

氏 名 元尾 伊織
もとお いおり

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 313 号

学位授与年月日 令和元年 9 月 27 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

Methylation silencing of *ULK2* causes
transformation to poorly-differentiated cancers via
epithelial-mesenchymal transition

(ULK2メチル化サイレンシングは上皮間葉転換を
促進し、低分化型癌細胞へ変化させる)

論文審査委員

(主査)	教授	藤井 努
(副査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	岸 裕幸
(副査)	教授	林 龍二
(指導教員)	教授	安田 一朗

論文内容の要旨

〔目的〕

低分化型癌は浸潤能が強く、予後不良である。上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は癌浸潤の最初のステップである。ULK2はオートファジーの開始に関わる重要な蛋白質であり、ULK2発現低下は肺癌細胞株で遊走能とEMTを亢進したという報告があるが、胃癌におけるULK2の役割は不明である。

本研究では、胃癌の遊走能とEMTにおけるULK2の働きおよび臨床的意義を解明することを目的とした。

〔方法並びに成績〕

まず、胃癌細胞株 (NUGC3とMKN45) で*ULK2*をノックダウンし、ULK2発現低下により遊走能とEMTが亢進することを確認した。次に、ULK2発現低下による遊走能とEMT亢進のメカニズムを調べるため、mRNA発現の変動をmRNAマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、NUGC3とMKN45に共通して発現が上昇する92遺伝子の中で24遺伝子が遊走能と関連し、そのうち10遺伝子がEMTと関連した。同様に、共通して発現が低下する225遺伝子の中で30遺伝子が遊走能と関連し、そのうち4遺伝子がEMTと関連した。また、パスウェイ解析を行った結果、NUGC3とMKN45で細胞接着や細胞遊走に関連するパスウェイが誘導されていた。以上の結果から、胃癌細胞株ではULK2発現低下によって、遊走能とEMTに関連する遺伝子の変動し、実際に遊走能とEMTが亢進することを確認した。

次に、ULK2発現低下の臨床的意義について検討した。胃癌をLauren分類に従い腸型とびまん型に分類し、ULK2免疫染色を行った。正常胃上皮 (n=3) と腸型胃癌 (n=3) では全例でULK2発現を認めたが、びまん型胃癌 (n=4) では全例でULK2発現は低下していた。びまん型胃癌の発癌経路には、transformation経路とde novo経路がある。まず、transformation経路におけるULK2発現を評価するため、腸型成分を含むびまん型胃癌 (n=4) を解析した。全例で腸型成分ではULK2発現を認めたが、びまん型成分ではULK2発現が低下していた。次に、de novo経路におけるULK2の発現を評価するため、早期胃癌のびまん型胃癌 (n=1) を解析した結果、早期胃癌でも既にULK2の発現が低下していた。これらの結果から、びまん型胃癌はいずれの経路を経た場合でもULK2発現低下していること、transformation経路では腸型胃癌となった後にULK2発現低下が生じることが示された。

そして、de novo経路でのULK2発現低下が発癌過程の第1ステップとして生じる可能性を評価するため、ラット正常胃上皮細胞 (RGE1-01) で*Ulk2*をノックダウンした。RGE1-01での*Ulk2*発現低下は遊走能と増殖能を抑制し、アポトーシスを

誘導した。これらの結果から、ULK2発現低下は発癌過程の第2ステップ以降で働くことが示された。

最後に、ULK2発現低下のメカニズムとしてDNAメチル化の関連を確認するため、びまん型胃癌からDNAを抽出して、腫瘍部と非腫瘍部の *ULK2* のDNAメチル化状態を調べた (n=2)。その結果、全例で腫瘍部では *ULK2* がメチル化されていたが、非腫瘍部ではメチル化されていなかった。この結果から、びまん型胃癌の *ULK2* はメチル化サイレンシングされていることが示された。

〔総括〕

ULK2 メチル化サイレンシングが腸型胃癌または発癌過程の第 2 ステップ以降として前癌細胞に生じると、EMT が亢進され、低分化型癌であるびまん型胃癌に誘導されることが示唆された。

