

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第37号

2014年9月

京都産業大学

— は し が き —

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 26 年 9 月 20 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. <small>タクシノロス</small> TAKSINOROS	<small>サラウート</small> SARAWUT [博士 (生物工学)]	1
--	---	-------	---

論文博士

1. 谷 田 周 平	[博士 (生物工学)]	4
------------	-------------	-------	---

氏名（本籍）	タクシノロス サラウート TAKSINOROS SARAWUT (タイ)
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第17号
学位授与年月日	平成26年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	An <i>In Vitro</i> Study on the Mechanism of Formation of Rounded Melamine Cyanurate Crystals with Special Reference to Melamine-Triggered Urolithiasis in the Kidney
論文審査委員	主 査 村田 英雄 教授 副 査 竹内 実 教授 " 中田 博 教授

論文内容の要旨

Melamine toxicity, which adversely affects the urinary system, has been extensively reported in humans and animals. The consumption of melamine-adulterated foodstuffs can cause occlusion of the renal tubules leading to kidney malfunction and failure. Melamine alone has low acute toxicity. However, simultaneous exposure to melamine and its derivative cyanuric acid has an affect that is more toxic than exposure to each compound individually. The compound formed by melamine and cyanuric acid, melamine cyanurate (M-C), accumulates in renal tubules, where it causes obstruction and subsequent kidney dysfunction.

The pathogenesis of melamine-associated renal disorder still remains unclear. Therefore, the main purpose of this *in vitro* study was to investigate the mechanism of melamine-induced urolithiasis in the kidney and to provide a potential explanation for the formation of M-C urolites *in vivo*.

The present thesis is divided into three chapters. The first chapter focuses on the threshold concentrations of melamine and cyanuric acid for formation of M-C crystals, which do not form in the presence of low concentrations of melamine and cyanuric acid. The second chapter documents the effects of melamine, cyanuric acid and M-C on the expression of nephrin and podocin by podocytes; needle-like M-C crystals were shown to significantly decrease the expression of both proteins. The third chapter deals with the effects of serum proteins and an artificial macromolecule polyvinylpyrrolidone (PVP), whose

physico-chemical properties are comparable to those of high-molecular-weight serum proteins, on the morphology of M-C crystals. Macromolecular serum proteins and PVP were found to alter the shape of M-C crystals to a spherical form.

Based on these *in vitro* studies, I propose a possible mechanism for M-C crystal formation *in vivo*. 1) M-C crystals may not be formed outside the urinary system. 2) Needle-like M-C crystals may cause micro-injury of the podocyte slit diaphragm, inducing downward leakage of macromolecular serum proteins. 3) These leaked macromolecular serum proteins may affect the formation of M-C urolites, resulting in a rounded crystal structure.

Although further details of the mechanism involved remain to be clarified, my proposed model for the involvement of proteins somewhere in the nephron seems to provide a potential explanation for the *in vivo* pathogenesis of melamine-induced urolithiasis.

論文審査結果の要旨

「球状メラミンシアヌレート形成機序に関する *in vitro* 研究（特にメラミン誘導性の腎尿路結石症との関連に着目して）」（仮邦訳、原題は英文）は、乳幼児用粉ミルクおよびペットフードに混入したメラミンによって生じた腎尿路結石症を対象として、既報の知見や本論文の3章に亘る申請者独自の *in vitro* 研究成果に基づいて、その結石の形成機序に関する新しい仮説を提唱している。

各章の概要は以下のとおりである。

まず、第1章では、メラミンシアヌレートの生成時の会合濃度を検討している。その背景は次のとおりである。すなわち、メラミン由来結石症の罹患患者や動物では、痛風（尿酸結晶の全身的蓄積）のような結晶形成の様相とは異なり、腎尿路以外の結晶の沈着・蓄積は報告されていないが、その理由はまだ明らかになっていなかった。申請者は、第1章の *in vitro* 実験で、メラミンおよびその誘導体シアヌル酸の会合濃度が $200 \mu\text{g/ml}$ 未満の場合には、メラミンシアヌレート結晶が生成しないことを見出した。この濃度（閾値）は、発症例の患者や動物の血液中濃度（概ね $20 \mu\text{g/ml}$ 以下）よりはるかに大きかった。この *in vitro* 知見は、発症患者あるいは動物の体内では腎尿路系（排泄のための選択的濃縮が行われる部位）以外、たとえば血液や主要臓器内にメラミンシアヌレート結晶が見られないことを解釈する上で重要な根拠の一つといえる。

