

氏 名 よねはら けいすけ  
米原 啓介

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 372 号

学位授与年月日 令和 3 年 9 月 28 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 Tamoxifenにより生じるRSKを介したEphA2非定型的活性化機構  
(RSK-mediated non-canonical activation of EphA2 by tamoxifen)

論文審査委員

|        |     |       |
|--------|-----|-------|
| (主査)   | 教 授 | 藤井 努  |
| (副査)   | 教 授 | 笹原 正清 |
| (副査)   | 教 授 | 中川 崇  |
| (副査)   | 教 授 | 安田 一朗 |
| (指導教員) | 教 授 | 野口 誠  |

論 文 要 旨

Tamoxifenにより生じるRSKを介したEphA2非定型的活性化機構

( RSK-mediated non-canonical activation  
of EphA2 by tamoxifen )

氏 名 米 原 啓 介

備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。

② A4判とする。

## 〔目的〕

エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 陽性乳がん患者に対するtamoxifenの長期間投与は腫瘍再発の減少と生命予後の延長に寄与する確立された治療法である。しかし近年、tamoxifenへの耐性化や子宮内膜がんのリスク上昇といった有害事象が、臨床上的の問題となっている。

当初、tamoxifenは核内受容体であるER $\alpha$ に対してアンタゴニストとして働き、細胞の転写活性能を抑制する機序が見出されていたが、ER $\alpha$ に依存することなくMAPKをリン酸化し腫瘍促進的に作用するといった、従来までと相反する機能が近年報告されている。また、tamoxifenの投与を受けた乳がん患者の特定のグループにおいて遠隔転移が増加するという報告があり、腫瘍転移能に対するtamoxifenの関与が示唆されるが詳しい機序は不明な点が多い。

本研究では細胞の遊走能を調整する重要な経路であるとされているEphA2のMAPK関連非定型的活性化に、tamoxifenが関与していると考え、がん細胞に対するtamoxifenのMAPKを介したEphA2のリン酸化、細胞移動距離の測定による遊走能の評価およびEphA2の細胞内局在の変化について解析を行った。

## 〔方法並びに成績〕

### 【方法】

ヒト子宮頸がん細胞株HeLa細胞、ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231細胞およびヒト胎児腎細胞株HEK293細胞に、tamoxifenによる刺激を行い、ウェスタンブロット法によりMAPKをはじめとする各種タンパクの解析を行った。また、HeLa細胞に対して阻害剤処理、siRNAの導入を行いRSKの関与について検討した。

次に、タイムラプスイメージングシステムを用いて、MDA-MB-231細胞、同じくヒト乳がん細胞であるMCF7細胞に対し、tamoxifenによる刺激を行った際の細胞遊走能の測定と解析を行った。また、MDA-MB-231細胞に対し、tamoxifenによる刺激を行った際のEphA2の局在を免疫蛍光染色により観察した。

### 【成績】

ヒト子宮頸がん細胞であるHeLa細胞に対して高濃度のtamoxifenで刺激をすることでTNF- $\alpha$ と同程度にMAPKを活性化し、EphA2のSer-897までも強くリン酸化した。阻害剤処理およびsiRNAの導入により、MAPKの活性化抑制を行うことで、tamoxifenによるEphA2の活性化はMEK-ERK-RSK経路を介し、特にRSKによる調節を受けていることが判明した。


ヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231細胞に対して、tamoxifenによる刺激を行うとコントロールと比較して、著明に細胞の移動距離が増加し遊走能の亢進を認め、RSK阻害剤

の処理により遊走能は抑制された。MDA-MB-231細胞に対しtamoxifenによる刺激を行ったが明らかなEphA2のリン酸化の上昇は認めなかった。しかし、EphA2の局在を解析したところ、無刺激時に細胞先端へ存在していたEphA2は、tamoxifenによる刺激により細胞内へ取り込まれ、しばらくすると再度細胞先端へ局在を移した。

〔総括〕

がん細胞に対するtamoxifenの刺激は、MEK-ERK-RSKを介したEphA2のSer-897をリン酸化することで、EphA2の細胞内局在を変化させ、細胞の遊走能に重要な役割を果たしていることが示唆された。本来であればtamoxifenはER $\alpha$ に対して細胞の転写活性を抑制的に調整することで抗腫瘍効果が期待されるが、今回の結果は、MAPKの活性化と遊走能の亢進というtamoxifenの腫瘍促進的な一面を明らかとした。このような、MAPKを介した急速シグナル伝達経路の作用機序は未だに不明な点が多く残されている。今後、tamoxifenによる腫瘍進展のメカニズムが解明されることで、臨床的に問題となっている有害事象に対する解決策を見出すことが期待される。

