

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	金 聖宇 (JIN SHENGYU)
論文題目	小胞体膜結合性転写因子ATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ がヌードマウスにおける癌細胞増殖に及ぼす影響の解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>細胞の主要な構成成分であるタンパク質は、アミノ酸配列により決定される固有の立体構造を形成することで多様な機能を持ち、生命活動に必須に必須の役割を果たす。真核細胞において、細胞が合成する全タンパク質の約3分の1が分泌経路に進む膜タンパク質と分泌タンパク質であり、小胞体内で折りたたまれて正しい立体構造を形成する。小胞体内腔には小胞体局在性分子シャペロン、ジスルフィド結合の形成を触媒するフォールディング酵素などが含まれており、これらは小胞体シャペロンと総称される。小胞体シャペロンは小胞体に輸送された膜タンパク質と分泌タンパク質の折り畳みを介助し、正しい立体構造を取れたタンパク質のみがゴルジ体以降へと進み、機能する場所へと運ばれる。</p> <p>しかし、分化あるいはウイルス感染や遺伝子変異などの生理的、病的な原因により正しい立体構造を取れなかったタンパク質が小胞体に蓄積してしまう場合がある。このような状況を小胞体ストレスと呼び、細胞は小胞体ストレスを解消するため、小胞体ストレス応答と呼ばれる生体防御機構を活性化する。</p> <p>小胞体ストレス応答は酵母から哺乳類に至るまで広く保存されており、哺乳類細胞の小胞体ストレス応答はIRE1, PERK, ATF6という3つの経路から構成されている。これら3つの小胞体膜貫通型タンパク質が小胞体ストレスセンサーとして、小胞体内部に構造異常タンパク質が蓄積したという情報を感知し、小胞体から細胞質、核へと情報を伝達する。</p> <p>PERK経路の活性化によりタンパク質の新規合成が一時的に停止され、小胞体へのタンパク質の流れ込みが抑制されることで小胞体の負荷が軽減される。IRE1経路とATF6経路が担う小胞体シャペロンと小胞体関連分解構成因子の転写誘導により小胞体のフォールディング能力と構造異常タンパク質の分解能力が増強される。小胞体ストレス応答によっても小胞体ストレスが解消されない場合、細胞はアポトーシスを誘導することで生体の恒常性を維持する。</p> <p>初期段階の癌細胞は正常な組織で見られない低酸素やグルコース飢餓などの微小環境ストレスに晒されている。癌細胞はこのようなストレス環境で生存するため、低酸素応答、小胞体ストレス応答を活用する。癌細胞の小胞体ストレス応答の活性化は抗癌剤薬剤耐性の原因にもなるため、腫瘍形成における小胞体ストレス応答の重要性が示唆されている。</p> <p>ウイルス感染により不死化されたマウス線維芽細胞をヌードマウスに移植すると、野生型細胞を移植した場合に比べ、IRE1経路下流の転写因子XBP1、あるいはPERKをノックアウトした細胞では腫瘍増殖が顕著に抑制されることが既に明らかにされている。ヒトトリプル乳癌細胞、多発性骨髄腫、前立腺癌細胞において、ヌードマウスでの腫瘍増殖にIRE1 <math>\alpha</math> が必須であることも知られている。このような研究に基づき、小胞体ストレス応答センサーの阻害剤を抗癌剤として利用することが期待されている。</p>			

一方ATF6経路について、癌関連の研究は進んでいない。哺乳類ATF6には共にユビキタスに発現するATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ という2種類のアイソフォームが存在し、ATF6 $\alpha$ が主として小胞体シャペロンの転写誘導を担うことが示されている。しかしながら、これらのシングルノックアウトマウスは特に目立った表現型を示さないものの、ダブルノックアウトマウスは胎生致死となるため、マウスではATF6 $\beta$ がATF6 $\alpha$ の欠損を補償していると考えられている。メダカでも同様の結果が得られている。

重要なことに、ATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ のダブルノックアウトマウスが非常に早期の胎性致死となるため、ATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ を二重欠損するマウス線維芽細胞は樹立されていない。それゆえ、ATF6経路が癌細胞のヌードマウス内増殖に及ぼす影響は調べられてこなかった。