第2章では、メラミン、シアヌル酸およびメラミンシアヌレート結晶（針状）が、腎尿路系の濾過組織の主要細胞であるポドサイトとその網目状スリット構成タンパク質に及ぼす影響をマウス（ハツカネズミ）由来の培養株化細胞を用いて解析している。いずれの物質も細胞の形態には目立った変化をもたらさなかったものの、メラミンシアヌレート結晶はスリット構成タンパク質であるポドシン、ネフリンの発現、すなわち産生を抑制するという結果を得ている。

第3章では、メラミン由来結石症の臨床例あるいは実験発症例で報告されている結石主成分メラミンシアヌレートの球状（顆粒状）形状が、実験室内でメラミンとその誘導体シアヌル酸の混和反応によって生じるメラミンシアヌレート結晶の針状形状とは著しく異なることに注目し、その形状変化は生体内で何らかの要因により誘導されると思惟し、それに関与する生体成分について *in vitro* 試験により解析した。その結果、種々の血液タンパク質が球状メラミンシアヌレートの生成を仲介することを世界に先駆けて明らかにした。さらに、タンパク質だけではなく、医療目的や化粧品でも多用される人工高分子物質（ポリビニルピロリドン）も同様の形態変化を誘導する作用があることを見出している。なお、これらの生体あるいは人工の高分子物質が及ぼすメラミンシアヌレートの結晶形成に及ぼす物理化学的作用は、本論文の主目的外なので、考察されているのみであるが、今後その機序を解明していくことも有益と思われる。

これら第1から3章に亘る *in vitro* 研究成果と既報の知見を勘案し、本論文は、メラミン由来の腎尿路結石がどのように形成されるかについて、新仮説を提案している。その骨子は次のように概説される。メラミンとその誘導体シアヌル酸は循環血液内では、その低濃度のため、メラミンシアヌレート結晶を産生しない。その血液が腎内で濃縮され、十分量のメラミンとシアヌル酸が会合してメラミンシアヌレート（おそらく初期は針状）を形成する過程で、糸球体濾過スリットが傷害され、それが血漿タンパク質の漏出を誘導する。そのタンパク質がメラミンシアヌレート形成に介在し、臨床例で報告されているような球状結晶塊の尿路内蓄積、すなわち結石の形成に導く、というものである。なお、本論文の要旨は、動物実験/獣医学分野の国際専門雑誌の一つである *J.Vet.Med.Sci.* 誌 74 巻 1569-1573 頁、および同誌 75 巻 653-655 頁に掲載されている。

主査、副査から構成される博士論文調査委員はこれらの内容を精査した結果、本論文は十分な新規性と独自性を含む学術的価値があるとして、委員全員一致で「合格」すなわち「博士の学位に値する水準である」と判定した。本論文には、世界に先駆けた新知見が多く含まれており、それらはメラミンによる腎尿路結石症の病態を解明するうえで大変意義があると評価できる。

以上、報告する。

氏名（本籍）	谷田 周平（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	乙工第4号
学位授与年月日	平成26年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
論文題目	癌組織微小環境における MUC1 とレクチンの相互作用による腫瘍悪性化機構の解析
論文審査委員	主 査 中田 博 教授
	副 査 板野 直樹 教授
	〃 瀬尾 美鈴 教授

