

学位論文題名

Enhancement of malignant properties of human malignant pleural mesothelioma cells under hypoxia

(低酸素環境下におけるヒト悪性胸膜中皮腫細胞の悪性化に関する研究)

学位論文内容の要旨

**【Background and Objectives】**

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an intractable tumor of mesothelial cells lining the visceral and parietal pleura. Often MPM progresses to advanced stages without clinical signs or symptoms, and has involved other organs by the time of diagnosis; its prognosis is very poor even after multi-modality treatments. Unfortunately MPM incidence is increasing and the peak of MPM mortality is apprehended to be in the near future. To date, there are only few pieces of information of molecular mechanisms for development and malignant progression of MPM. In solid tumors, the microenvironment often becomes hypoxic, a condition that the oxygen supply to tissues decreases, during the expansion of a tumor mass. It is known that intratumoral hypoxia acts as both tumor-suppressive and -progressive factors. In this study, I aimed to determine (a) whether hypoxia enhances malignant behaviors such as cell growth, motility and invasiveness of MPM cells, and if it does, (b) by which mechanism(s) hypoxia involves the malignancy.

**【Materials and Methods】**

Six MPM cell lines including the 2 newly established cell lines (established in this study) were used. These cell lines were cultured under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or normoxia (21% O<sub>2</sub>) for 24-48 h. Cell growth was analyzed by assays for doubling time, colony and spheroid formation. Cell motility and invasiveness were analyzed by

phagokinetic track assay and by an assay using type I collagen gel, respectively.

#### **【Results】**

Firstly, I examined whether the MPM cells showed adaptive cellular responses to hypoxia. All the cell lines showed promoter activity through hypoxia-responsive elements under hypoxia. Hypoxia upregulated the expressions of GLUT-1, VEGFA and HK2, which are downstream genes of hypoxia-inducible factor (HIF). Hypoxia reduced saturation density and sizes of spheroids whereas it enhanced colony-forming ability. And hypoxia enhanced their cell motility and invasiveness. Knockdown analyses by using siRNA targeting HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ , which are main transcription factors responding to hypoxic stress, revealed that hypoxia-enhanced motility and invasiveness were mediated through activation of HIF-1 $\alpha$  but not HIF-2 $\alpha$ . RT-PCR analysis suggested that MUC1 gene which encoded a highly glycosylated membrane protein could be a candidate of downstream genes of HIF-1 $\alpha$ . To determine whether HIF-1 $\alpha$  activated MUC1 transcription, I performed promoter analysis by using reporters with serial deletions of MUC1 promoter. As a result, it was found that a part (-1,473/-763 which contains two putative hypoxia-responsive elements (HRE) sites) of the promoter region was necessary for MUC1 transactivation under hypoxia. Flow cytometric and immunoblot analyses revealed that hypoxia increased the expression of sialylated MUC1 on the cell surface of MPM cells. To analyze the roles of MUC1 in hypoxia-enhanced motility and invasiveness, I performed knockdown experiments of the gene by using siRNAs, which reduced motility and invasiveness of the MPM cells under hypoxia.

#### **【Discussion】**

These findings on cell growth suggest the complexity of tumor microenvironment where additive factors such as changes of cell density alter the responses of MPM cells to hypoxia. The results from the experiments of motility and invasion indicated that the increased expression of MUC1 through activation of HIF-1 $\alpha$  pathway likely played an important role in the enhancement of cell motility and invasiveness of MPM cells under hypoxia.

#### **【Conclusion】**

From these results, I conclude that hypoxia promoted *in vitro* malignant behaviors of MPM cells, especially motility and invasiveness, through HIF-1 $\alpha$  -MUC1 pathways.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	西村孝司
副査	准教授	濱田淳一
副査	教授	上出利光
副査	教授	西村正治

## 学位論文題名

### Enhancement of malignant properties of human malignant pleural mesothelioma cells under hypoxia (低酸素環境下におけるヒト悪性胸膜中皮腫細胞の悪性化に関する研究)

