

審査の結果の要旨

氏名 正路 久美

本研究は生体内の多くの病態において重要な役割を果たしている低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor : HIF)の適応応答ネットワークを解明するため、網羅的解析により HIF-1 のターゲットを同定し、その新規ターゲットの一つである sperm associated antigen 4 (SPAG4)について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用い、HIF-1 α に対する siRNA を用いたマイクロアレイ解析と全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)を組み合わせ、HIF-1 の直接的なターゲットを 37 遺伝子同定した。20 遺伝子は既知であったが、17 遺伝子は新規ターゲットであり、そのうち精巣特異的蛋白として発見され、その発現や機能などほとんどが解明されていない SPAG4 に着目した。まずレポーターアッセイを行い、SPAG4 のエンハンサー領域に存在する低酸素応答配列が低酸素による SPAG4 発現誘導に関与していることを証明した。さらに HIF-1 α と HIF-2 α に対する siRNA を用いた実験で、SPAG4 は HIF-1 特異的なターゲットであり、その発現制御に HIF-2 が関与していないことを示した。
2. 次にマウスで低酸素腎臓モデルを作成し、低酸素下の腎臓でSPAG4が発現することを示した。さらにラットでも低酸素腎臓モデルである腎動脈狭窄モデルを作成し、免疫組織染色にて、SPAG4が腎動脈狭窄モデルの尿細管で発現していることを示した。ヒト近位尿細管の cell line でも、低酸素でSPAG4が発現亢進することをmRNAレベルでも蛋白レベルでも確認した。
3. 腎尿細管由来であり、発生機序に HIF の関与が報告されている腎細胞癌における SPAG4 の発現を、190 人の淡明細胞癌検体からなる組織アレイを用いて解析した。SPAG4 高発現は、診断時の静脈浸潤、高い再発率、核異型度と有意に相関し、また有意差はないものの癌関連死亡率が高い傾向があった。SPAG4 が臨床的な腫瘍マーカーとなりうる可能性と同時に、癌の病態生理への関与が示唆された。
4. 腫瘍での SPAG4 の働きを調べるために、上皮細胞癌の代表的な cell line である HeLa 細胞を用いて以下の実験を行った。SPAG4 の C 末端に EGFP を結合させた可視化 SPAG4 蛋白を発現するクローンを作成し、live cell imaging による細胞観察を行ったところ、SPAG4 が間期では核膜と小胞体に存在し、さらに分裂期の終期では intercellular bridge にも存在していることを証明した。Intercellular bridge での局在は SPAG4 の細胞質分裂への関与を示唆した。
5. フローサイトメトリーで細胞周期解析を行った。まずHeLa細胞を低酸素下で培養すると、正常酸素下と比較して4倍体細胞が有意に上昇した。SPAG4に対するsiRNAでSPAG4の発現を抑制すると、4倍体細胞が対照群と比較して有意に増加することが明らかとなり、これは4倍体細胞が増加する低酸素条件でも同様であった。また細胞周期解析で、SPAG4発現抑制に

よりG0/G1期の有意な減少、S期、G2/M期の有意な増加を認めた。細胞増殖への影響も検討したところ、BrdUアッセイおよびMTSアッセイにて、SPAG4を発現抑制すると細胞増殖が著明に抑制されることが分かった。

6. SPAG4 に対する siRNA を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ、SPAG4 発現抑制により発現が亢進する遺伝子群に、細胞質分裂、細胞周期調節に関する遺伝子が有意に集まっていることが分かった。実際に SPAG4 発現抑制により、Aurora A kinase、Aurora B kinase などの細胞質分裂に関連する遺伝子が蛋白レベルで変化していた。

以上、本論文は SPAG4 を新規 HIF-1 ターゲットとして同定し、腎細胞癌の再発・転移など悪性度と関係するマーカーになりうる可能性を示し、さらに SPAG4 が細胞質分裂で重要な役割を果たすことを示した。腫瘍内の低酸素環境は多倍体を増やし、多倍体はクロマチンの不安定化、悪性度の増悪につながることが知られているが、腫瘍において SPAG4 はこの多倍体に対して防御的に働いていることを示した。本研究は、これまでその機能がほとんど解明されていなかった SPAG4 の腫瘍における働きの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。