

授与番号 甲第 343 号

論文内容の要旨

PLAG1 enhances the stemness profiles of acinar cells in normal human salivary glands in a cell type-specific manner

—PLAG1 は正常ヒト唾液腺腺房細胞の幹細胞的性格を細胞種特異的に増強する—
(後藤弓里子、衣斐美歩、佐藤泰生、田中準一、安原理佳、青田恵子、東雅之、
深田俊幸、美島健二、入江太朗)

(Journal of Oral Biosciences 第 62 巻、第 1 号、令和 2 年 3 月 掲載予定)

後藤 弓里子

I. 研究目的

Pleomorphic adenoma gene 1 (PLAG1) は、多形腺腫を引き起こすがん遺伝子であり、実験的にも *in vivo* における腫瘍原性が証明されている。PLAG1 は IGF2 プロモーターに結合し細胞分裂を亢進させるとともに IGF1 受容体と Ras/Raf/MAPK シグナル伝達経路の活性化により腫瘍原性に関わることが明らかにされている。

唾液腺腫瘍組織発生の詳細は今日まで明らかにはなっていない。これは唾液腺腫瘍切除時には腫瘍が既に完成してしまっているためである。唾液腺腫瘍組織発生の仮説で最も知られたものは **multicellular theory** であるが、これは唾液腺の全ての構成細胞が腫瘍化し得るという概念である。これはオートラジオグラフィにより唾液腺のすべての構成細胞が細胞分裂可能であることに基づいている。近年、介在部導管からの幹細胞/前駆細胞の供給なしに腺房細胞が自己複製できることや、唾液腺には少なくとも 1 種類以上の前駆細胞があることが明らかにされてはいるものの、幹細胞/前駆細胞が直接癌幹細胞に変化し得るのか、また、癌幹細胞が唾液腺組織のどこに由来するのかについては未だ明らかにはなっていない。本研究では、唾液腺腫瘍組織発生の初期イベントを明らかにすることを目的として正常ヒト唾液腺の腺房細胞と導管細胞における PLAG1 の役割について解析を行った。

II. 研究方法

本研究ではヒト正常唾液腺組織から不死化された唾液腺腺房細胞株(NS-SV-AC)および導管上皮細胞株(NS-SV-DC)を用いた。2 種類のヒト正常唾液腺細胞株の各々について PLAG1 過剰発現 **vector** と **empty vector** を遺伝子導入した。遺伝子導入した腺房細胞株と導管細胞株について、①細胞増殖能および浸潤能への影響、②salisphere culture により形成された salisphere の形質を qRT-PCR および蛍光免疫染色により検討した。さらに PLAG1 遺伝子が影響を及ぼす遺伝子を明らかにするために、③Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法による遺伝子発現解析と遺伝子オントロジー解析を行った。

III. 研究成績

PLAG1 は腺房細胞・導管上皮細胞ともに細胞増殖能と遊走能を亢進させた。PLAG1 は腺房細胞の salisphere において管腔側細胞マーカーである Aquaporin5、Cytokeratin18 の発現を亢進したが、非管腔側

細胞マーカーである Cytokeratin14 (CK14)、alpha-smooth muscle actin の発現には影響を与えなかった。一方、導管細胞の salisphere においては、PLAG1 は管腔側細胞マーカーの発現に有意な差はみられず、CK14 の発現の減少をみるのみであった。さらに PLAG1 は腺房細胞の salisphere における多能性幹細胞マーカー (NANOG) と唾液腺組織幹細胞マーカー (LGR5, THY1) の発現を亢進させたが、導管細胞の salisphere においては、THY1 の発現を亢進させたのみであった。CAGE 法による遺伝子発現解析と遺伝子オントロジー解析により、PLAG1 は腺房細胞においては、癌関連あるいは幹細胞関連のパスウェイに影響を及ぼす一方、導管細胞においては主に癌関連のパスウェイに影響を及ぼすことが示唆された。

IV. 考察及び結論

PLAG1 が幹細胞性に関わることについてはほとんど明らかとはなっておらず、唾液腺組織における幹細胞性への関わりについては全く知られてはいない。今回の遺伝子オントロジー解析の結果からは、PLAG1 は腺房細胞において Wnt や Rap1 等のシグナル伝達経路を介して幹細胞性を高めることが示唆された。また、PLAG1 は腺房細胞の salisphere における管腔側細胞への分化を亢進するとともに幹細胞的性格も増強するという一見矛盾した結果がみられた。これについては着床前の初期胚における母性因子による発生制御から胚性遺伝子への制御に切り替わる現象である zygotic genome activation (ZGA) に PLAG1 は必須であるとされている。この ZGA の制御は幹細胞性の制御と前駆細胞の系統分化の両者に密接に関わることが示されていることから、もしかすると PLAG1 は幹細胞の非対称性分裂と前駆細胞の系統分化の両者を制御しているのかもしれない。癌組織の初期発生においては非制御状態下の Wnt シグナルによって前駆細胞のプールにおける幹細胞/前駆細胞の構成比の変化やそれらの拡大が生じることが示唆されていることから、唾液腺腫瘍組織発生の初期イベントは、正常唾液腺組織において PLAG1 によって前駆細胞のプールにおける幹細胞的性格の細胞の増加が生じることであることが示唆される。