学位論文審査の要旨

〔目的〕

低分化型癌は浸潤能が強く、予後不良である。上皮間葉転 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は癌浸潤の最初のステップである。ULK2はオートファジーの開始に関わる重要な蛋白質であり、ULK2発現低下は肺癌細胞株で遊走能とEMTを亢進したという報告があるが、胃癌におけるULK2の役割は不明である。

本研究では、胃癌の遊走能とEMTにおけるULK2の働きおよび臨床的意義を解明することを目的とした。

〔方法並びに成績〕

まず、胃癌細胞株 (NUGC3とMKN45) で*ULK2*をノックダウンし、ULK2発現低下により遊走能とEMTが亢進することを確認した。次に、ULK2発現低下による遊走能とEMT亢進のメカニズムを調べるため、mRNA発現の変動をmRNAマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、NUGC3とMKN45に共通して発現が上昇する92遺伝子の中で24遺伝子が遊走能と関連し、そのうち10遺伝子がEMTと関連した。同様に、共通して発現が低下する225遺伝子の中で30遺伝子が遊走能と関連し、そのうち4遺伝子がEMTと関連した。また、パスウェイ解析を行った結果、NUGC3とMKN45で細胞接着や細胞遊走に関連するパスウェイが誘導されていた。以上の結果から、胃癌細胞株ではULK2発現低下によって、遊走能とEMTに関連する遺伝子が発現変動し、実際に遊走能とEMTが亢進することを確認した。

次に、ULK2発現低下の臨床的意義について検討した。胃癌をLauren分類に従い腸型とびまん型に分類し、ULK2免疫染色を行った。正常胃上皮 (n=3) と腸型胃癌 (n=3) では全例でULK2発現を認めたが、びまん型胃癌 (n=4) では全例でULK2発現は低下していた。びまん型胃癌の発癌経路には、transformation経路とde novo経路がある。まず、transformation経路におけるULK2発現を評価するため、腸型成分を含むびまん型胃癌 (n=4) を解析した。全例で腸型成分ではULK2発現を認めたが、びまん型成分ではULK2発現が低下していた。次に、de novo経路におけるULK2の発現を評価するため、早期胃癌のびまん型胃癌 (n=1) を解析した結果、早期胃癌でも既にULK2の発現が低下していた。これらの結果から、びまん型胃癌はいずれの経路を経た場合でもULK2発現低下していること、transformation経路では腸型胃癌となった後にULK2発現低下が生じることが示された。

そして、de novo経路でのULK2発現低下が発癌過程の第1ステップとして生じる可能性を評価するため、ラット正常胃上皮細胞 (RGE1-01) で*Ulk2*をノックダウンした。RGE1-01での*Ulk2*発現低下は遊走能と増殖能を抑制し、アポトーシスを誘導した。これらの結果から、ULK2発現低下は発癌過程の第2ステップ以降で働くことが示された。

最後に、ULK2発現低下のメカニズムとして、DNAメチル化の関連を確認するため、びまん型胃癌からDNAを抽出して、腫瘍部と非腫瘍部の*ULK2*のDNAメチル化状態を調べた (n=2)。その結果、全例で腫瘍部では*ULK2*がメチル化されていたが、非腫瘍部ではメチル化されていなかった。この結果から、びまん型胃癌の*ULK2*はメチル化サイレンシングされていることが示された。

〔総括〕

本研究により、胃癌細胞株においてULK2発現低下が遊走能とEMTに関連する遺伝子を変動させ、実際に遊走能とEMTが亢進すること、および、びまん型胃癌で*ULK2*メチル化サイレンシングがtransformation経路では腸型胃癌になった後に、de novo経路では発癌過程の第2ステップ以降に生じることを明らかとした。これらの結果から、ULK2の発現低下が低分化型癌への誘導に寄与する可能性が示され、今後ULK2が予後増悪因子や治療ターゲットとしての臨床応用が期待出来る。以上のことから、低分化型癌であるびまん型胃癌で*ULK2*がメチル化サイレンシングされており、それが生じる発癌ステップを初めて明らかにした点は新規性があり、低分化型癌の発生メカニズムの解明という理由により医学における学術的重要性も高く、癌治療の発展といった理由により臨床的発展性が期待できる。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。