

審査の結果の要旨

氏名 土屋 剛史

本研究は、胃癌の腹膜転移の治療のターゲットとして分化抑制因子 (Inhibitor of differentiation, 以下 Id) 蛋白に注目し、RNA 干渉による Id 蛋白の抑制が、胃癌細胞の増殖や転移能に及ぼす影響について研究を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト胃癌細胞株である MKN45 を用い、RNA 干渉法にて Id1, 3 ダブルノックダウン細胞 (Id1/Id3kd, Id 細胞) を作製した。また、コントロールベクターとして empty vector を導入したコントロール細胞 (mock control, M 細胞) と親細胞 (parental, P 細胞) を対照として用いた。それぞれの細胞の Id1 と Id3 の蛋白発現を、Western blot 法にて分析したところ、P 細胞と M 細胞で、いずれも強い発現を認めた。しかし、Id 細胞の Id1 発現レベルは M 細胞の 65%まで、Id3 の発現レベルは 60%まで低下していた。
2. 各胃癌細胞の増殖能を MTS 法にて評価した。Id 細胞の増殖能は、培養後 3 日目までは、M 細胞と有意な差が認められなかったが、培養後 6 日目では、M 細胞より 12%低下していた。
3. Wounded monolayer repair assay を用いた検討で、傷閉鎖の程度によって細胞運動能を評価した。M 細胞と Id 細胞ではそれぞれ、はじめの傷幅の 49%と 26%まで閉鎖した。すなわち、Id1, 3 ダブルノックダウンにより、Id 細胞の運動能は M 細胞の 52.5%まで低下していた。
4. 各胃癌細胞内の MMP 発現を、Western blot 法にて評価した。MMP2 と MMP9 の発現を確認したが、いずれの細胞においても発現レベルに差を認めなかった。
5. 各胃癌細胞表面のレセプター発現を、フローサイトメトリーにて調べた。P 細胞でインテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 αV 、 $\beta 1$ と CD44 の発現が認められた。これらのレセプター発現レベルは P 細胞とトランスフェクション細胞間で同程度であったが、インテグリン $\alpha 6$ の発現が、Id 細胞では、M 細胞の 80%まで低下していた。
6. 細胞外基質 (ECM) 蛋白であるコラーゲンタイプ I、III、IV、フィブロネクチンとラミニンへの細胞接着能を検討した。いずれの細胞株もフィブロネクチン以外とは強く接着し、接着率も P 細胞とトランスフェクション細胞間でほぼ同等であった。しかし、ラミニンに対する接着率は Id 細胞で低下し、M 細胞の 58%であった。中皮細胞への接着能の検討では、Id 細胞と M 細胞間で差を認めなかった。
7. 各胃癌細胞の培養上清中の VEGF 濃度を測定したところ、M 細胞に比べて、Id 細胞で有意に低下していた。また、細胞内の VEGF 蛋白発現を Western blot 法にて評価したところ、M 細胞に比べ Id 細胞で低下していた。
8. 胃癌細胞から分泌された VEGF の活性を、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の増殖への影響として検討した。Id 細胞の培養上清で培養した HUVECs の増殖能は、M 細胞のものに比べ低下していた。

9. HUVECs を浮遊させたマトリゲル上に、各胃癌細胞の培養上清を加え、管腔形成を観察した。Id 細胞の培養上清を添加した、マトリゲル上での HUVECs の管腔形成能は、M 細胞の培養上清を添加した場合に比べわずかに低下していた。

10. 各胃癌細胞をマウス背部の皮下に移植し、腫瘍形成能及び増殖能を比較評価した。移植後 6 日目より全ての細胞で皮下腫瘍の形成が観察され、6、10、13 と 19 日目と腫瘍サイズは経時的に増大した。Id 細胞移植群では、M 群に比べ、腫瘍増殖速度は緩徐であった。

11. 各胃癌細胞の転移形成能を、マウス腹膜転移モデルにて評価した。各細胞をマウス腹腔内に注入し、17 日後に開腹して、腹腔内の転移結節の数と大きさを測定した。Id 細胞接種群では、M 細胞接種群に比べ、転移結節の総数が明らかに低下していた。また、個々の結節のサイズも小さく、特に直径 2.0mm 以上の結節を比較したときに、差はより顕著であった。

以上、本論文は Id 蛋白抑制による胃癌腹膜転移形成能の低下を明らかにし、そのメカニズムを解明した。胃癌細胞の増殖能、運動能、血管新生能の低下に加え、 $\alpha 6$ -インテグリンの発現低下によるラミニンへの接着抑制という新しい知見を得ている。本研究は Id が胃癌腹膜転移の形成に重要な役割を担っていることを明らかにしたもので、実際に臨床応用するためには、今後まだ克服すべき課題も多く残されているものの、Id 蛋白の抑制が胃癌治療の新しい戦略となり得ることを明らかにしたことから、学位の授与に値するものと考えられる。