

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 植木 雄志
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 930 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 PLOD2 is essential to functional activation of integrin $\beta 1$ for invasion/metastasis in head and neck squamous cell carcinoma
(Integrin $\beta 1$ を介した PLOD2 による頭頸部癌浸潤・転移制御機構の解析)
論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 若井 俊文
副査 准教授 高橋 邦行

博士論文の要旨

【はじめに】

頭頸部癌は全癌腫において6番目に多く、根治治療を行っても嚥下、発声、呼吸といったQOLの低下は免れない。また、治療後の再発や転移も約30%に生じるとされ、進行がんの5年生存率は約40%と予後不良な疾患であることから、QOL改善と治療効果の両面において新規治療の開発が求められている。近年、水酸化酵素群が転写因子、ヒストン、DNAなどの基質を水酸化もしくは脱メチル化することにより細胞周期や遺伝子発現に関与し、癌の進展に重要な影響を及ぼすことが報告されてきた。その中で、コラーゲンの水酸化及び架橋形成に必須なリジン水酸化酵素である procollagen lysyl hydroxylase 2 (PLOD2) は低酸素応答や TGF- β 刺激によってその発現が惹起され、細胞外基質の再構築など癌間質において乳癌、肝細胞癌、肉腫などの進展に関与することが報告されている。一方、癌細胞において PLOD2 ががんの進展に及ぼす作用は明らかになっていない。申請者らは、PLOD2 が口腔扁平上皮癌細胞において特異的に高発現することに着目し、癌細胞における PLOD2 の機能解析を行った。

【結果】

1. 口腔癌細胞における PLOD2 の特異的発現と細胞移動能への関与

口腔扁平上皮癌培養細胞において代表的な水酸化酵素の発現を RT-PCR、定量 PCR によりプロファイリングしたところ、PLOD2 の高発現が認められた。また、PLOD ファミリー分子として PLOD1, PLOD3 の発現も検索を行ったが、PLOD2 のみが特異的に高発現を示した。さらに、PLOD 特異的 siRNA によりノックダウンを行ったところ、siPLOD2 のみで顕著な移動能抑制が観察された。

2. 細胞移動能制御における PLOD2 と Integrin $\beta 1$ の相互作用

PLOD2 による細胞移動能制については、上皮間葉転換 (EMT) との関連性を考えたが、PLOD2 発現抑制下においては EMT マーカーの発現、細胞内局在に変化は見られなかった。一方、口腔癌細胞で高発現が認められ、細胞移動能への関与が知られた分子である Integrin $\beta 1$ の変化を検討したところ、PLOD2 発現抑制に

よる著明な Integrin・1 の発現抑制と、膜局在の減少が確認された。さらに、RT-PCR、イムノブロットにより PLOD2 による Integrin・1 の発現制御はタンパク質レベルで起こっていることが明らかとなった。また、PLOD2 のリジン水酸化ドメイン欠損変異体をクローニングし強制発現させた口腔癌細胞では移動能の亢進や Integrin・1 の増幅は認められず、PLOD2 は Integrin・1 を水酸化することでタンパク質の安定化に寄与していることが考えられた。

3. PLOD2 の Integrin・1 細胞内局在制御

生細胞内でのタンパク質間相互作用を蛍光色素で検出できる Fluoppi システムを用いて PLOD2 による Integrin・1 の細胞内局在制御を解析したところ、PLOD2 と Integrin・1 は ER に共局在し細胞膜へ移行することが確認された。さらに、免疫沈降からは PLOD2 wild type および水酸化ドメイン欠損変異のいずれにおいても Integrin・1 との結合が確認された。

4. PLOD2 による Integrin・1 水酸化および活性化機構

PLOD2 による Integrin・1 水酸化部位を解析するため、質量分析を行ったところ、アミノ酸配列 651 から 658 の”AFNKGEKK”配列が候補として挙げられた。同部位のリジン→アラニン変異体を作成したところ Integrin・1 の膜局在の低下が観察され、PLOD2 による Integrin・1 のリジン水酸化が Integrin・1 の安定化に必須であることが確認された。