PLAG1 の細胞種特異的な働きについては、PLAG1 が刷り込み遺伝子座の 1 つである Igf2/H19 遺伝子座の刷り込み制御配列に結合することが明らかとなっている。この Igf2/H19 遺伝子座のエピジェネティックな制御が造血幹細胞の維持に重要であることが示されていること、DNA のメチル化修飾が消化器系の幹細胞の分化制御に必須であることから、PLAG1 の細胞種特異的な働きについては、腺房細胞と導管細胞の幹細胞/前駆細胞のエピジェネティックな状態の違いによるものであることが示唆される。この PLAG1 が細胞種特異的に働くという事実は、唾液腺腫瘍の組織多様性が腫瘍細胞の由来の違いに基づくものであることを反映した結果であるのかもしれない。

以上、本研究では PLAG1 が正常唾液腺腺房細胞において幹細胞的性格を細胞種特異的に増強することを明らかにした。PLAG1 が正常唾液腺細胞の幹細胞的性格を高めることにより唾液腺腫瘍の組織発生に関わることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査	石崎 明	教授	(生化学講座 細胞情報科学分野)
副査	入江 太郎	教授	(病理学講座 病態解析学分野)
副査	原田 英光	教授	(解剖学講座 発生生物・再生医学分野)

近年、唾液腺の介在部導管からの幹細胞/前駆細胞の供給なしに腺房細胞が自己複製できることや、唾液腺には少なくとも1種類以上の前駆細胞があることが明らかにされてはいるものの、唾液腺腫瘍の発生において、幹細胞/前駆細胞が直接癌幹細胞に変化し得るのか、また、癌幹細胞が唾液腺組織のどこに由来するのかについては未だ明らかにはなっていない。

一方、*pleomorphic adenoma gene 1 (PLAG1)*は、多形腺腫を引き起こすがん遺伝子であり、実験的にも *in vivo* における腫瘍原性が証明されている。しかし、PLAG1 が、唾液腺腫瘍を引き起こす分子メカニズムの詳細については明らかとされていない。本研究では、唾液腺腫瘍組織発生の初期イベントを明らかにすることを目的として正常ヒト唾液腺の腺房細胞と導管細胞における PLAG1 の役割について解析を行った。具体的には、ヒト正常唾液腺組織から不死化された唾液腺腺房細胞株 (NS-SV-AC) および導管上皮細胞株 (NS-SV-DC) の各々に対して PLAG1 過剰発現 vector と empty vector を遺伝子導入した。その後、遺伝子導入した腺房細胞株と導管細胞株について、① 細胞増殖能および浸潤能への影響、② salisphere culture により形成された salisphere の形質を qRT-PCR および蛍光免疫染色により検討した。さらに PLAG1 遺伝子が影響を及ぼす遺伝子を明らかにするために、③ cap analysis of gene expression (CAGE) 法による遺伝子発現解析と遺伝子オントロジー解析を行った。

PLAG1 は腺房細胞・導管上皮細胞ともに細胞増殖能と遊走能を亢進させた。また、PLAG1 は腺房細胞の salisphere において管腔側細胞マーカーである Aquaporin5、Cytokeratin18 の発現を亢進したが、非管腔側細胞マーカーである Cytokeratin14 (CK14)、alpha-smooth muscle actin の発現には影響を与えなかった。一方、導管細胞の salisphere においては、PLAG1 は管腔側細胞マーカーの発現に有意な差はみられず、CK14 の発現の減少をみるのみであった。興味深いことに、PLAG1 は腺房細胞の salisphere における多能性幹細胞マーカー (NANOG) と唾液腺組織幹細胞マーカー (LGR5, THY1) の発現を亢進させたが、導管細胞の salisphere においては、THY1 の発現を亢進させたのみであった。さらに、CAGE 法による遺伝子発現解析と遺伝子オントロジー解析により、PLAG1 は腺房細胞においては、癌関連あるいは幹細胞関連のパスウェイに影響を及ぼす一方、導管細胞においては主に癌関連のパスウェイに影響を及ぼすことが示唆された。

本研究成果は、PLAG1 が正常唾液腺細胞の幹細胞的性格を高めることにより唾液腺腫瘍の組織発生に関わることを示唆するものであり、新たな唾液腺腫瘍の診断や治療法の開発に繋がると期待される。

