

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	小島 浩平
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 <i>Kdm6a</i> Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with <i>p53</i> Dysfunction (<i>Kdm6a</i> 欠失は炎症経路を活性化し、M2 マクロファージ極性変化を誘導し、 <i>p53</i> 機能不全と協調して膀胱癌を発症する。)			
論文審査担当者			
主査	教授	杉山 一彦	印
審査委員	教授	保田 朋波流	
審査委員	講師	仙谷 和弘	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>エピゲノムの脱制御は発癌に深く関与する。膀胱癌 (bladder cancer: BC) は、分子病理学的特徴が大きく異なる筋層非浸潤癌と筋層浸潤癌 (muscle-invasive BC: MIBC) に大別されるが、そのいずれにおいても、エピゲノム制御に関わるヒストン H3K27 脱メチル化酵素 Lysine (K)-specific demethylase (KDM) 6A の遺伝子 <i>Kdm6a</i> に、高頻度の機能欠失型変異が認められる。この変異頻度は、他癌腫に比べて突出して高く、KDM6A の機能欠失が BC の発症に関わる可能性が示唆される。しかし、BC 発症における役割を含め、KDM6A の機能的役割について、多くは解明されていない。本研究では、KDM6A の機能欠失マウスを作製して解析することにより、それが MIBC の発症および病態形成に果たす役割を明らかにすると共に、<i>Kdm6a</i> 変異に基づくシグナル経路を標的とした新規 BC 治療法の可能性を検討した。</p> <p>まず、尿路上皮特異的に <i>Kdm6a</i> の exon 11 および 12 を欠失する (<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ}) マウスを作製し、そのコントロール (<i>Ctrl</i>) マウスと共に、MIBC における主徴の一つとされる <i>p53</i> 変異を模したヘテロノックアウト (<i>p53</i>^{+/-}) マウスと交配したマウスを作出した (<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ} <i>p53</i>^{+/-} および <i>Ctrl p53</i>^{+/-} マウス)。これらのマウスを用いて、生後 1 年間の経過観察を行った後、各臓器を採材して病理組織学的検討を行った。<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ} <i>p53</i>^{+/-} マウスの 60% に、MIBC の前段階である尿路上皮の異形成から上皮内癌の自然発症におよぶ変化を認めた。これらの変化は、その他のマウス系統ではみられなかったことから、KDM6A の機能欠失だけでは MIBC の発症に至らないが、<i>p53</i> の機能低下と協調する事により、MIBC 発症が誘発される可能性が示された。それと並行して、<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ} <i>p53</i>^{+/-} マウスでは、<i>Ctrl p53</i>^{+/-} マウスに比べて膀胱粘膜下層の有意な肥厚がみられ、さらに免疫組織学的解析を行うことによって、当該部位へのマクロファージ集積が検出された。</p> <p>次に、上記マウスに膀胱特異的の化学発癌物質 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を投与し、MIBC の早期発症誘導を試みた。野生型マウスでは、BBN 投与開始から MIBC 発症に至るまで通常半年程度の期間を要するが、<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ} <i>p53</i>^{+/-} マウスの 30% は、わずか 10 週で MIBC を発症した。MIBC 発症前段階の尿路上皮を単離してフローサイトメトリー解析したところ、<i>p53</i>^{+/-} との交配の有無に関わらず、<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ} 尿路上皮では <i>Ctrl</i> と比較して癌幹細胞マーカーである CD44 を発現する細胞が増加していた。さらに、BrdU 取り込み試験を行って解析したところ、<i>Kdm6a</i>^{ΔΔ} <i>p53</i>^{+/-} マウスの尿路では、増殖反応を示す細胞の増加がみられた。これらのことから、KDM6A の機能欠失によって癌幹細胞が増加し、それに加えて</p>			

p53 の発現低下に基づく細胞周期の脱制御が生じることで、MIBC 発症に至ることが示唆された。

さらに、KDM6A の機能欠失から MIBC 発症に至る分子機構を解明するため、上記マウス系統間の尿路上皮における遺伝子発現パターンを、RNA シークエンス法で網羅的に比較解析した。その結果、*Kdm6a* 変異に伴い、自然発症群、化学発癌誘導群共に、Interleukin (IL) 6 および CC chemokine ligand (CCL) 2 をはじめとする、種々のサイトカインシグナル経路に関連した遺伝子の発現亢進がみられた。

KDM6A と MIBC の関連性をヒトでも検証するため、The Cancer Genome Atlas のヒト MIBC データベースを用いて *in silico* 解析を行った。その結果 *KDM6A* 低発現群では、高発現群と比較して、*IL6* および *CCL2* を含むサイトカインにおけるシグナル経路に関連した遺伝子発現が有意に亢進していた上、仮想的癌微小環境内におけるマクロファージ数も増加していた。さらに、*KDM6A* に変異がみられる患者群における MIBC の非再発生存率は、変異のない患者群に比べて有意に低かった。

これらの現象の因果関係を明らかにするため、マウス BC 細胞株 MBT2 を用い、*Kdm6a* ノックアウト (KO) 株と対照 (EV) 株を作製した。KO 株では EV 株と比較して、*IL6* および *CCL2* の有意な遺伝子発現亢進を認めた。さらに、野生型マウスから腹腔マクロファージを調整して解析したところ、KO 株との共培養により、遊走能および M2 極性化が有意に亢進した。リコンビナント *IL6* および *CCL2* も、濃度依存的にマクロファージの遊走能および M2 極性化を亢進させた。両細胞株を野生型マウスに同種移植して検討したところ、KO 株では腫瘍増殖能の亢進および腫瘍内 M2 マクロファージ数の増加を認めた。

最後に、*IL6* と *CCL2* は互いに正のフィードバック関係にあるとする報告を踏まえ、上記 KO 株同種移植実験系において、*CCL2* に対する受容体 CC chemokine receptor 2 の阻害剤である Propagermanium と、*IL6* の機能を阻害する抗マウス *IL6* 受容体モノクローナル抗体の作用を検討した。各薬剤は、単独では明らかな作用を示さなかったが、両者を併用することによって有意な腫瘍増殖抑制作用を示し、腫瘍内 M2 マクロファージ数の増加も抑制した。

以上、本研究では、尿路上皮における *KDM6A* の機能欠失が、炎症経路や癌幹細胞性の亢進ならびに M2 マクロファージの誘導を惹起し、さらに p53 の機能低下に基づく増殖能亢進と協調して、上皮内癌から MIBC を発症すること、その分子メカニズムとして、*IL6* および *CCL2* の発現亢進が協調的に関わることを明らかにした。

以上の結果から、本論文は、*KDM6A* の機能欠失マウスを作製して解析することにより、本変異が動物個体において、MIBC の病態形成に直接関与することを初めて証明した。さらに、*IL6* および *CCL2* の阻害剤併用療法が、*Kdm6a* の機能欠失型変異に起因する MIBC に対する新規治療となり得る事を示し、BC の病態解明ならびに新規治療法開発に貢献しうるものと考えられた。これらの理由から、審査委員会委員全員は、本論文が小嶋浩平に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。