本学位論文は、低酸素微小環境がヒト悪性胸膜中皮腫 (MPM) 細胞の悪性形質にどのような影響を及ぼすのかを検討したものである。申請者は自らが樹立した2株のMPM細胞を含む6株の細胞株を用いて、低酸素環境がMPM細胞の増殖・運動・浸潤性に及ぼす影響を *in vitro* で解析し、以下の結果を発表した。まず、低酸素環境は、MPM細胞に対して相反するふたつの増殖応答性を惹起することを示した。単個の細胞から増殖し形成されるコロニー形成能は、足場依存・非依存性にかかわらず、低酸素環境下で増強した。反対に、1ウェルに多数の細胞を播種して評価した増殖能やスフェロイド形成能は、低酸素環境下で低下した。すなわち、増殖アッセイ開始時の細胞密度が低い時には、低酸素環境は細胞増殖性を刺激し、アッセイ開始時の細胞密度が高い時には、増殖性を抑制することがわかった。一方、ファゴカイネティック・トラック・アッセイで測定される細胞運動能およびI型コラーゲンゲルに対する細胞浸潤能は、低酸素環境下で増強した。一連の siRNA を用いた遺伝子発現阻害実験から、この低酸素環境下で増強される細胞運動・浸潤能は、転写因子 HIF1 $\alpha$  に依存しているが上皮間葉移行によるものではないことが示された。HIF1 $\alpha$  の標的遺伝子で細胞運動・浸潤に関与するものを探索したところ、ムチン型のI型膜蛋白であるMUC1分子が見出された。つぎに、MUC1分子の発現を siRNA で阻害したところ、低酸素環境下におけるMPM細胞の細胞運動・浸潤能の増強は、認められなくなった。以上のように、本研

究によって、低酸素環境は HIF1 $\alpha$ -MUC1 経路を刺激して MPM 細胞の運動・浸潤能を増強することが明らかとなった。

審査にあたり、まず西村正治教授から、低酸素下において発現の亢進した MUC1 が MPM 細胞の運動・浸潤性を増強させる機序についての質問があった。申請者は、現在のところその機序を説明する具体的な実験データを持ち合わせてはいないと前置きをした上で、これまでに発表された他家の報告を引用しながら考えられる機序をいくつか列挙した。また、西村（正）教授は本実験で行われた低酸素の期間、ならびに低酸素下におかれた MPM 細胞の抗がん剤抵抗性についても尋ねた。これに対して申請者は、本実験の多くは、24 時間から 48 時間の比較的短時間の低酸素条件下で実施したが、6 日以上 of 長期間低酸素環境下に置いた実験も行っており、それらにおいてもほぼ同様の結果が得られたとの回答をした。低酸素下に置かれた MPM 細胞の抗がん剤抵抗性については調べていないが、重要な課題であるので今後検討を加えていく旨の回答を行った。上出利光教授から、使用した MPM 細胞株の免疫不全マウス等に移植した際の造腫瘍性・転移性についての質問を受けた。申請者は、新たに樹立した 2 株の MPM 細胞をヌードマウスあるいは SCID マウスの胸腔内に移植した際の造腫瘍性ならびに転移性について回答した。また、MUC1 はムチン型膜蛋白であるので、細胞外領域に多くの糖鎖修飾を受けているが、この糖鎖は MPM 細胞の運動・浸潤性に関与しているのかとの質問も受けた。申請者は、糖鎖修飾を受けている MUC1 は悪性形質の発現に関与していることを示した過去の報告を引用し、本研究においてもその重要性が示唆されると回答した。さらに、西村（正）・上出両教授から、いくつかの癌種では低酸素によって上皮間葉移行 (EMT) が引き起こされるが、MPM 細胞では起こらない。これは、MPM 細胞のひとつの特徴と言えるのではないかと指摘があった。西村孝司教授から、スフェロイド形成試験の結果をもとに MPM 細胞株中に存在するがん幹細胞についての質問があった。申請者は、これまでに行ってきたコロニー形成試験やフローサイトメトリ-解析などの結果を紹介しながら、スフェロイド中にがん幹細胞が存在している可能性を述べた。また、MPM の分子マーカーのひとつである WT1 は、ワクチン療法の有効な標的となりうるのではないかと指摘を受け、申請者は今後治療という面からも MPM 細胞の動態を解析してみたいとの回答をした。最後に濱田淳一准教授から、本論文で発表した内容はすべて *in vitro* の解析であるが、同様の現象が臨床の MPM 組織においても生じていることを早急に確認すべきとの指摘があった。

本論文は、MPM 細胞の悪性化における低酸素微小環境の腫瘍生物学的な意義を明らかにしたものであり、難治がんのひとつである MPM の診断・治療に新たな展開を導くものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が医学博士の学位を受ける資格を有すると判定した。