試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から複数の質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：本研究の背景として、*PLAG1* 遺伝子とはどのような働きを持つ遺伝子であるのか？これまでに報告されている知見を述べよ。

答：PLAG1 は分子レベルでは転写因子として働くことが知られているが、多形腺腫を引き起こすがん遺伝子であり、実験的にも *in vivo* における腫瘍原性について証明されている。一方、PLAG1 は、とくに胎生期に体内各所でその発現が強く認められるが、*PLAG1* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは胎生期における劣成長などの異常が認められることから、発生過程の細胞増殖や細胞分化で重要な役割を果たしているものと考えられている。

問：*PLAG1* ががん遺伝子として働くメカニズムについては、どのように報告されているのか？

答：唾液腺で発生する多形腺腫では、染色体相互転座が高率に起こることが知られているが、それが原因となり *PLAG1* 遺伝子の発現が増強されると報告されている。このように、唾液腺細胞の染色体異常による *PLAG1* 遺伝子の強発現により、この遺伝子のがん遺伝子化することが、明らかとされている。

問：*PLAG1* と唾液腺腫瘍の発生との関連について、本研究開始時に既に明らかとされていた知見を本研究の背景としてあげ、それら過去の報告を基にどのように考えて本研究の方向性を見出したのかについて述べよ。

答：近年、唾液腺の導管部あるいは腺房部の組織では、多形腺腫の発生に伴い、分化したはずの唾液腺細胞が脱分化して未分化な細胞に変化することを示唆する所見が報告されている。しかし、多形腺腫で発現が強く認められる *PLAG1* が、どの種の唾液腺細胞で唾液腺細胞の未分化性の獲得に働くのかについては明らかとされていなかった。そこで、唾液腺細胞の未分化性あるいは幹細胞性の獲得はこの細胞の腫瘍幹細胞への変化に関与する可能性があると考え、とくに多形腺腫で発現の認められる *PLAG1* の唾液腺細胞の未分化性あるいは幹細胞性の獲得における役割を明らかとすべく本研究を開始した。

問：*PLAG1* の発現が唾液腺腫瘍の発生にどのように関わるのかについて検証するための実験方法として細胞遊走性の評価をしているが、この実験系を選択した理由について述べよ。

答：近年、腫瘍細胞の悪性度の指標として上皮-間葉転換 (EMT) が注目されている。この EMT が進行すると、腫瘍細胞同士の接着性が脆弱化され、腫瘍細胞の遊走性は亢進することが報告されている。今回、唾液腺細胞の悪性化に *PLAG1* がどのように関わるのかについて明らかとすべく、*PLAG1* 強発現後の唾液腺細胞の遊走性が亢進されるかどうかについて調査した。

問：スフィア形成培養法を本研究に取り入れた理由は何か？

答：これまでに、スフィア形成培養法は未分化な細胞の幹細胞性をいっそう高めることが一般的に知られている。唾液腺細胞に *PLAG1* を強発現させた後に通常実施される平面培養と比較して、スフ

ィア形成培養法を利用した方が PLAG1 の働きによる幹細胞性の獲得についてより顕著に観察できる可能性があると考え、この培養法を選択した。

問：唾腺細胞における PLAG1 の強発現がこの細胞の遺伝子発現にどのように影響するのかについて網羅的に解析する方法として cap analysis of gene expression (CAGE) 解析を利用しているが、一般的に用いられる DNA アレイ法やプライマーアレイ法と比較して本法の利点は何か？

答：CAGE 法は mRNA の 5' 末端から約 20 塩基の配列を切り出し、それを増幅後に当該 mRNA の発現量に加えて塩基配列を決定できる解析技術である。このため、唾腺細胞における PLAG1 の強発現による遺伝子発現変化について網羅的に解析できるだけでなく、がん遺伝子化に伴う転写開始点の変化についても解析が可能である。加えて、CAGE 法は、本研究で用いた遺伝子オントロジー解析にも応用可能な方法であることから、本研究の遂行に有効な実験方法として利用した。

問：本研究の今後の展開をどのように考えているのか？

答：今回、唾腺細胞における PLAG1 の強発現で誘導された幹細胞マーカーの発現については、qRT-PCR 法により、mRNA レベルで確認したのみであるが、今後はフローサイトメトリーを実験法に取り入れて、唾腺細胞の細胞膜上での各幹細胞マーカーの発現をタンパク質レベルで確認したい。また、唾腺細胞での PLAG1 の強発現で誘導される幹細胞マーカーを正常唾腺細胞に遺伝子導入した場合にこの細胞の幹細胞性や腫瘍細胞性が上昇するかについても検証していきたい。