

京都大学	博士（薬学）	氏名	寺本 昂司
論文題目	グルコース飢餓におけるアミノ酸トランスポーターxCTを介したEphA2リガンド非依存的シグナルの制御		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>神経膠芽腫（グリオブラストーマ）は、脳腫瘍の中でも悪性度が最も高いグレードIVに分類されている。外科的切除、放射線療法、化学療法などによる治療が行われているが、現在も効果的な治療法が未だ確立されていないのが現状であり、5年生存率は10%以下と予後が非常に悪い疾患である。また、神経膠芽腫においてエフリン受容体（Eph）ファミリーに属するEphA2が過剰に発現していることが報告されており、薬物治療における新規ターゲット分子として期待されている。Eph受容体は、受容体型チロシンキナーゼの中でも最大のファミリーを構成しており、細胞膜においてリガンドであるephrinと結合することで、発生過程における細胞の位置決定や恒常性の維持に関わっている。一方、EphA2は脳腫瘍をはじめとする様々ながんにおいて過剰に発現しており、その発現量とがんの悪性度には密接な関係があることが報告されている。正常な細胞では、EphA2はリガンドであるephrinA1に結合するとチロシンキナーゼの活性が亢進する。一方、がん細胞においてEphA2は、リガンド非依存的に897番目のセリン（S897）がリン酸化されると、細胞の増殖や運動性を促進することが報告されている。しかし、様々なストレス環境下におかれた時に、EphA2が関わるシグナル伝達がどのように変化し、ストレスに対する適応性をどのように獲得するのかはわかっていない。そこで本研究では、がん細胞にとってストレスになりうるグルコース飢餓の環境においてEphA2を含めたEph受容体シグナル伝達の変化に着目し、その役割の解明をめざした。本研究では、EphA2が高発現している神経膠芽腫細胞をモデルとして用い、がん細胞におけるEphA2シグナルの指標となるS897のリン酸化を調べるとともに、CRISPR/Cas9システムを利用してEphA2欠損細胞を樹立して、グルコース飢餓時のEphA2の役割について検討した。</p> <p>3種類の神経膠芽腫細胞（U251、T98G、LN229細胞）を用いて、グルコース飢餓によるEphA2のS897のリン酸化に対する影響を調べた結果、グルコース飢餓においてEphA2のS897のリン酸化が亢進していることが明らかになった。これまでの報告から、グルコース飢餓によって活性酸素種（ROS）が産生され、プロテインホスファターゼ2A（P2A）に代表されるプロテインホスファターゼが可逆的に抑制されることが知られている。そこで、ROS分解酵素であるカタラーゼで処理したところ、グルコース飢餓によるEphA2のリン酸化が抑制された。一方、ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸で</p>			

単独処理すると、EphA2 の S897 のリン酸化が亢進した。以上の結果から、グルコース飢餓時に ROS の産生が起こり、ホスファターゼの活性が抑制されることによって、EphA2 の S897 のリン酸化が亢進する可能性が示唆された。また、これまでの報告から、少なくとも Akt、RSK、PKA が EphA2 の S897 をリン酸化することが明らかになっている。そこで、各種キナーゼ阻害剤を用いて調べたところ、RSK 阻害剤、及びその上流のキナーゼである MEK、ERK の阻害剤によってグルコース飢餓による EphA2 の S897 のリン酸化は抑制された。以上のことから、グルコースの飢餓時に起こる EphA2 の S897 のリン酸化には、MEK/ERK/RSK 経路が関与していることが示唆された。申請者の所属する研究室ではこれまでに、グルコース飢餓における ROS の産生にアミノ酸トランスporterである xCT の活性が必要であることを明らかにしている。xCT は、シスチンを細胞外から取り込んで、グルタミン酸を細胞外へ放出する交換輸送を行うアミノ酸トランスporterであり、神経膠芽腫を含め、様々ながん細胞においてその発現が上昇していることが報告されている。申請者は本研究で、xCT 阻害剤および xCT 欠損神経膠芽腫細胞を用いることで、グルコース飢餓による EphA2 の S897 のリン酸化に xCT の活性が必要であることを明らかにした。さらに、U251 細胞の EphA2 欠損細胞を CRISPR/Cas9 システムによって樹立し、グルコース飢餓に対する EphA2 の役割を検討した。その結果、グルコース飢餓時において EphA2 欠損細胞は、コントロール細胞と比較して有意に細胞生存率が低いことが明らかになった。

