

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
浅海淳一 印	試料の提供、Discussionおよび論文原稿執筆および推敲
岡元邦彰 印	Discussionおよび論文原稿執筆および推敲
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	病態制御科学専攻歯科放射線学分野	身分	大学院生	氏名	難波友里
論文題名					
Depletion of Lipid Efflux Pump ABCG1 Triggers the Intracellular Accumulation of Extracellular Vesicles and Reduces Aggregation and Tumorigenesis of Metastatic Cancer Cells (脂質排出ポンプABCG1の抑制による細胞外小胞蓄積の誘導および転移性癌細胞における細胞凝集塊形成の抑制)					
論文内容の要旨 (2000字程度)					
<p>【背景・目的】</p> <p>ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーは、様々な物質輸送を担う膜タンパク質であり、その中でABCG1は細胞外への脂質の輸送を担うことが知られている。また、細胞内に脂質が増加することでアポトーシスの誘導や細胞周期移行の阻害等、がん細胞の生存が阻害されることが明らかになっている。そこで、ABCG1発現を阻害することにより、癌細胞からの脂質の排出を阻害し、抗腫瘍効果を得られないかとの着想を得た。本研究では、生体内組織に近似しうる三次元培養系を用い、腫瘍細胞凝集、内部低酸素、細胞増殖、脂質二重膜を持つ細胞外小胞の取り込みへの脂質排出ポンプABCG1の腫瘍における役割を検討した。また、がん患者におけるABCG1高発現の予後への影響を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>マウス大腸癌細胞株Colon26, その高転移性亜株LuM1, 低転移性亜株NM11の形態比較および全50種のABCファミリーの発現比較を行った。ABCG1 mRNAを標的とする小分子抑制性RNA (siRNA) および非標的コントロールsiRNAをエレクトロポレーションを用いて導入したLuM1を二次元及び三次元で培養し、細胞凝集、凝集内部の低酸素性、細胞増殖への影響の検討を行った。三次元培養には、ナノカルチャープレート、低接着プレートおよび幹細胞誘導培地を用いた。細胞凝集はハイコンテツスクリーニング系にてリアルタイム評価を行った。低酸素性は、蛍光低酸素プローブおよびHIF-1α免疫組織化学にて検討した。ABCG1 mRNAを標的とする小分子抑制性RNA (siRNA) および非標的コントロールsiRNAをエレクトロポレーションを用いて導入したLuM1をBALB/cマウス皮下に同種移植し、腫瘍形成性、ABCG1およびHIF-1αの発現・局在を免疫組織学的に検討した。</p>					

論文内容の要旨（2000字程度）

また、LuM1を培養している培地からLuM1が放出した細胞外小胞を回収し蛍光標識した上で培地に添加して、二次元培養及び三次元培養を行った。細胞内凝集の取り込みを認める細胞の割合および細胞凝集当たりの蛍光強度を、二次元培養においては3時間後と24時間後に測定し、三次元培養においてはハイコンテックスクリーニング系にてリアルタイム評価した。また、臨床データベースを用いて、各種がん患者においてABCG1高発現群とABCG1低発現群における生存率を比較検討した。

【結果】

siRNAを導入したLuM1からタンパク質を回収し、RT-qPCRおよびウェスタンブロッティングにてABCG1の発現抑制を比較検討したところ、ABCG1の発現抑制を確認出来た為、以降の検討に用いた。二次元培養および三次元培養において、LuM1はABCG1高発現で内部低酸素な細胞凝集を呈した。siRNA導入によるABCG1発現抑制下では、細胞凝集と細胞増殖が抑制された。LuM1移植マウスの腫瘍内部にHIF-1 α 高発現および広範囲壊死領域を認めたのに対し、ABCG1標的siRNA導入LuM1移植マウスの腫瘍においては、HIF-1 α の発現抑制および内部壊死領域の縮小を認めた。LuM1が放出した細胞外小胞を培地に添加して3時間後の時点ではABCG1標的siRNA導入による細胞外小胞の取り込み増加を認めたが、24時間後では非標的コントロールsiRNA導入群と同等であった。また、二次元培養及び三次元培養において、ABCG1標的siRNA導入により細胞外小胞の取り込みレベルが低下した。乳癌、頭頸部癌および大腸癌においてABCG1高発現による予後不良の傾向が認められた。

【考察】

転移性大腸癌においてABCG1は低酸素腫瘍塊形成や細胞外小胞の取り込みに寄与することが明らかとなった。ABCG1標的siRNAにより大腸癌細胞の増殖と凝集が抑制された。以上より、ABCG1が悪性腫瘍治療における標的となる可能性が示唆された。