

論文内容要旨

論文題目

腎癌において *Ankrd1* は細胞遊走に関与する

責任講座： 腎泌尿器外科学講座

氏 名： 高井 優季

【内容要旨】(1,200 字以内)

【背景、目的】腎癌は低ステージの根治手術後であっても長期経過後に遠隔転移を来すことが稀でなく、腎癌における転移形成機序の解明は重要な課題である。近年、様々な癌腫で *Ankrd1* が腫瘍促進的に機能し、上皮間葉転換 (EMT) 促進に働くことが報告されている。本研究では腎癌における *Ankrd1* の機能を解析した。

【方法】山形大学医学部附属病院のコホートで腎癌切除標本の *Ankrd1* 発現と臨床的因子の検討を行った。ヒト腎癌細胞株で *Ankrd1* をノックダウンし細胞生存への関与を検討した。また、細胞遊走、浸潤試験により細胞の運動性への影響を検討した。免疫蛍光染色、免疫沈降法によりタンパク間相互作用や細胞骨格の変化を検討した。

【結果】ヒト腎癌細胞株において、*Ankrd1* は YAP による発現調節を受けており、細胞密度が低い状態でより高発現となることがわかった。そして *Ankrd1* が高発現となる細胞が低密度のときにのみ *Ankrd1* ノックダウンで細胞生存活性が低下した。また細胞株によっては ERK5 による発現制御を受けていた。*Ankrd1* のアポトーシス・細胞周期への明確な関与は確認されず、腎癌細胞の生存に対する *Ankrd1* の影響は大きくないものと推察された。

Ankrd1 ノックダウンにより腎癌細胞の遊走、浸潤能が低下し、逆に強制発現で遊走、浸潤能は上昇した。一方 *Ankrd1* の発現を変化させても EMT 関連分子の発現には影響を与えなかった。ヒト腎癌細胞株 786-O にホルボールエステルを添加し細胞遊走をトリガーすると、ストレスファイバーが消失し Lamellipodia が形成されるが、*Ankrd1* ノックダウンによりこれが阻害された。また Lamellipodia 上で F-アクチンと *Ankrd1* が共局在しており、免疫沈降法では *Ankrd1* とアクチンの結合が確認された。さらに接着斑の制御に関わる Talin-1 との結合も確認された。Talin-1 はインテグリンとアクチンを架橋し、インテグリンを活性化して細胞接着、遊走に関与することが知られている。*Ankrd1* のノックダウンでインテグリン経路の FAK、Src のリン酸化が阻害されることもわかった。

原発巣、転移巣ともに切除された 20 例の検体を用いた免疫組織化学染色では、転移巣で原発巣よりも有意に *Ankrd1* の発現が高かった。また *Ankrd1* の発現とグレードおよび T ステージとの間に関連性はなく、病理学的悪性度とは独立して転移形成に寄与している可能性が示唆された。

【結論】腎細胞癌において、*Ankrd1* は Talin-1 およびアクチンと相互作用し、アクチンリモデリングを介して腎癌細胞の遊走、浸潤および転移形成に関与している。

令和 4 年 12 月 26 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：  高井 優季

論文題目： 腎癌において Ankrd1 は細胞遊走に関与する

審査委員： 主審査委員

小 原 祐 太 郎

副審査委員

三 井 哲 夫

副審査委員

園 田 順 彦



審査終了日： 令和 4 年 12 月 22 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

淡明細胞型腎がん (Renal cell carcinoma, RCC) は、腎臓では最も頻度が高い悪性腫瘍である。その特徴として有転移症例が多く、低ステージの根治手術であっても遠隔転移する症例があり、その転移形成のメカニズムを明らかにすることは临床上重要である。アダプタータンパク質である Ankyrin repeat domain 1 (Ankrd1) は、肺がんや乳がんなどの腫瘍形成や抗がん剤への耐性獲得に関与することが近年報告されているが、未だに腎がん細胞における機能、役割の詳細がわかっていない。したがって、本研究では RCC における Ankrd1 の役割について、解明することを目的とした。

TCGA データベース上の RCC 510 例の解析から、Ankrd1 を高発現している群の生存確率が低いことが明らかになった。そこで、Ankrd1 の発現量が比較的高いヒト RCC 細胞株 (786-O, 786-P 細胞) において、Ankrd1 をノックダウンしたところ、低密度の培養条件下では細胞のバイアビリティが低下した。また、細胞密度が低いと YAP の活性が亢進して Ankrd1 の発現が促進すること、786-O 細胞では、MAPK ファミリーの ERK5 活性依存的に Ankrd1 の発現が亢進することが明らかになった。Ankrd1 の遊走、浸潤能に関しては、786-O および 786-P 細胞では Ankrd1 のノックダウンによりその機能が低下し、逆に Ankrd1 の発現量が低い A-498 細胞に Ankrd1 を過剰発現すると促進された。

786-O 細胞では Ankrd1 依存的に F-アクチンのストレスファバーが消失し、membrane ruffling が形成された。さらに Ankrd1 が F-アクチンおよび細胞接着に関与する Talin-1 と結合することが見出され、Ankrd1 が細胞接着や遊走シグナルの伝達に関与することが明らかになった。また、腎がん原発巣、転移巣ともに切除された 20 症例分のヒト臨床検体を用いて、Ankrd1 の発現量を免疫染色で調べたところ、転移巣で Ankrd1 の発現が有意に高いことが示された。一方で、Ankrd1 の発現量とグレードや T ステージとの関連性を検証した結果、Ankrd1 と病理学的な悪性度や転移形成能は関連性が低いことが示唆された。

本研究では、主に in vitro の実験結果から、腎がんにおいて Ankrd1 が細胞遊走に関与すること、またその分子メカニズムの一旦が明らかにされた。審査員からは根拠が乏しいにもかかわらず Ankrd1 による転移能の獲得が予後不良因子であるとの結論を出していること、観察期間が短い無転移症例と有転移症例との比較で Ankrd1 の発現量の差がないと結論付けていることなどに対する問題点が指摘された。しかし、本論文の一部を修正して改善が期待されることから、本研究が学位論文に値するとの結論を得た。