5. In vivo における PLOD2 の転移促進作用

CRISPER-Cas9 システムにより PLOD2 ノックアウト細胞を樹立した。KO 細胞は Integrin・1 の発現低下及び膜局在の低下を示した。nude マウスにおける口腔扁平上皮癌胸膜播種モデルを作成したところ、PLOD2 wild 細胞に比較して KO 細胞では著明な胸膜播種の抑制が認められた。

6. 頭頸部癌組織における PLOD2 と Integrin・1 の共発現

ヒト頭頸部癌組織検体における PLOD2 と Integrin・1 の発現を免疫組織化学および蛍光 2 重染色にて検出したところ、癌蜂巣および浸潤先端部において共局在を示した。

【考察・結論】

悪性腫瘍における PLOD2 の機能としては、これまでに細胞外基質におけるコラーゲン再編成に注目した研究が報告されてきた。申請者らは本研究において、口腔扁平上皮癌細胞における内在性 PLOD2 が Integrin・1 に結合し、水酸化することで Integrin・1 の安定化及び膜局在を制御し、上皮間葉転換を介さずに頭頸部癌の浸潤・転移に影響を及ぼしていることをはじめて明らかにした。これらの知見は、PLOD2 を標的とした新しい癌の浸潤・転移抑制治療の可能性を示唆していると考えられた。

審査結果の要旨

癌細胞における細胞接着因子 integrin の制御機構を明らかにすることは、がんの浸潤や転移の分子機構を明らかにする上で重要である。申請者は、水酸化酵素の一つである PLOD2 が口腔扁平上皮癌細胞株において高発現することを見出した。口腔癌の培養細胞において PLOD2 発現抑制実験を行ったところ、移動能が顕著に抑制された。続いて、細胞移動能に関与する integrin β 1 の発現変化を検討したところ、PLOD2 発現抑制により integrin β 1 タンパクの減少と細胞膜局在の減少が確認された。PLOD2 mRNA の発現は変化がなく、PLOD2 による integrin β 1 の発現制御はタンパク質レベルでなされていた。触媒ドメイン欠損型 PLOD2 変異体を強制発現させた口腔癌細胞は、integrin β 1 タンパクの増加や移動能の亢進は認められないので、PLOD2 は触媒ドメインを介して integrin β 1 タンパクの安定化に寄与していると考えられた。Fluoppi システムを用いて細胞内分子間相互作用を調べると、PLOD2 と integrin β 1 は小胞体にて相互作用すること、免疫沈降実験により C 末の触媒ドメインを除いた N 末側の PLOD2 配列が integrin β 1 と結合することが確認

された。質量分析により水酸化されるリジン残基(K)を検索すると、アミノ酸配列 651 番から 658 番目の”AFNKGEKK”配列が見出されたので、3つのリジン残基をアラニンに変化させた triple KA 変異体を作成した。triple KA 変異体を癌細胞に発現させたところ、integrin $\beta 1$ の発現増強や膜局在の増加は観察されなかった。免疫不全マウスへの癌細胞移植実験において、PLOD2 KO 細胞では、野生型細胞に比べて胸膜播種の著明な減少が認められた。最後に、ヒト頭頸部癌組織検体を用いた免疫組織化学実験により PLOD2 と integrin $\beta 1$ は共局在を示した。

本研究は、口腔扁平上皮癌細胞に発現する PLOD2 が integrin $\beta 1$ の特定のリジン残基を水酸化することによりタンパクを安定化し、integrin $\beta 1$ の膜局在を増加させること、この新規分子メカニズムにより癌細胞の浸潤や転移に影響を及ぼしていることを初めて明らかにした。この点に学位論文としての価値を認める。