)	氏名	牟田 優
論文題目	Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine (腸上皮の腫瘍形成における ERK 活性動態の複合的制御)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 活性動態は細胞増殖や腫瘍形成において重要な役割を果たしているが、腸上皮における制御機構は明らかとなっていない。</p> <p>【方法】Förster/fluorescence resonance energy transfer (FRET) の原理を利用して ERK 活性を可視化するバイオセンサーを全身に発現したマウスの小腸上皮を二光子励起顕微鏡を用いて観察した。受容体による制御機構や腫瘍形成における ERK 活性動態を解明するために、マウスの正常小腸上皮および小腸腺腫から 3 次元培養(オルガノイド)を作成し、各種薬剤投与や遺伝子導入が ERK 活性動態や細胞周期へ与える影響をイメージングや免疫染色により解析した。さらに、網羅的遺伝子解析により Wnt 経路を通じて上皮成長因子受容体 (EGFR)-ERK シグナル動態に影響を与える制御因子を検索し、それらの ERK 活性動態への影響を観察した。</p> <p>【結果】生体イメージングにより小腸上皮において ERK 活性は 1 細胞単位で一過性に上昇し、この活性化は周囲の細胞へ伝搬していることが明らかとなった。オルガノイドにおいても同様のパルス状活性や伝播が認められ、ERK 活性動態は定常的な活性とパルス状の活性によって構成されると考えられた。正常オルガノイドにおいて ERK の定常活性は EGFR 阻害薬では低下しなかったのに対して、ErbB2 阻害薬により低下した。また、パルス状の活性は EGFR 阻害薬により減少したのに対して、ErbB2 阻害薬では明らかな変化を認めなかった。以上から、ERK の定常的な活性は ErbB2 からのシグナルが寄与している一方、パルス状の活性は EGFR からのシグナルにより主に制御されていると考えられた。次に、腫瘍形成における ERK 活性動態の変化を検証した。Apc 変異マウス小腸腺腫から作成した腫瘍オルガノイドでは、正常とは対照的に EGFR 阻害薬に反応し ERK 活性は低下した。パルス状の活性は正常と同様 EGFR からのシグナルにより主に制御されていた。さらに GSK 阻害薬により Wnt 経路を刺激した正常オルガノイドでも EGFR 阻害への感受性を示し、またパルス状活性も増加していた。以上から Wnt 経路の活性化は EGFR の ERK 活性への寄与を増大させることで活性動態を変化させていると考えられた。蛍光細胞周期プローブを発現するオルガノイドの解析では、ErbB2 からのシグナルが主に細胞増殖に寄与しており EGFR は副次的である事が示唆された。また Wnt 経路刺激により細胞増殖は EGFR 依存的に促進した。さらに、Wnt 経路が活性化したマウス小腸上皮において EGFR 発現が上昇した一方、ErbB2 発現に著明な変化が認められなかった。最後に網羅的遺伝子解析により Wnt 刺激により発現が変化する EGFR の制御因子を検索し Eglf6、Flna、Troy、Lrig3 の 4 分子を同定した。腫瘍オルガノイドにおいてこれらの発現を変化させると、EGFR 阻害薬への感受性が低下しパルス状活性が減少した。以上から、Wnt 経路刺激が EGFR 発現を増強するとともにこれらの分子発現を協調的に調整して EGFR-ERK</p>			

経路を促進させることで、細胞増殖に関与していると考えられた。

【結論】

1 細胞レベルでの ERK 活性動態を観察することにより既存の生化学的手法では困難な細胞機能解析が可能となった。本研究で用いたイメージング技術は様々な生体活動の機構を解明するのに有用である。

(論文審査の結果の要旨)

ERK 活性を可視化する FRET バイオセンサーを全身に発現した遺伝子改変マウスの小腸上皮の生体イメージングと同マウスから作製したオルガノイドのライブイメージングを行った。その結果、ERK 活性動態には定常的な活性と一過性のパルス状の活性の 2 つの活性様式があり、正常腸上皮において ERK の定常的な活性は主に ErbB2 からのシグナルによって制御されている一方、パルス状活性は EGFR 由来のシグナルにより制御されていることが明らかとなった。つづいて、小腸腺腫由来の腫瘍オルガノイドや薬理的に Wnt 経路を活性化したオルガノイドを解析したところ、Wnt 経路の活性化により EGFR からのシグナルが増強して EGFR 阻害薬への感受性が出現や ERK パルスの増加など ERK 活性動態が変化することが明らかとなった。さらにこの変化が細胞増殖の促進と関連していることが示唆された。最後に免疫染色や網羅的遺伝子発現解析により、Wnt 経路活性化の過程で EGFR 蛋白の発現亢進とともに複数の制御因子が協調的に作用することで、ERK 活性動態が変化し、細胞増殖の促進や EGFR 阻害薬に対する感受性の獲得に繋がると考えられた。

以上の研究は ERK 活性動態の複合的な制御機構と腫瘍における活性動態の変化の解明に貢献し、腸上皮の恒常性や腫瘍において ERK 活性動態が果たす意義の理解に寄与するところが大きい。

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 30 年 8 月 30 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。