以上の結果から、EphA2 はグルコース飢餓状態における神経膠芽腫細胞の生存に関与することが示唆された。そして、グルコース飢餓のような環境下においては、EphA2 の S897 のリン酸化が起こる分子メカニズムを初めて見出し、神経膠芽腫細胞における栄養飢餓ストレスと Eph 受容体シグナルとの関係の一端を明らかにした。

※ 学位授与された方の「論文内容の要旨」、「論文審査結果の要旨」（審査教員作成）は、学位授与日から3ヶ月以内に京都大学学術情報リポジトリに掲載され公開されます。学位申請を行う方は掲載を承認されたものとします。

(論文審査の結果の要旨)

エフリンは、発生過程における細胞の位置や数を制御する重要な因子である一方、このシグナルの異常が様々な疾患の発症と深く関わっている。エフリン受容体の1つEphA2は、神経膠芽腫を含め様々な組織由来のがんにおいて過剰に発現しており、EphA2の発現量のがんの進行や患者の生存率と相関していることが多数報告されている。ところが、EphA2の発現量が増大することによってどのような異常なシグナル伝達が引き起こされ、がんの悪性化に寄与しているかについては不明な点が多いのが現状である。申請者は、栄養飢餓ストレス環境下のがん細胞においてEphA2受容体の過剰発現が及ぼす影響を解明することを目的に、グルコース欠乏によるEphA2受容体シグナル伝達の変化に焦点を当て、複数の神経膠芽腫細胞を用いて解析を行った。その結果、神経膠芽腫細胞の周りの環境からグルコースが欠乏することによって、EphA2のリガンド非依存的シグナルの指標となるEphA2の897番目のセリン残基のリン酸化が引き起こされることを申請者は見出した。本来はリガンドであるephrinA1がEphA2に結合することによって、細胞質領域のチロシンキナーゼが活性化され、細胞内にシグナルが伝達される。ところが、特に悪性度の高いがん細胞においては、リガンド非依存的にEphA2の897番目のセリン残基がリン酸化されることによって、がん細胞の増殖や運動性が促進されることが多数報告されている。そこで申請者は、グルコース欠乏によって引き起こされるEphA2のリガンド非依存的なシグナル伝達の意義と、その分子メカニズムの解析を行なった。その結果、グルコース欠乏によってEphA2の897番目のセリン残基のリン酸化が亢進すること、そのリン酸化の亢進には活性酸素種依存的なMEK/ERK/RSK経路が関与していることを申請者は明らかにした。また、アミノ酸トランスポーターであるxCTによる細胞外からのシスチンの取り込みが、グルコース欠乏によって引き起こされるEphA2の897番目のセリン残基のリン酸化には必要であることも申請者は示した。さらには、EphA2を欠損させた神経膠芽腫細胞では、グルコース欠乏条件下における細胞生存率が低下していることが明らかになった。以上の結果から、グルコース欠乏条件下に置かれた神経膠芽腫細胞では、細胞外からのシスチンの取り込みが引き金となってEphA2のリガンド非依存的なシグナル伝達が誘導され、そのシグナル伝達がグルコース欠乏条件下における細胞の生存を促進していることが示唆された。

本研究において申請者は、EphA2欠損細胞の作成から細胞死の解析、さらにはEphA2受容体のシグナル伝達の解析までを全て単独で行い、さらにEphA2の897番目のセリン残基がリン酸化される分子メカニズムとして、アミノ酸トランスポーターxCTによるシスチンの取り込みが関わっていることを明らかにした。様々なストレス環境に対するがん細胞の特性については非常に数多くの研究が行われ、競争の激しい研究分野である。その中で申請者は、栄養飢餓ストレス環境下に対するがん細胞の耐性獲得の分子メカニズムの一端を査読付き論文として発表することができた。申請者は本研究を通じて優れた研究者になるための多くの資質を身に付けたと言える。

以上のように、本論文には薬学に関する高度で幅広い学識、細胞生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認められた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降