論文内容の要旨

多くの上皮性悪性腫瘍において過剰発現している MUC1 は、癌細胞の悪性化に関与していることが示唆されている。MUC1 は、1 本のポリペプチド鎖で合成された後、細胞内輸送過程で切断され、O-グリカンに富むタンデムリピートを含む N 末端ドメイン (MUC1-ND) および短い細胞外ドメイン、膜貫通ドメインと細胞質ドメインからなる C 末端ドメイン (MUC1-CD) のヘテロ二量体として構成される。MUC1 は高分子の糖タンパク質で多数のシアログリカンを発現していることから、棒状の立体構造をとり、細胞表面から突出した分子形態をとる。従って、細胞間あるいは ECM 間との物理的バリアーとしての機能を中心に研究されてきたが、近年、シグナル伝達分子としての機能が注目されてきた。すなわち、MUC1 発現癌細胞において、MUC1 と共局在する FGFR-3 や EGFR へのリガンドの結合を起点として、MUC1 はシグナルを中継する役割を担うことが明らかにされ、MUC1 の細胞質ドメイン (MUC1-CD) が scaffold protein として、様々なシグナル伝達分子をリクルートすることがわかってきた。その中で β -catenin は、癌細胞の悪性形質の発現に重要な因子のひとつである。癌組織微小環境では、癌細胞に加えて、浸潤した免疫細胞などを含む間質細胞が混在している。免疫細胞上に多くのレクチンが発現されていることおよび癌細胞も含めて多様な細胞より分泌されるレクチンが間質に存在することから、癌組織微小環境においては、癌細胞の発現する MUC1 上の糖鎖とレクチンがネットワークを形成し、この相互作用が直接的に MUC1 を介したシグナルを惹起する可能性が想定された。レクチンとしては、担癌状態において、血中濃度が上昇することが知られている Galectin-3 と MUC1 上の

糖鎖としてはシアログリカンが多くを占めることから免疫細胞上に発現する Siglec family を対象とした。MUC1 cDNA を導入したマウス 3T3 繊維芽細胞 (3T3/MUC1) を作成し、MUC1 の発現および内在性の Galectin-3 の発現を確認した。3T3/MUC1 細胞表面では、免疫染色により、MUC1 と Galectin-3 がドット上に共局在していることが観察され、多量体化した MUC1 により、Galectin-3 をリガンドとするシグナル伝達が予想された。Galectin-3 の結合部位を特定する目的で、MUC1-ND と -CD をグアニジン塩酸存在下での CsCl 密度勾配遠心で分離した後、Galectin-3 とのプルダウンアッセイで検討したところ、MUC1-ND に結合することがわかった。3T3/MUC1 細胞を Galectin-3 で処理した後、細胞抽出液を作成し、MUC1-CD あるいは β -catenin を免疫沈降した沈降物を電気泳動、ウエスタンブロッティングし、解析した結果、両分子は共沈することがわかり、Galectin-3 の MUC1 への結合に伴い、 β -catenin がリクルートされることがわかった。多くの MUC1 発現上皮性悪性腫瘍で Galectin-3 の合成が上昇していることから、Galectin-3 がオートクライン的に MUC1 発現上皮性悪性腫瘍に作用していることが示唆された。

免疫細胞には多数の Siglecs が発現しているが、MUC1 との結合活性を調べたところ、Siglec-9 と強く結合することがわかった。Siglec-9 はマクロファージ、樹状細胞、好中球、B 細胞、NK 細胞などに発現していることが知られている。実際に、ヒト癌組織標本において MUC1 および Siglec-9 陽性細胞が混在し、両分子が相互作用する可能性が高いことがわかった。3T3/MUC1 細胞に加えて、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 細胞に MUC1 を強制発現した HCT116/MUC1 細胞、内在性 MUC1 を発現するヒト肺癌由来細胞株 A549 細胞のいずれの細胞においても可溶性 Siglec-9 を細胞に作用させることにより、MUC1 への β -catenin のリクルートが認められた。このリクルートは、c-Src 阻害剤 PP2 により、著しく抑制されることから、c-Src を介したシグナルであることがわかった。さらに、本現象は、免疫細胞と MUC1 発現癌細胞の細胞間相互作用により起こることが想定されることから、新たに Siglec-9 強制発現 HEK293 細胞を作成し、3T3/MUC1 および HCT116/MUC1 細胞との共培養によっても MUC1 に β -catenin がリクルートされることを確認した。また、MUC1 発現細胞を neuraminidase 処理すると、この効果は消失することから、Siglec-9 をカウンターレセプターとする現象であることが強く示唆された。さらに、Siglec-9 処理後、60 分経過した 3T3/MUC1 細胞を抗 β -catenin 抗体を用いて免疫染色すると多くの β -catenin が核に検出された。また、同様に処理した細胞を分画し、核に β -catenin と MUC1-CD が存在することを生化学的にも示した。さらに、 β -catenin による転写制御を受ける c-myc の発現誘導に続き、増殖が促進されることがわかった。一方、Siglec-9 の刺激の有無によるリン酸化 β -catenin 量を比較したところ、Siglec-9 処理により、リン酸化 β -catenin が減少し、MUC1-CD との複合体の形成が β -catenin を安定化していることがわかった。

