

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 石川 聡一郎

横浜市立大学大学院医学研究科 顎顔面口腔機能制御学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学 主任教授 山本 哲哉  
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学 主任教授 折館 伸彦  
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 組織学 講師 富澤 信一

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### EP4-Induced Mitochondrial Localization and Cell Migration Mediated by CALML6 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

(口腔扁平上皮癌における EP4, CALML6 とミトコンドリア動態の解析)

#### 論文内容の要旨

本論文で取り扱う内容は、口腔がん細胞における EP4 誘導性 Ca<sup>2+</sup>流入と下流シグナル伝達、ミトコンドリア生合成との関連についての研究成果である。

ヒト歯肉線維芽細胞株 HGnF 及びヒト口腔扁平上皮がん細胞株 HSC-3, レンチウイルスで EP4 を過剰発現した HSC-3 細胞株, shRNA レンチウイルスで CALML6, CaMKK2 をそれぞれノックダウンした HSC-3 細胞株を用い, Scratch assay での細胞遊走能, リンパ節転移モデルマウスと尾静脈肺転移モデルマウスでの転移能, EP4 刺激後の遺伝子の網羅的解析, 遺伝子発現, 蛋白質発現の変化, さらにミトコンドリア代謝変化を評価した. 口腔がんにおける EP4 の mRNA 転写産物およびタンパク質の発現レベルは, 正常口腔細胞よりも高いことをまず確認し, EP4 過剰発現が口腔がん細胞の遊走促進, in vivo マウスモデルで頸部リンパ節転移が増加することを示した. EP4 刺激により変化する遺伝子の RNA シークエンスの網羅的解析では, カルシウム関連タンパクの一つである calmodulin-like protein 6 (CALML6) が増加, CALML6 が歯肉線維芽細胞と比較し口腔がん細胞に発現が高く, CALML6 をノックダウンすると EP4 刺激で誘導される細胞遊走の亢進が抑制されることも確認した. さらに, CALML6 の下流シグナルとして細胞遊走と関わりのある calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)は, EP4 刺激によりそのリン酸化が亢進することを示した. また, CaMKK2 の下流で直接活性化される AMP-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化の亢進も示された. CaMKK2 阻害は, EP4 刺激による AMPK のリン酸化と細胞遊走を抑制し, 口腔がんの肺転移モデルマウスにおいて, EP4 過剰発現により亢進した肺転移が CaMKK2 阻害薬により有意に抑制されることも示された. EP4 刺激は, 口腔がん細胞において Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ )を介して, ミトコンドリア生合成を増加させることも確認している. これらの実験結果から, 申請者は, 乳がんなどにおいて細胞遊走や転移の増加と相関があることが知られている EP4 が CALML6 と CaMKK2 を介してミトコンドリア生合成を調節し細胞遊走を亢進すると結論している.

審査にあたり, 以上の論文要旨の説明の後に以下の質疑応答が行われた.

#### 富澤信一副査からの質問

1. HGnF 細胞と HSC-3 細胞の EP4 刺激に対するカルシウムシグナルの反応性の違いは何が原因と考えられるか.

2. EP4 アゴニストの選択性はどの程度高いのか.
3. 今回, メインで用いた細胞株は何を使用したか. 他の細胞株は使用したか.
4. CALML6 を発現上昇遺伝子の中から選択した理由は何か.
5. CALML6 が EP4 のシグナルの中でどういう位置関係なのか.

上記の質問に対して以下の回答を行った.

1. HGnF 細胞は HSC-3 細胞に比べて, EP4 の発現が低いため, 発現量に依存して反応が起きていると考えている.
2. 今回使用した EP4 アゴニストの受容体への選択性は高く, 他の EP1, EP2, EP3 への結合はほとんどないことがわかっている.
3. 口腔がん細胞の遊走能やメカニズムの解明の実験には, ヒト舌扁平上皮癌細胞株である HSC-3 を使用した. 正常細胞は, 歯肉線維芽細胞の他に口腔ケラチノサイトを用いた. また, EP4 の発現の比較検討の際には, HSC-3 の他に SAT, HSC-4 といった細胞株を使用した.
4. GO 解析でピックアップされた遺伝子は 62 個あり, その中の上位 20% の中に CALML6 が含まれていた. さらに, 先行実験により EP4 刺激で CaMKK2 が関与していることが示唆されたため, カルモジュリンの一つである CALML6 に着目した.
5. まず, EP4 刺激により, 細胞外から細胞内へカルシウム流入が生じていることがわかっており, 細胞内へ流入したカルシウムイオンは CALML6 と結合することで, 下流のシグナルを活性化していると考えている.

