

京都大学	博士（医学）	氏 名	植垣 正幸
論文題目	Downregulation of RalGTPase-activating protein promotes invasion of prostatic epithelial cells and progression from intraepithelial neoplasia to cancer during prostate carcinogenesis（RalGAP の発現低下は前立腺発癌過程において、前立腺上皮細胞の浸潤能を亢進し上皮内腫瘍から癌への進行を促進する。）		
（論文内容の要旨）			
<p>近年の研究で、低分子GTP 結合蛋白質 Ral は様々な癌種でその活性が強く上昇しており、浸潤・転移に重要な働きをしていることが報告されている。また RalGTPase-activating protein（RalGAP）は Ral の抑制性制御因子として同定されて、膀胱癌の発癌・進行に関与する。一方、Ral 経路は前立腺癌の発生、進行に関与することが報告されているが、その働きの多くは解明されていない。本論文の目的は前立腺癌の発癌・進行における RalGAP の機能を明らかにすることである。</p> <p>2つの独立した前立腺癌組織マイクロアレイ（65 例、164 例）で免疫組織学的染色を行ったところ、前立腺癌組織は正常前立腺組織よりも RalGAP $\alpha 2$ の発現が有意に低下していた。さらに前立腺癌、前立腺上皮内腫瘍（PIN）、前立腺正常腺管組織が同時に存在する前立腺全摘標本 20 例でも RalGAP $\alpha 2$ の免疫染色を行ったところ、前立腺癌と PIN との間に発現の差を認めた。また、前立腺発癌過程における重要な driver である ERG と RalGAP $\alpha 2$ の発現に相関は認めなかった。</p> <p>不死化前立腺細胞株（RWPE1）、及び前立腺癌細胞株（MDA PCa 2b）において RalGAP $\alpha 2$ の発現を抑制すると、細胞増殖に影響することなく、遊走能及び浸潤能が亢進した。逆に、RalGAP $\alpha 2$ を強制発現させた前立腺細胞株（PC3、DU145）において、遊走能及び浸潤能は抑制された。</p> <p>Ral の下流分子 FLNA は発現低下すると遊走能及び浸潤能が促進することが報告されている。RWPE1 及びMDA PCa 2b において RalGAP $\alpha 2$ を抑制すると FLNA の発現が低下した。DU145 の RalGAP $\alpha 2$ を強制発現させると FLNA の発現が亢進した。</p> <p>またRalA/B 阻害薬（BQU57、RBC8）はPC3 と DU145 の control（empty vector）群、mut-RalGAP $\alpha 2$（GAP 活性欠失変異）群において遊走能を低下させたが、wt-RalGAP $\alpha 2$ 群の遊走能には影響しなかった。同様に PC3 control 群、mut-RalGAP $\alpha 2$ 群及びMDA PCa 2b shRalGAP $\alpha 2$ 群において RalA/B 阻害薬を投与すると浸潤能は低下したが、PC3 wt-RalGAP $\alpha 2$ 群及びMDA PCa 2b control 群の浸潤能には影響しなかった。</p> <p>さらに PC3 control 群、mut-RalGAP $\alpha 2$ 群の細胞は紡錘形を呈したが、wt-RalGAP $\alpha 2$ 群及びBQU57 の投与によって円形に変化した。また MDA PCa 2b shRalGAP $\alpha 2$ 群の細胞は紡錘形を呈したが、BQU57 の投与によって、MDA PCa 2b control 群と同様に円形に変化した。以上より、RalGAP $\alpha 2$ が発現低下した前立腺癌細胞は Ral の活性亢進を介して遊走能及び浸潤能が促進されるが、RalA/B 阻害薬の投与により抑制される可能性が示唆された。前立腺癌自然発生モデルとして広く用いられている <i>Pten</i> の前立腺上皮 conditional KO マウス（<i>PSA-Cre^{ERT2/+};Pten^{flox/flox}</i>）と <i>Ralgapa2</i> KO マウスを交配させて、前立腺腫瘍の表現型を評価した。<i>PSA-Cre^{ERT2/+};Pten^{flox/flox};Ralgapa2^{-/-}</i>）のマウスは control 群に比較して、前立腺体積は増加していないが、前立腺腫瘍の局所進展像が有意に増加していた。</p> <p>以上の実験結果から、RalGAP の発現低下は前立腺発癌過程において、前立腺上皮細胞の浸潤能を亢進し PIN から癌への進行を促進すると考えられる。</p>			

（論文審査の結果の要旨） RasファミリーのうちのRalは種々の癌腫においてその発生・進展に関与していることが報告されている。本論文の研究目的は前立腺癌の発癌・進行におけるRalGAPの機能を明らかにすることである。 2つの独立した前立腺癌組織マイクロアレイで免疫染色を行ったところ、前立腺癌組織のRalGAP $\alpha 2$ の発現は非癌前立腺上皮と比べて有意に低下していた。 前立腺不死化上皮細胞株（RWPE1）、前立腺癌細胞株（MDAPCa2b）において RalGAP $\alpha 2$ の発現を抑制すると、活性型 Ral の発現亢進、Ral の下流分子 FLNA の発現低下とともに、細胞の遊走能及び浸潤能が亢進した。逆に、前立腺癌細胞株（PC3、DU145）において RalGAP $\alpha 2$ を強制発現すると、活性型 Ral の発現低下、FLNA の発現亢進とともに、細胞の遊走能及び浸潤能が抑制された。 RalGAP $\alpha 2$ の発現抑制によってもたらされる細胞の遊走能及び浸潤能の亢進は、RalA/B 阻害薬（BQU57、RBC8）の投与によって打ち消された。 前立腺上皮内腫瘍に対する RalGAP $\alpha 2$ の機能を <i>in vivo</i> で解析するために、 <i>Pten</i> の前立腺上皮特異的ノックアウトマウス（ <i>PSA^{Cre-ERT2};Pten^{flox/flox}</i> ）と <i>Ralgapa2</i> ノックアウトマウスを交配させた。 <i>PSA^{Cre-ERT2};Pten^{flox/flox};Ralgapa2^{-/-}</i> マウスは <i>PSA^{Cre-ERT2};Pten^{flox/flox};Ralgapa2^{+/+}</i> あるいは <i>PSA^{Cre-ERT2};Pten^{flox/flox};Ralgapa2^{+/+}</i> マウスと比較して、前立腺腫瘍の局所進展が有意に増加していた。 以上の実験結果から、RalGAP の発現低下は前立腺発癌過程において、Ral 経路の活性化を介して前立腺上皮細胞の遊走能及び浸潤能を亢進し、上皮内腫瘍から癌への進行を促進することが示唆された。 以上の研究は前立腺癌における低分子量 GTP 結合蛋白質 Ral の意義を明らかにしたもので、前立腺癌の発癌機構の解明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、令和1年 10月 1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			