このように、MUC1 は従来明らかにされてきた増殖因子受容体を中継するシグナル伝達分子としての機能に加えて、Alternative pathway として、レクチンの結合に伴うシグナル伝達分子としても機能し、癌細胞の増殖・進展に寄与していることがわかった。本経路は、増殖因子を起点とするシグナル伝達を増強したり、あるいは、増殖因子またはその受容体の発現が乏しい癌細胞の増殖を担う経路となることも考えられる。

論文審査結果の要旨

我々の罹患する癌の大半は上皮細胞由来であり、MUC1はその上皮細胞に普遍的に発現される膜結合型糖タンパク質である。正常な上皮細胞は極性を保ち、MUC1はアピカル側のみ存在する。EMTにより極性を消失するとMUC1は細胞膜全体に発現されるようになる。EMTにより形成された癌組織微小環境では、同環境に存在することが予想される様々なレクチンが多様な糖鎖を発現するMUC1と相互作用することが想定された。本研究は、癌組織微小環境の生理的状況を的確に反映した分子間相互作用を想定したところに、独創性に富む研究成果を生んだ背景があり、その着眼点は大きいと評価できる。また、研究を開始する上で、ヒト癌組織標本を用いて、関連分子の組織における分布をとらえることにより研究の方向性に一定の見通しをつけたことも評価できる。癌組織微小環境におけるレクチンには、間質に存在する可溶性レクチンと細胞表面に存在する膜結合型レクチンの作用が考えられた。前者については、*galectin-3*を取り上げた。何故なら、*galectin-3*は多くの癌細胞も産生し、担癌状態で血中濃度が上昇していることが報告されているからである。膜結合型については、免疫細胞上に様々なレクチンが発現しているが、*siglec family*に注目した。MUC1上の糖鎖としては、シアログリカンに富むことから、*siglec family*のリガンドとなることが予想されたからである。このように、対象となる分子の想定も、分子の発現や性質を十分理解した上での発想と言える。従来、MUC1は増殖因子を起点とした情報伝達を中継する分子としてとらえられてきた。また、MUC1への*galectin-3*の結合はMUC1の多量化をもたらすとされており、コンフォメーションの変化はシグナル伝達の惹起も予想された。MUC1発現細胞に*galectin-3*を作用させた後、MUC1-CDを免疫沈降すると β -カテニンが共沈することから、*galectin-3*の結合に伴い β -カテニンがリクルートされることがわかった。*Siglec family*についてもMUC1との結合を検討した結果、*siglec-9*が強い結合活性を示した。*Siglec-9*はSA α 2-3GalとSA α 2-6Galのいずれも結合することから、比較的結合活性が高いと考えられる。また、ヒト癌組織標本を用いて*siglec-9*とMUC1の分布を蛍光抗体法で検討したところ、MUC1陽性組織中への*siglec-9*陽性細胞の浸潤が認められ、両分子の相互作用が強く示唆された。*Galectin-3*と同様に可溶性*siglec-9*を用いて、MUC1発現細胞に作用させると、時間及び濃度依存的に β -カテニンのリクルートが認められた。また、癌組織微小環境においては、細胞間相互作用を想定していることから、*siglec-9*発現細胞を新たに作成し、MUC1発現細胞との共培養による効果についても検討したところ、同様に β -カテニンのリクルートが認められた。リクルートされた β -カテニンは、核に移行することが細胞化学的および生化学的に確認された。更に、 β -カテニンの作用の下流にある*c-myc*の誘導を確認し、*siglec-9*がMUC1発現細胞の増殖を促進するカスケードを明らかにした。従来、増殖因子を起点とした癌細胞におけるシグナル伝達が解析されてきたが、MUC1分子へのレクチンの結合により同様の現象が起こることを初めて明らかにした。多くの癌細胞で双方のシグナルが協調的に作用しているものと考えられるが、トリプルネガティブの乳癌細胞などにおいては、増殖を促進する新規な経路として作用している可能性があり、更なる研究の発展が期待される。従って、本論文は癌細胞における新たな増殖機構を明らかにした

ものであり、学位論文として十分な内容をもつものと判断された。また、公聴会における発表、質疑応答についても学位に相応する内容と判断された。さらに、論文博士に課される語学試験についても合格であった。