そこで本研究ではATF6ノックアウトヒト癌由来細胞株を樹立し、腫瘍増殖におけるATF6経路の重要性について解析を行った。ヒト大腸癌由来細胞であるHCT116細胞株とゲノム編集技術であるTALEN法を用いてATF6 $\alpha$ 、ATF6 $\beta$ シングルノックアウトおよびATF6 $\alpha$ /ATF6 $\beta$ ダブルノックアウト細胞株の樹立に成功し、ATF6ノックアウト癌細胞を用いたヌードマウス移植実験が可能になった。

ATF6ノックアウト細胞を用いた解析より、初期段階の小胞体ストレス環境で主要な小胞体シャペロンの一種であるGPR94の転写誘導がATF6 $\alpha$ シングルノックアウト、ATF6 $\alpha$ /ATF6 $\beta$ ダブルノックアウト細胞で完全に抑制されることがわかった。これに対し、ATF6 $\beta$ シングルノックアウト細胞では野生型と同じレベルの転写誘導が見られたことから、HCT116細胞において、ATF6 $\alpha$ が小胞体シャペロンの転写誘導を制御すると結論つけた。これはマウス線維芽細胞を用いた先行研究と一致している。

一方、BiP/GRP78、ORP150、calreticulin、ERdj3などの小胞体シャペロンにおいてはGPR94と異なる転写誘導パターンが見られた。ATF6 $\alpha$ シングルノックアウト、ATF6 $\alpha$ /ATF6 $\beta$ ダブルノックアウト細胞において初期段階で抑制された転写誘導は小胞体ストレスが持続すると再び亢進されることがわかった。この現象はマウス線維芽細胞を用いた先行研究とは異なり、予想外の結果であった。

引き続き、HCT116細胞においてIRE1経路とPERK経路の活性化を調べた結果、ATF6 $\alpha$ が欠損されると、IRE1 $\alpha$ 、PERKが持続的に活性化されることがわかった。IRE1 $\alpha$ ノックアウト細胞でさらにATF6 $\alpha$ をノックダウンさせると、小胞体ストレス後期段階で亢進された小胞体シャペロンの転写誘導が完全に抑制されたことから、後期段階で見られた転写誘導の亢進は持続的に活性化されるIRE1経路、PERK経路により補償された結果であると考えられた。

次に、ヌードマウスへの移植実験を行い、HCT116細胞の腫瘍形成におけるATF6経路の必須性について検討した。興味深いことに、IRE1 $\alpha$ 、ATF6 $\alpha$ のシングルノックアウトおよびATF6 $\alpha$ /ATF6 $\beta$ ダブルノックアウト細胞は正常に腫瘍を形成できたが、IRE1 $\alpha$ ノックアウト/ATF6 $\alpha$ ノックダウン細胞の腫瘍増殖が有意に抑制されることがわかった。

ヒト大腸癌由来細胞ではマウス線維芽細胞とは異なり、ATF6 $\alpha$ が欠損されると、そのパラログであるATF6 $\beta$ ではなく、IRE1経路とPERK経路が活性化されることで持続的な小胞体ストレスに対応し、腫瘍形成に必要な関連因子の転写誘導を補う補償機構が存在すると考えられる。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

IRE1、PERK、ATF6という3つのシグナル伝達経路から構成される哺乳類の小胞体ストレス応答において、ATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ は共にユビキタスに発現し、小胞体シャペロンの転写誘導を担うという重要な役割を果たしている。

本研究では、従来のノックアウトマウスからノックアウト細胞を樹立する方法では作製できなかったATF6 $\alpha$ とATF6 $\beta$ のダブルノックアウト細胞を、大腸癌由来細胞株HCT116にゲノム編集を行うことによって樹立し、その諸性質を明らかにした。さらに、これをヌードマウスに移植すると、予想に反して、野生型細胞と同様に増殖した。この原因が、ATF6 $\alpha$ が欠損すると、IRE1経路とPERK経路が持続的に活性化されることにあることを見出し、IRE1ノックアウト細胞でATF6 $\alpha$ ノックダウンすると、ヌードマウスにおける増殖が有意に抑制されることを明らかにした。この結果は、癌細胞ではATF6 $\alpha$ の欠損を補償する戦略がマウスやメダカの場合とは異なることを示している。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年3月13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、合格と認めた。なお、本論文は即時全文公開とする。

要旨公表可能日：                    年            月            日以降