

論文内容の要旨

「ヒト肺がん細胞における Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能と AhR リガンドである Benzo [a] pyrene (B [a] P) と β - naphthoflavone (β NF) が細胞増殖に与える影響の解析」

神馬 瑶子

I. 研究目的

核内受容体である Aryl hydrocarbon receptor (AhR) はリガンドと結合後、薬物代謝酵素の発現調節を行っている転写調節因子である。AhR のリガンドでありタバコに含まれている Benzo [a] pyrene (B [a] P) は肺における発がん誘導に重要な役割を果たす。一方で、B [a] P と同様に AhR のリガンドである β - naphthoflavone (β NF) はマウス肺において肺腫瘍発生率を軽減するという報告がある。AhR/リガンド複合体は、肺における発がん誘導または抑制効果があることが明らかとなっているが、がん化後のがん細胞における作用は不明な部分が多い。また、肺にがんが発見された患者が喫煙を継続すると、予後不良であることが報告されており、喫煙はがん細胞にも何らかの影響を与えていることが推測される。我々は、AhR/リガンド複合体の肺がん細胞における機能解明を目的とし、B [a] P と β NF を用いて遺伝子変動と細胞増殖への影響を解析した。

近年、3次元培養 (3D 培養) によって構築された3次元細胞塊 (3D 細胞塊) を用いた研究が盛んであり、3D 細胞塊は生体内のがん細胞塊の微小環境に近いとされている。そのため、我々の研究でもヒト肺がん培養細胞で3D 細胞塊を構築し解析を行った。

II. 研究対象ならびに方法

肺腺がん由来細胞 A549, 肺扁平上皮がん細胞由来 H530, H1703 による3D 細胞塊を用いて研究を行った。AhR リガンド (B [a] P, β NF) 処理、RNA 干渉により AhR をノックダウンして遺伝子変動の解析、細胞数測定を行った。

III. 研究結果

2D 細胞と3D 細胞塊に B [a] P を添加すると、2D 細胞では細胞数に影響は出なかった

が、3D細胞塊の細胞数はコントロールと比較すると使用した全細胞株で有意に増加した。この細胞増殖を増強するB[a]Pの影響はAhRをノックダウンすることで観察されなくなり、B[a]P添加による細胞数増加はAhRを介していることが明らかとなった。

一方で、B[a]Pと同じAhRリガンドであるβNF添加ではB[a]Pとは逆に細胞数が減少することが明らかとなった。この細胞数の減少は、細胞周期の停止、遅延によるものではないかと予測している。

AhRはリガンドと結合し遺伝子転写調節因子として作用することから、細胞増殖においてもAhRによって転写調節される遺伝子が関与していると考え、AhRの機能を、転写調節因子の作用に着目して解析した。その結果、2D細胞と3D細胞塊ではAhRが転写調節する遺伝子が異なることが明らかとなった。

IV. 結 語

B[a]PはAhRを介して3D細胞塊の細胞数を増加させたが、2D細胞では細胞数には影響を与えなかった。2D細胞と3D細胞塊における細胞増殖への影響の違いは、本研究で2D細胞と3D細胞塊でAhRが発現調節する遺伝子が異なることが明らかになったことから、細胞増殖に影響する遺伝子群の発現調節が2D細胞と3D細胞塊で異なることが原因ではないかと我々は推測している。3D細胞塊はより生体内に近い環境と考えられており、臨床において肺がんが発見された後の喫煙の継続が予後不良という結果を引き起こす原因として、喫煙により肺がん細胞の増殖が増強されるからではないかと我々は考えている。

また、βNFはB[a]Pとは逆にヒト肺がん細胞の3D細胞塊において、細胞数を減少させる作用があることを明らかにした。この結果は、同じAhRリガンドでも化合物の違いによって細胞に対する影響が異なることを示している。さらに、AhRをノックダウンした2D細胞と3D細胞塊では、共に細胞数が減少することが明らかとなり外来リガンドによる細胞増殖と定常状態における細胞増殖のメカニズムは異なることが示唆される結果となった。

今後は2D細胞と3D細胞塊へのB[a]P添加と、3D細胞塊へのβNF添加による遺伝子発現パターンの違いを網羅的解析によって明らかにし、細胞増殖へ関与する遺伝子群を特定することが課題である。また、定常状態における細胞増殖は内因性のAhRリガンドが関与していることが示唆されたため、内因性のAhRリガンドを特定することも今後の課題である。AhRとAhRリガンドが細胞増殖へ及ぼす影響を明らかにすることは、肺がん細胞の増殖・進展メカニズムの解明に有用な知見を与えるものとする。

論文審査担当者

主査 教授 那谷耕司 (臨床医化学分野)
副査 教授 西谷直之 (情報薬科学分野)
副査 教授 奈良場博昭 (薬学教育学分野)

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト肺がん細胞における Ary hydrocarbon receptor (AhR) の機能と AhR リガンドである Benzo[α]pyrene (B[α]P) の細胞増殖に与える影響および、その 2D 細胞と 3D 細胞塊における差異の解明を目的としている。本研究の結果から、AhR は肺がん細胞の細胞増殖に重要な分子であること、B[α]P は AhR を介して肺がん 3D 細胞塊の増殖を増強することが明らかとなった。また、2D 細胞と 3D 細胞塊の B[α]P に対する細胞応答の差異には、AhR が転写調節因子として作用する薬物代謝酵素遺伝子の発現の違いが関与していることが示唆された。

本学位論文の研究内容は、審査担当者による協議の結果、大学院博士課程教育として望まれるテーマ設定と研究成果であることが評価できるとの結論になった。

審査担当者からは下記のコメントが寄せられているので、これらの指摘に従い学位論文を修正することが望まれる。

- ・ヒト肺がん細胞株を用いた浮遊培養 (3D 培養) と付着培養 (2D 培養) とで、AhR 依存性の細胞増殖に差異が見られたことは、新規の発見と考えられる。
- ・タバコに含まれる発がん物質 B[a]P は DNA 損傷による発がん作用とは別に、新たに細胞増殖促進作用を有することを示した点も新規性がある。
- ・B[a]P とは逆に、 β naphthoflavone が 3D 培養肺がん細胞の増殖を抑制する現象も興味深い発見である。
- ・解析手法が 1 種類の siRNA による遺伝子ノックダウンに依存しており、細胞増殖の測定法も血球計数板による細胞計測のみである。多分にアーティファクトが入り込む余地があるが、それを排除するだけの実験的検証はなされていない。
- ・考察の論理展開が不十分であり再考を要する。
- ・学位論文において、研究の目的と結果の関連が理解しづらいので、その点が明確になるよう、学位論文を修正していただきたい。
- ・図表の説明文の解像度が低い。

試験・試問の結果の要旨

最終試験におけるプレゼンテーションでは、研究内容の要点を簡略にまとめて発表していた。また、発表後の質疑応答では、質問に対して誠実かつ的確に回答できており、試験・試問の結果としては合格と認められる。

審査担当者からは下記のコメントが寄せられているので、これらの指摘を今後の参考にすることが望まれる。

- ・ 周辺情報の収集と整理が足りない。自身の研究の立ち位置が十分に理解できていない可能性がある。(正常細胞のオルガノイドカルチャーも含め、3D 培養の世界的動向を理解した上で自身の研究の独自性を語るべきだったと思う。)
- ・ 類似したグラフが多かったので、発表に工夫を凝らさないと聴衆に研究内容を十分に理解させることは難しい。
- ・ 発表後の質疑応答の態度は誠実であった。