

|   |  |     |       |
|---|--|-----|-------|
| 京都大学  | 博士 ( 医 学 )   | 氏 名 | 萩 原 健 |
| 論文題目  | Hydrodynamic stress stimulates growth of cell clusters via the ANXA1/PI3K/AKT axis in colorectal cancer<br>(流体力学的ストレスはANXA1を誘導し、PI3K/AKTシグナル活性化を介して大腸癌細胞塊の成長を促進する) |     |       |
| (論文内容の要旨)<br>血流によって生じる流体力学的ストレス(hydrodynamic stress: HDS)は、血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)に様々な影響を与え、状況に応じて癌の転移に促進的にあるいは抑制的に作用する。近年は、CTCの中でも単細胞ではなく細胞集団として存在する"CTC cluster"が転移を形成する上でより重要であると報告されている。しかし従来のHDSモデルでは接着細胞や浮遊単細胞が用いられており、CTC clusterのモデルとなりうる浮遊状態の癌細胞塊におけるHDSの影響を報告した文献は少ない。<br>そこで、本研究では患者由来の癌細胞を用いた三次元オルガノイド培養法の一つであるcancer tissue-originated spheroid method (CTOS法)を用い、浮遊状態の大腸癌細胞塊が受けるHDSの影響について検討を行った。HDSの印加には、シリンジに装着した27G針を通過させる"シリンジ通過法"とガス交換可能な15mlチューブを約30rpmで回転して培養する"回転培養法"を用い、それぞれ、強い瞬間的HDSと弱い持続的HDSについて細胞増殖に対する影響を評価した。<br>まず、癌細胞塊(CTOS)にシリンジ通過法により瞬間的HDSを与えると、細胞増殖が1.2倍程度促進されることを見出した。さらに、2週間にわたり反復して瞬間的HDSを与える、もしくは持続的HDSを与えることにより、細胞増殖は最大で2.5倍程度まで促進され、HDSによる増殖促進効果は蓄積されることが明らかとなった。複数の患者由来の大腸癌CTOSで検討したところ、6例中4例の大腸癌CTOSでこの現象が確認された。なお、細胞塊を単細胞に分散した後にHDSを与えても増殖は促進されず、このようなHDSによる増殖促進は細胞塊においてのみ認められる現象であった。<br>次に、HDSによる増殖促進の分子機序について検討を行った。HDSは細胞膜障害を引き起こすことが知られているが、毒素蛋白ストレプトリシンOによりHDSを伴わない細胞膜障害を誘発しても、癌細胞塊の増殖が促進された。このことから、細胞膜障害がHDSによる増殖促進に関与していると推測された。そこでマイクロアレイ解析を行い、HDS後に発現上昇する遺伝子の一つとして、細胞膜修復に関わるAnnexinA1 (ANXA1)を抽出した。このANXA1をshRNAによりノックダウンすると、大腸癌CTOSにおけるHDS後の増殖促進は抑制された。一方、HDS後の増殖が見られない症例のCTOSにおいて、外因性のANXA1を過剰発現すると、HDSにより増殖が促進された。以上より、HDSによる癌細胞塊の増殖促進へのANXA1の関与が示唆された。<br>ANXA1の下流には、癌種や環境により異なる様々なシグナル経路の活性化が報告されているが、HDS後の大腸癌CTOSでは著明なAKTリン酸化の誘導を認めた。PI3K阻害剤(GDC-0941)で処理したCTOSにHDSを印加したところ、HDS後の増殖促進効果は抑制された。即ち、HDSによる癌細胞塊の増殖促進はPI3K/AKT経路の活性化を介することが示された。<br>以上の結果より、浮遊状態の大腸癌細胞塊はHDSによりPI3K/AKT経路を介した増殖促進をきたし得ることが明らかとなり、CTC clusterによる癌転移にHDSが促進的に作用することが示唆された。 |  |     |       |

(論文審査の結果の要旨)

流体力学的ストレス(hydrodynamic stress: HDS)は、血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)に様々な影響を与える。近年、CTCの中でも単細胞ではなく細胞集団として存在する”CTC cluster”が転移を形成する上でより重要であると報告されている。申請者らはCTC clusterのモデルとなりうる浮遊状態の癌細胞塊におけるHDSの影響について検討を行った。

患者由来の大腸癌細胞塊に瞬間的なHDSもしくは持続的なHDSを印加すると細胞増殖が促進されることを見出した。さらにHDSによる細胞膜障害が増殖促進に関与していることを見出し、マイクロアレイ解析により細胞膜修復に関わるAnnexinA1 (ANXA1)に注目した。ANXA1をノックダウンするとHDS後の増殖促進は抑制され、ANXA1を過剰発現するとHDS後の増殖促進は増強された。つまりHDS後の増殖促進にANXA1が重要であることを示した。HDS後に著明なAKTリン酸化の誘導を認めたが、ANXA1をノックダウンすると、その誘導は抑制された。またPI3K阻害剤によりHDS後の増殖促進効果は抑制された。即ち、HDSによる癌細胞塊の増殖促進はPI3K/AKT経路の活性化を介することを示した。

以上の結果より、浮遊状態の大腸癌細胞塊はHDSによりANXA1が誘導されPI3K/AKT経路を介した増殖促進をきたし得ることが明らかとなり、HDSがCTC clusterによる癌転移に促進的に作用することが示唆された。

以上の研究は血管内での大腸癌細胞塊の挙動の解明に貢献し大腸癌に対する新たな治療戦略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、令和2年2月26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