

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

梶 友紘

専攻分野：脳神経外科学

指導教授：田中 雄一郎

主論文の題目：

Layilin Enhances the Invasive Ability of Malignant Glioma Cells via SNAI1 Signaling (ライリンは SNAI1 シグナルを介して悪性神経膠腫細胞の浸潤能を高める。)

共著者：Mitsumi Arito, Atsuhiko Tsutiya, Taigen Sase, Hidetaka Onodera, Toshiyuki Sato, Kazuki Omoteyama, Masaaki Sato, Naoya Suematsu, Manae S. Kurokawa, Yuichiro Tanaka, Tomohiro Kato

緒言

悪性神経膠腫 (malignant glioma, MG) は、高い浸潤性を有する予後不良の悪性腫瘍である。近年、転写因子である snail family transcriptional repressor 1 (SNAI1)が MG の浸潤性の獲得および増強に寄与することが、報告されている。SNAI1 は matrix metalloproteinase (MMP)-2 や MMP-9 の発現を増強し、基底膜周辺のタイプ IV コラーゲンの分解を促進することで細胞の浸潤性を高める。こうした MG の浸潤性獲得または増強の過程は、遺伝子の発現パターンの観点から、上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) と非常に類似している。そのため、最近では神経膠細胞あるいは神経膠腫細胞が間葉系細胞の性質を強める変化を「glial-mesenchymal transition (GMT)」と呼ぶようになった。

ライリンは、C型レクチン様のI型膜蛋白質である。ヒアルロン酸受容体である一方、タリンやメルリンのような細胞骨格蛋白質と相互作用し、細胞間接着に寄与していることが報告されている。以前に当グループは、尿細管上皮細胞でライリンがTNF- α 誘導性のEMTに必須の分子であることを報告した。

これらの事象から、我々はライリンがMGのGMTを誘導し、浸潤能の獲得もしくは増強に寄与するという仮説を立てた。そして、この仮説を検証するためにヒトMG細胞株におけるライリンの発現及び局在を調べ、さらに、ライリンがGMTに関与するか否かについて調べた。

方法・対象

ヒトMG細胞株(U251-MG、A172およびT98G)及びアストロサイトを、10%ウシ胎児血清、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂環境下で培養した。各細胞より蛋白質を抽出し、ウエスタンブロットにてライリンを検出した。また、蛍光免疫細胞染色によりライリンの局在を観察した。

次に、A172細胞で、2種類のライリン siRNA (siL-1 および siL-2)の導入によりライリンの発現を抑制し、RNA および蛋白質を抽出した。対照としてコントロール siRNA (siC)を導入した細胞を準備した。抽出RNA を逆転写後、定量PCRにより SNAI1、その制御を受ける3分子下流 (MMP-2、MMP-9 および COL1A1) および SNAI1 の転写抑制因子 metastasis associated 1 family member 3 (MTA3)の mRNA 量を測定した。抽出蛋白質は、ウエスタンブロットに供し、SNAI1 及び SNAI1 のリン酸化に関与するシグナル分子 (GSK-3 β 、Akt および ERK) の蛋白質量およびそのリン酸化量、さらに MTA3 量を調べた。また、SNAI1 及び MTA3 に関しては、核内タンパク量を調べるために核画分から蛋白質を抽出し、ウエスタンブロットに供した。さらに、siL-1 によりライリン発現を抑制した A172 細胞を wound healing assay (WHA)に供

し、細胞の浸潤能を評価した。統計処理は Student' s t-test を用いて $p < 0.05$ を有意とした。

結果

MG 細胞株では、アストロサイトと比較してライリンの発現が増強していた。また、A172 及び T98G の両細胞株で、ライリンは細胞膜での局在は認められず細胞質に局在していた。また主としてゴルジ体、一部は小胞体に局在しているような観察像であった。

siL-1 及び siL-2 を用いたライリン発現抑制により SNAI1 の mRNA は抑制され、さらに SNAI1 蛋白質量は総量・核内量共に減少した。それに伴い、SNAI1 の標的遺伝子 MMP-2, MMP-9, COL1A1 の発現も減少した。また、ライリン発現抑制により SNAI1 の転写抑制因子 MTA3 の mRNA 量は変化しなかったが、その蛋白質量は総量・核内量共に増加した。さらに、WHA の結果、ライリン発現抑制により A172 細胞の浸潤能が低下した。

考察

MG 細胞株においてライリンは細胞膜ではなく、主として細胞質に局在していた。このことから、ライリンはヒアルロン酸受容体としての機能とは独立して MG 細胞の浸潤性に寄与している可能性が推測される。

本研究によりライリンが SNAI1 を増強することが明らかとなった。本研究では SNAI1 の標的遺伝子の中で浸潤性に関与する分子に絞って解析を進めたが、SNAI1 の標的遺伝子には細胞増殖や細胞死に関連する遺伝子も含まれる。そのため、ライリンが SNAI1 を介して細胞増殖や細胞死を調節する可能性も考えられる。この点については現在検討している。

また、ライリンは MTA3 の mRNA 量には影響を与えないが、MTA3 蛋白質量を減少させることが明らかとなった。このことからライリンは

MTA3 の蛋白質量を、蛋白質の安定性の面から調節している可能性が考えられる。この点については今後検討していく必要がある。

結論

MG 細胞において、ライリンは MTA3 を抑制し SNAI1 を増加させることで細胞の浸潤性の獲得または増強に寄与する。