

京都大学	博士 (医科学)	氏名	黒宮 敬介
論文題目	Calcium sparks enhance the tissue fluidity within epithelial layers and promote apical extrusion of transformed cells (カルシウムスパークは上皮層での組織流動性を亢進し、変異細胞の管腔側への逸脱を促進する)		
(論文内容の要旨) 近年、正常上皮組織にがん原性変異細胞が生じた際に、正常細胞と変異細胞との細胞競合現象を介して変異細胞が周囲の正常細胞によって管腔側へ排除(apical extrusion)されることが明らかになっている。これまでに変異細胞が排除される際の分子機序については徐々に明らかとなってきた。しかしながら細胞競合の初期段階において正常細胞が変異細胞をどのようにして認識し排除するのか、その詳細な分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。 本研究ではまず細胞競合の初期段階に関与するタンパク質を同定するために定量的質量分析法であるリン酸化 SILAC スクリーニングを行った。正常細胞 (MDCK) と RasV12 変異体を発現する細胞 (MDCK-pTR GFP-RasV12) を共培養し、それぞれの単独培養時を比較して、比較的早期 (RasV12 発現を誘導してから 6 時間および 10 時間後) にリン酸化レベルが変化するタンパク質を網羅的に探索した。その結果、単独培養条件と比較して共培養条件下において AHNAK2 というタンパク質のリン酸化レベルが上昇していることが明らかになった。さらに共培養条件下において正常細胞もしくは変異細胞のどちら側で AHNAK2 のリン酸化が上昇しているのか検討した。そこで、リン酸化 AHNAK2 を特異的に認識する抗体を作製し免疫染色法にてリン酸化 AHNAK2 を染色したところ、変異細胞と共培養した正常細胞側で AHNAK2 のリン酸化が亢進していた。次に AHNAK2 のリン酸化を制御するキナーゼを同定するために様々な阻害剤を用いて検討したところ、カルシウムによって活性化される Conventional Protein kinase C によって正に制御されていることが分かった。そこで共培養条件下における正常細胞内のカルシウム濃度を蛍光カルシウムセンサーである GCaMP を発現させた細胞を用いて調べた。その結果、単独培養時と比較して変異細胞と共培養した正常細胞側でカルシウムスパークと呼ばれるカルシウムの一過的な上昇がより頻繁に起こっていることが明らかになった。次に上流の分子メカニズムを検討したところ、メカノセンシティブカルシウムチャネルの阻害剤を添加した場合、さらにそのチャネルの一種である Transient Receptor Potential (TRP)C1 を正常細胞側でノックダウンすると、カルシウムスパークの頻度および AHNAK2 のリン酸化が抑制された。また共培養条件下における細胞運動に着目したところ、それぞれの単独培養条件と比較して正常細胞および周囲の変異細胞の運動能が亢進していることが分かった。さらに正常細胞側で TRPC1 をノックダウンすると、正常細胞だけでなく周囲の変異細胞の動きも抑制されることが明らかになった。また正常細胞側で TRPC1 をノックダウンすると変異細胞の排除効率も抑制された。 以上の結果より、細胞競合現象の初期において、正常細胞における TRPC1 を介したカルシウムスパークが上皮細胞層全体の流動性を亢進し、変異細胞の排除を促進することが示唆された。今後これらの研究をさらに進展させることによって、細胞競合の初期段階における正常細胞と変異細胞間の認識メカニズムの解明につながることを期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

正常上皮組織にがん原性変異細胞が生じた際に、正常細胞と変異細胞との間に起こる細胞競合現象を介して変異細胞が周囲の正常細胞によって管腔側へ排除されることが明らかになっている。しかしながら、細胞競合の分子メカニズムについては多くが未解明のまま残されている。

細胞競合の新規制御因子を同定するために、リン酸化 SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) スクリーニングを行い、正常細胞と Ras 変異細胞の混合培養条件下で、リン酸化が亢進しているタンパク質として AHNAK2 を同定した。また免疫染色の結果、AHNAK2 のリン酸化が Ras 変異細胞と共培養した正常細胞で上昇していることが分かった。さらに AHNAK2 のリン酸化はカルシウムによって活性化される Conventional Protein kinase C によって制御されていた。そこで混合培養時における正常細胞内のカルシウム濃度変化を調べたところ、カルシウムスパークと呼ばれるカルシウムの一過的な上昇がより頻繁に起こっていることが分かった。さらにこのカルシウムスパークが AHNAK2 のリン酸化を介して、上皮細胞層全体の流動性並びに変異細胞の排除を促進していることが明らかになった。

以上の研究は細胞競合の早期に見られる現象の解明に貢献し、細胞競合研究の進展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医科学) 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 5 年 2 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