

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 土 谷 聡

本研究は上皮性卵巣癌の中でも特に予後が不良である明細胞腺癌の分子病理学的特徴を明らかにし、診断、治療に有用となり得る分子マーカーを明らかにするため、細胞株を用いたマイクロアレイ解析、手術組織標本を用いた免疫組織化学染色、RNA interference を用いた機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1 卵巣癌細胞株 11 株の発現解析

解析した全 12000 余りの遺伝子中 207 の遺伝子が Mann-Whitney の U 検定で $P < 0.05$ となる有意差をもって明細胞腺癌とその他の組織型で発現が異なった。さらに 2 群間で 3 倍以上発現差の認める遺伝子を抽出した。最も明細胞腺癌で発現亢進していた遺伝子は SPP1 であり、非明細胞腺癌細胞株に対して 14.3 倍の発現であった。その他に RBPMS, NNMT, TCF2(Hepatocyte Nuclear Factor-1 β), RAB9A, PIG7 など 16 遺伝子が明細胞腺癌で発現が亢進し、GAS6,ZFP36, TPM4 など 12 遺伝子が明細胞腺癌で発現が減弱していた。

2 卵巣癌細胞株における Hepatocyte Nuclear Factor -1 β mRNA と蛋白の発現

卵巣明細胞腺癌で発現亢進していた遺伝子のうち Hepatocyte Nuclear Factor -1 β (以下 HNF-1 β)についてさらに深く調べた。まず、リアルタイム RT-PCR法を用いて卵巣癌細胞株の HNF-1 β 発現量を定量した。明細胞腺癌における HNF-1 β mRNAの発現量の平均 (8.75 \pm 3.89)はその他の組織型(0.75 \pm 1.09)に比べ11.6倍でありこれはU検定で有意であった ($P = 0.008$)。

次に抗 HNF-1 β 抗体を用いて HNF-1 β 蛋白の発現を調べた。免疫ブロット法においても、明細胞腺癌細胞株ではその他の組織型と比べて HNF-1 β 蛋白の発現量が多かった。

3 免疫組織化学による卵巣癌手術標本における HNF-1 β 発現の解析

免疫組織化学による HNF-1 β の発現解析では、殆ど全ての卵巣明細胞腺癌の症例では核に染色を認めたのに対して大部分のその他の組織型の症例では核の

染色を全く認めないか、ごく一部分に弱い核染色を認めるのみであった。良性疾患である子宮内膜症には核への染色を認めなかった。また、上皮性卵巣癌の発生母地と考えられている正常卵巣表層上皮にも HNF-1 β の核染色を認めなかった。

4 RNA interference による HNF-1 β 発現の抑制

明細胞腺癌細胞株(TOV-21G, JHOC-5)を用いて、siRNA 実験を行った。Lamin に対する siRNA (ポジティブコントロール実験)はトランスフェクションの試薬のみを用いたネガティブコントロールに対して Lamin の mRNA 発現量を 4 割程度まで有意に減少させた。HNF-1 β に対する siRNA はネガティブコントロールと比較して 2~5 割程度まで減少させた。免疫ブロット解析にて、TOV-21G ならびに JHOC-5 細胞株ではこれらの siRNA が Lamin や HNF-1 β 蛋白の発現を減弱させることが確認された。

5 明細胞腺癌細胞株における HNF-1 β 発現の減弱によるアポトーシスの誘導

TUNEL 法と FACS による解析により、HNF-1 β 発現の減弱によって TOV-21G, JHOC-5 細胞にアポトーシスが誘導される事が確認された。

以上、本論文は卵巣明細胞腺癌は固有の遺伝子発現プロファイルを持っている事を明らかにし、発現の亢進している遺伝子群を特定した。特に HNF-1 β 蛋白の発現亢進が臨床病期や分化度とかかわりなく明細胞腺癌と非常に関連が深いことを見出し、HNF-1 β が卵巣明細胞腺癌の有用な分子マーカーであることを発見した。siRNA を用いた解析では、RNAi による HNF-1 β 発現の減弱によって卵巣明細胞腺癌細胞株にアポトーシスが引き起こし、卵巣明細胞腺癌の生存のためには HNF-1 β の発現が不可欠であることを示唆した。本研究はこれまで未知に等しかった卵巣明細胞腺癌の分子マーカー、治療標的分子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。