

学位論文題名

可溶化 I 型コラーゲンは SOCS2 の発現を増加させて
膀胱がん細胞 T24 の運動能を抑制する

学位論文内容の要旨

緒言

I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の遺伝子の発現は、様々なヒトがん細胞株において転写レベルで抑制されている。また、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖を強制発現させることによって、がん細胞の腫瘍形成能が著しく阻害されたという報告がある。しかし、I 型コラーゲンががん細胞の悪性形質を抑制する機序については、ほとんど解明されていない。今回、可溶化した I 型コラーゲンを細胞培養液に添加して、がん細胞の運動能や増殖能に及ぼす影響、およびこの際に発現が変化する遺伝子を分析した。

がん細胞の浸潤や遊走を促進する因子の 1 つとして、サイトカインや増殖因子の刺激を伝える転写因子である signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が報告されている。その STAT ファミリーの負の制御因子として suppressor of cytokine signaling (SOCS) ファミリーが注目されている。SOCS2 は成長ホルモン刺激を抑制する。SOCS2 ノックアウトマウスを用いた分析では、正常マウスに比べ約 1.5 倍の大きさとなり、骨の成長促進や各種臓器でコラーゲン蓄積の亢進が認められ、その巨大化には STAT5b の活性化が関与しているという報告もある。しかし、がん細胞の悪性形質と SOCS2 との関係は、ほとんど解明されていない。本研究では、可溶化した I 型コラーゲンを細胞培養液に添加すると細胞の運動能が抑制されること、この際に SOCS2 の発現が増加することを見出した。さらに、SOCS2 導入細胞株を用いて、SOCS2 が運動能および増殖能に及ぼす影響について検討した。

研究方法と結果

実験はヒト膀胱がん細胞株 T24 を用いて行った。細胞の運動能を wound healing assay で測定したところ、I 型コラーゲン添加により細胞運動能は約 50 % に低下した。細胞の増殖能には、I 型コラーゲン添加による有意な変化は見られなかった。ファイブロネクチンと IV 型コラーゲン

を用いて、細胞の運動能を調べたところ、ファイブロネクチン、IV型コラーゲンの細胞運動能への影響はほとんど見られなかった。細胞運動に強く関わる転写因子 STAT3 と接着因子 FAK の活性をウエスタンブロットング法で検出した。I型コラーゲン添加により STAT3 のリン酸化が顕著に阻害された。FAK はタンパク質量、リン酸化レベル共に I型コラーゲン添加による変化は見られなかった。

I型コラーゲン添加により発現が上下する遺伝子を cDNA アレイ法で網羅的に調べた。その中で、STAT の制御に関与すると考えられる SOCS2 遺伝子に着目した。SOCS2 の発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロットング法を用いて調べた結果、mRNA、タンパク質レベルで共に I型コラーゲン添加により明らかに上昇することがわかった。SOCS1 や SOCS3 では I型コラーゲンに対する応答性は認められなかった。SOCS2 導入細胞株を作製し、SOCS2 が細胞運動に与える影響を解析した。SOCS2 導入細胞株では、親株 T24 に比べ明らかな運動能の抑制が見られた。さらに、SOCS2 導入細胞株を用いて細胞増殖の実験を行ったところ、SOCS2 導入細胞株では、親株 T24 に比べ明らかな細胞増殖の抑制が見られた。

考察

I型コラーゲンが細胞運動や増殖にどのような影響を及ぼすのかについて、I型コラーゲンを細胞培養液に添加して検討した。その結果、I型コラーゲンは細胞増殖には影響を与えず、運動能を抑制することが明らかになった。I型コラーゲンががん細胞の転移・浸潤に深く関わる運動能を抑制する可能性が考えられ、非常に意味のある結果であった。また、その他の細胞外基質を用いて検討したところ、細胞運動能の抑制は I型コラーゲンに特異的な現象であった。I型コラーゲンが細胞膜の受容体に結合し、その刺激が何らかの細胞内経路を通して伝達され、細胞運動を抑制するものと考えられる。

I型コラーゲンの細胞運動抑制の機序を解析するため、転写因子 STAT3 と接着因子 FAK について検討したところ、活性型の STAT3 が顕著に減少した。STAT3 は様々ながん細胞で、異常活性化が報告されている転写因子であり、細胞運動を亢進することが報告されている。I型コラーゲンが STAT3 の活性を阻害することによって、がん細胞の運動能を抑制する可能性が考えられる。しかし、細胞運動に重要な Rho ファミリーを含め、他の遊走因子についての検討も必要と思われる。

I型コラーゲンの細胞運動抑制にどのような遺伝子の発現変化が関与しているのか、cDNA アレイ法で網羅的に調べ、STAT の制御に関与すると考えられる SOCS2 遺伝子に着目した。SOCS2 の発現は mRNA、タンパク質レベルで共に I型コラーゲン添加により明らかに上昇す

ることがわかった。しかし、培養液に添加したI型コラーゲンがどのような細胞内シグナル経路をたどり、SOCS2の発現を上昇させるのか、明らかでない。

I型コラーゲンがSOCS2を介して細胞運動能を抑制する可能性が考えられるため、SOCS2導入細胞株を作製し、運動能を解析した。SOCS2導入細胞株では、親株T24に比べ明らかな運動能の抑制が見られた。また、SOCS2が成長ホルモン刺激を負に制御することから、増殖能を抑制する可能性が考えられた。SOCS2導入細胞株では、親株T24に比べ明らかな細胞増殖の抑制が見られた。運動能の抑制機序として、SOCS2がSTAT3の活性を阻害している可能性があり、SOCS2導入細胞株を用いて転写因子STAT3の活性化レベルを調べたが、クローン間での違いが大きく、SOCS2がSTAT3の活性化を阻害するとは結論できなかった。これにはクローン間の差とともに、SOCS2の相反する作用が影響していると考えられる。SOCS2は低濃度では成長ホルモン刺激を抑制するが、欠損や高濃度では逆に、成長ホルモン刺激を増強することが報告されている。SOCS2がSTAT3の活性化に対してどのように影響するのか、今後の検討が必要である。最近の研究では、ヒト前立腺がん細胞において転移関連遺伝子としてSOCS2がDNAマイクロアレイ法により同定された。乳がんでは、SOCS2の発現が悪性度と逆相関するという報告、卵巣がんでは、抗がん剤耐性のある細胞でSOCS2の発現が低下しているという報告もある。これらの研究は、SOCS2ががんの悪性度と負に相関することを示している。