#### 折館伸彦副査からの質問

1. ミトコンドリア生合成とは何か.
2. アンチオキシデントを使った場合に EP4 による細胞遊走に変化はあったか.
3. TCGA のデータ解析で, EP4 と CaMKK2 は生存曲線に影響を与えなかったが, 考えられることは何か.
4. 口腔がんの新たなターゲットとして CALML6 をどのように考えているか.
5. ミトコンドリアの細胞辺縁への移動は細胞遊走時に普遍的に起きていることなのか.

上記の質問に対して以下の回答を行った.

1. ミトコンドリア関連遺伝子の発現が増加することによる細胞内でのエネルギー合成, 特に ATP 産生をミトコンドリア生合成と考えている.
2. EP4 刺激により誘導される細胞遊走の亢進が, 抗酸化剤である N-アセチル-L-システイン (NAC) を使用することで抑制された. このことから, EP4 刺激で生じる活性酸素が細胞遊走に寄与していることが示唆される.
3. TCGA のデータセットは, 口腔がんだけではなく, 頭頸部癌全てを含んでいる点, 病期なども様々な点がある. そのため, 今後は転移の有無, 病期ごと

の比較検討を行うことでより詳細な影響を評価する必要がある。

4. 転移のバイオマーカーとして応用できないかと考えている。正常組織よりも腫瘍組織で発現が高いことから、転移の有無などにより CALML6 の発現に差がないか今後検討していきたいと考えている。
5. 細胞遊走時に見られる葉状仮足部には、ミトコンドリアが局在することが知られている。今回の結果では、EP4 刺激によりミトコンドリアの局在が変化し、仮足部にミトコンドリアが移動し、ATP 合成、ROS 産生が増加することで細胞遊走を引き起こしたと考えている。

#### 山本哲哉主査からの質問

1. EP4 のがんとの予後の臨床データはすでに出ているか。
2. 葉状仮足と細胞遊走は直列なシグナルなのか。
3. 今回のシグナルは腫瘍特異的なシグナルと言えるのか。
4. EP4 の細胞増殖への影響は調べたのか。

上記の質問に対して以下の回答を行った。

1. 他の癌腫でも EP4 の発現と予後への影響についてはこれまで報告がない。
2. 葉状仮足の形成が増加し、細胞遊走が亢進するというメカニズムはすでに報告がある。EP4 刺激による細胞遊走メカニズムも同様であり、葉状仮足の形成と細胞遊走の亢進は直列に関係していると考えている。
3. 今回の検討は、口腔正常細胞と口腔がん細胞での結果である。EP4 によるカルシウムシグナルは先行研究も含めて口腔がんの報告のみのため、口腔がん特異的なシグナルの可能性はある。今後は、他のがん細胞での検討も行い、腫瘍特異的なものか、口腔がん特異的なものか調べていきたいと考えている。
4. EP4 刺激により細胞増殖能に影響がないことは細胞増殖アッセイを用いて確認した。口腔がん細胞株だけではなく、口腔正常細胞でも同様に増殖能への影響は見られなかった。

申請された学位論文は、peer review を経て学術誌 *Communications Biology*. 2024 May 14;7(1):567. doi: 10.1038/s42003-024-06231-4. (IF 5.9) に掲載されている。本研究で示された EP4 の CALML6 と CaMKK2 を介したミトコンドリア生合成調節はこれまでに報告がなく、新規性を有する。また、この専門領域全般に対する俯瞰的理解、学位論文・原著論文の記載方法についても理解されており、本研究への主体的な貢献も質疑応答の中で確認できている。以上のことから、審査員による協議の結果、本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。