## 学位論文審査の要旨

|   |   |                                       |   |
|---|---|---------------------------------------|---|
| 報告番号  | 富医薬博甲第 号  | 氏 名                                   | 米原 啓介   |
| 論文審査委員  | 職 名<br>(主査) 教授<br>(副査) 教授<br>(副査) 教授<br>(副査) 教授 | 氏 名<br>藤井 努<br>笹原 正清<br>安田 一朗<br>中川 崇 |  |
| 指導教員  | 教授  | 野口 誠                                  |   |
| (論文題目)<br>Tamoxifenにより生じるRSKを介したEphA2非定型的活性化機構<br>(RSK-mediated non-canonical activation of EphA2 by tamoxifen)   |   |                                       | (判定)<br>合格  |
| (論文審査の要旨)   |   |                                       |   |
| <p><b>【目的】</b></p> <p>エストロゲン受容体<math>\alpha</math> (ER<math>\alpha</math>)陽性乳がん患者に対するtamoxifenの長期間投与は、腫瘍再発の減少と生命予後の延長に寄与する確立された治療法である。Tamoxifenは核内受容体であるER<math>\alpha</math>に対してアンタゴニストとして働き、腫瘍細胞の転写活性を抑制するとされている。しかし近年、ER<math>\alpha</math>に依存することなくMAPKをリン酸化し腫瘍促進的に作用するといった、相反する機能が報告されてきた。さらに、tamoxifenの投与を受けた乳がん患者の特定のグループにおいて遠隔転移が増加するという報告もあり、腫瘍の転移能に対する関与なども示唆されている。</p> <p>本研究では、これらの機序の一端を明らかにする目的から、細胞の遊走能を調整する重要な経路であるとされているEphA2のMAPK関連非定型的活性化に着目し、がん細胞に対するtamoxifenのMAPKを介したEphA2のリン酸化、細胞移動距離の測定による遊走能の評価およびEphA2の細胞内局在の変化について解析を行った。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>ヒト子宮頸がん細胞株HeLa細胞、ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231細胞およびヒト胎児腎細胞株HEK293細胞に、tamoxifenによる刺激を行い、ウェスタンブロット法によりMAPKをはじめとする各種タンパクの解析を行った。</p> |   |                                       |   |

また、HeLa細胞に対して阻害剤処理、siRNAの導入を行いRSK(Ribosomal S6 kinase)の関与について検討した。次に、タイムラプスイメージングシステムを用いて、MDA-MB-231細胞、同じくヒト乳がん細胞であるMCF7細胞に対し、tamoxifenによる刺激を行った際の細胞遊走能の測定と解析を行った。また、MDA-MB-231細胞に対し、tamoxifenによる刺激を行った際のEphA2の局在を免疫蛍光染色により観察した。

### 【結果】

ヒト子宮頸がん細胞であるHeLa細胞に対して高濃度のtamoxifenで刺激をすることでTNF- $\alpha$ と同程度にMAPKを活性化し、EphA2のSer-897までも強くリン酸化した。阻害剤処理およびsiRNAの導入により、MAPKの活性化抑制を行うことで、tamoxifenによるEphA2の活性化はMEK-ERK-RSK経路を介し、特にRSKによる調節を受けていることが判明した。

ヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231細胞に対して、tamoxifenによる刺激を行うとコントロールと比較して、著明に細胞の移動距離が増加し遊走能の亢進を認め、RSK阻害剤の処理により遊走能は抑制された。MDA-MB-231細胞に対しtamoxifenによる刺激を行ったが明らかなEphA2のリン酸化の上昇は認めなかった。しかし、EphA2の局在を解析したところ、無刺激時に細胞先端へ存在していたEphA2は、tamoxifenによる刺激により細胞内へ取り込まれ、しばらくすると再度細胞先端へ局在を移した。

### 【総括】

がん細胞に対する tamoxifen の刺激は、MEK-ERK-RSK を介した EphA2 の Ser-897 をリン酸化することで、EphA2 の細胞内局在を変化させ、細胞の遊走能に重要な役割を果たしていることが示唆された。本来であれば tamoxifen は ER $\alpha$  に対して細胞の転写活性能を抑制的に調整することで抗腫瘍効果が期待されるが、今回の結果は、MAPK の活性化と遊走能の亢進という従来概念とは相反する結果を示した。

以上のことから、米原氏の本研究においては tamoxifen の腫瘍促進的な一面を初めて明らかにした点は新規性があり、上記機序を MAPK の活性化と遊走能の亢進という観点から解明した点は医学における学術的重要性も高く、tamoxifen による腫瘍進展の機序が詳細に解明されることで、新たな治療法の開発につながる可能性があることから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。