結論

1. I型コラーゲンは細胞の増殖には影響を与えず、運動能を特異的に抑制する。細胞運動の抑制には、STAT3の活性阻害が関わっている。
2. SOCS2遺伝子の発現がI型コラーゲン添加により増加する。SOCS2を過剰発現すると、細胞運動能および増殖能が阻害されることから、SOCS2はがんの悪性度を負に制御する可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 吉 田 幸 一

学 位 論 文 題 名

可溶化 I 型コラーゲンは SOCS2 の発現を増加させて 膀胱がん細胞 T24 の運動能を抑制する

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の遺伝子の発現は、様々なヒトがん細胞株において転写レベルで抑制されている。また I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖を強制発現させると、がん細胞の腫瘍形成能が著しく阻害されたという報告がある。しかし、I 型コラーゲンががん細胞の悪性形質を抑制する機序については、ほとんど解明されていない。今回、可溶化した I 型コラーゲンを細胞培養液に添加して、がん細胞の運動能や増殖に及ぼす影響、およびこの際に発現が変化する遺伝子を分析した。

ヒト膀胱がん細胞株 T24 を用いた実験において、細胞の運動能を wound healing assay で測定したところ、I 型コラーゲン添加により細胞運動能は約 50 % に低下した。細胞増殖には、I 型コラーゲン添加による有意な変化は見られなかった。また、細胞運動の抑制は I 型コラーゲンに特異的であった。がん細胞の浸潤や遊走を促進する因子の 1 つとして、サイトカインや増殖因子の刺激を伝える転写因子である signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が報告されている。細胞運動に強く関わる転写因子 STAT3 と接着因子 FAK リン酸化を調べたところ、I 型コラーゲン添加により STAT3 のリン酸化が顕著に阻害されたが、FAK は発現およびリン酸化レベルに変化は見られなかった。

I 型コラーゲン添加により発現が上下する遺伝子を cDNA アレイ法で網羅的に調べたところ、STAT の制御に関与すると考えられる suppressor of cytokine signaling2 (SOCS2) 遺伝子の発現が亢進していた。SOCS ファミリーは STAT3 の制御因子として最近注目されており SOCS ファミリーの一員である SOCS2 は、成長ホルモンなどの刺激を抑制する。SOCS2 ノ

ックアウトマウスでは、正常マウスに比べ約 1.5 倍の大きさとなり、骨の成長促進や各種臓器でコラーゲン蓄積の亢進が認められる。また、乳がんでは、SOCS2 の発現が悪性度と逆相関するという報告、卵巣がんでは、抗がん剤耐性のある細胞で SOCS2 の発現が低下しているという報告もある。これらの研究は、SOCS2 ががんの悪性度と負に相関することを示している。本研究では、可溶化した I 型コラーゲンを添加した T24 細胞で細胞の運動能が抑制されること、この際に SOCS2 の発現を調べた結果、mRNA、タンパク質レベル共に I 型コラーゲン添加により上昇することを見出した。SOCS1 や SOCS3 では I 型コラーゲンに対する応答性は認められなかった。

さらに、SOCS2 遺伝子導入細胞株を用いて、SOCS2 が運動能および増殖に及ぼす影響について検討した。T24 に SOCS2 を導入し、細胞運動および増殖について解析したところ、親株 T24 に比べ明らかな運動能および増殖の抑制が見られた。

運動能の抑制機序として、SOCS2 が STAT3 の活性を阻害している可能性があり、SOCS2 導入 T24 細胞を用いて STAT3 の活性を調べたが、クローン間での差が大きく、SOCS2 が STAT3 の活性を阻害するとは結論できなかった。そこで、遺伝子導入効率の高い 293 細胞を用いて SOCS2 遺伝子を一過性に発現させたところ、STAT3 の活性が阻害された。また SOCS2 遺伝子の導入により 293 細胞の運動能が阻害された。

本研究において、T24 細胞では、I 型コラーゲンが細胞増殖には影響を与えず、運動能を特異的に抑制することが明らかになった。細胞運動の抑制には、STAT3 の活性阻害が関わっている可能性が示された。また、SOCS2 遺伝子の発現が I 型コラーゲン添加により増加することを見出した。SOCS2 を過剰発現すると、細胞運動能および増殖が阻害されることから、SOCS2 はがんの悪性度を負に制御する可能性が示された。さらに、遺伝子導入効率の高い 293 細胞では、SOCS2 遺伝子の導入により STAT3 の活性および細胞の運動能が阻害された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。主な質問事項は、1) I 型コラーゲンが STAT3 の活性を阻害する経路、2) インテグリン以外のコラーゲン受容体、3) MAP kinase のインヒビター、4) 可溶化 I 型コラーゲンについて、等であった。これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、可溶化 I 型コラーゲンが SOCS2 発現を増加させ、がん細胞の運動能を抑制することを示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに遺伝子導入効率の高い 293 細胞についての研究も進めており、将来性についても評価された。本研究業績は口腔がん治療のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。