

論文の内容の要旨

論文題目

膵癌の分子病理学的検討

—膵前癌病変における胃型形質の発現を出発点として—

氏名 田中 麻理子

要旨

膵癌は予後不良な上皮系腫瘍で、早期診断・早期治療のための研究解明が急務である。本研究ではヒト浸潤性膵管癌とその前癌病変を対象に、前癌病変から浸潤癌にかけて発現する分子として胃の上皮細胞間接着分子 Claudin-18 と転写因子 EVI1 を同定し、それらの発現の意義を検討した。

浸潤性膵管癌の前癌病変は膵上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia: PanIN)、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN)、粘液性嚢胞腫瘍 (mucinous cystic neoplasm: MCN)の3種類があり、中でも PanIN についてはその発癌プロセスについて形態学的変化と遺伝子異常の蓄積を加味した PanIN-carcinoma progression model が提示されている。浸潤性膵管癌における重要な遺伝子異常は *KRAS*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4/DPC4*、*p53* 遺伝子の変異で、特に *KRAS* 遺伝子の変異は膵発癌の早期から認められる。

さて、膵前癌病変はしばしば胃上皮細胞を模倣した形態を呈し、胃型形質マーカーの発現が認められる。この形態変化を踏まえ、胃の上皮細胞間接着分子である Claudin-18 (以下 CLDN18) に注目し膵腫瘍における CLDN18 の発現を免疫組織学的に検討した。結果、これまで報告されてきた胃型形質マーカー MUC5AC や MUC6 等と比べて CLDN18 が特異度と感度の高い、かつ早期病変まで検出ができる膵腫瘍性病変の関連マーカーとなりうることを明らかにした。

さらに、発現アレイデータを用いて胃特異的に発現する遺伝子群を潜在的に制御しうる転写因子の中で膵腫瘍組織や膵癌細胞株において CLDN18 と密な発現相関を示す転写因子を探索し、候補の中から血液系腫瘍で oncogenic な役割を持ち、他臓器の癌において KRAS との関連が報告されている転写因子 EVI1 に着目した。

免疫組織学的検討において EVI1 は正常膵管上皮では発現しないが、前述の 3 種類の膵前癌病変および浸潤性膵管癌で広く発現することが見出された。EVI1 の陽性率は PanIN で 100%、IPMN で 96.9%、MCN で 100%、浸潤性膵管癌で 89.1%であった。

また、膵管上皮細胞株 (以下 HPDE 細胞) と膵癌細胞株においても EVI1 の発現が認められた。EVI1 を抑制するとこれらの EVI1 陽性膵癌細胞は丸い細胞形態をとるようになり、細胞増殖能と細胞移動能が低下した。また細胞周期解析では EVI1 抑制により G0/G1 期の細胞数が増加し、nocodazol 処理によって見られる G2/M 期への集積も見られなくなることが確認された。

これらの表現型の背景にあるメカニズムを調べるため EVI1 の下流としてこれまで報告されてきた転写因子やシグナル経路を検索したが、その多くは膵癌細胞においては EVI1 発現量の変化

に伴う変動を示さなかった。そこで細胞増殖能や細胞移動能に関わるシグナル経路として RAS-MAPK 経路に注目したところ、EVI1 の抑制により KRAS の発現が低下し、KRAS の下流である ERK のリン酸化も低下した。さらに ERK の下流にある p27 は EVI1 抑制に伴い発現が上昇することが見出された。すなわち膵癌においては EVI1→KRAS→ERK という経路が存在し、p27 の発現量を調節して細胞周期を制御する [こと](#)が示唆された。

また、EVI1 はスプライシングバリエントの多い転写因子であり、最も代表的なスプライシングバリエントである EVI1 以外に、MDS1 遺伝子との in-flame スプライシングにより生じる MDS1/EVI1、6 番目と 7 番目の ZF を含む領域を欠失した Δ 324 EVI1 の頻度が高い。今回扱った HPDE 細胞や膵癌細胞は MDS1/EVI1、EVI1、 Δ 324 EVI1 のいずれのスプライシングバリエントも発現していたので、中でもこれまであまり報告のない Δ 324 EVI1 について膵癌細胞における機能解析を行った。 Δ 324 EVI1 を単独に抑制すると細胞増殖能、細胞移動能、細胞周期は殆ど影響を受けなかったが、MDS1/EVI1 と EVI1 を抑制した時と同様、細胞が類円形に近くなり、かつ ERK のリン酸化が低下した。EGF 刺激による ERK のリン酸化の上昇を評価すると、MDS1/EVI1、EVI1、 Δ 324 EVI1 の 3 種類を全て抑制した時に最も強く ERK のリン酸化の上昇が抑えられ、続いて MDS1/EVI1 と EVI1 の 2 種類を抑制した時が二番目に強く上昇が抑えられ、 Δ 324 EVI1 のみを抑制した時は上昇が抑制されるもののその程度は最も弱かった。EVI1 は proximal zinc finger (ZF) と distal ZF の 2 つの ZF ドメインを持つが、 Δ 324 EVI1 は proximal ZF ドメインの一部を欠失しており、proximal ZF ドメイン依存的な機能を喪失している一方で、distal

ZF ドメイン依存的な機能については保持していることが予想される。今回の結果から EVI1 が proximal ZF ドメインと distal ZF ドメインの両者を介して ERK のリン酸化を調節しうること、△
324 EVI1 は細胞増殖能、細胞移動能、細胞周期などに影響を与えるほどの機能はないものの distal ZF ドメインを介して細胞形態には影響を及ぼしうる可能性が示唆された。

最後に、EVI1 が KRAS の発現量を調節するメカニズムとして microRNA (miRNA) の介在を検討した。EVI1 の標的となりうる miRNA 群と KRAS を標的としうる miRNA 群とに共通する miRNA に注目し、膵癌細胞において EVI1 の抑制により microRNA-181 と microRNA-96 の発現が上昇することを明らかにした。さらに EVI1 はこれらの miRNA の発現調節を転写レベルで行い、また、これらの miRNA が実際に KRAS を負に制御していることを見出した。

以上から、本研究を通して、形態学を端緒として同定し得た CLDN18 と EVI1 が膵腫瘍性病変を早期から検出できる有用な腫瘍関連マーカーとなりうること、血液系腫瘍で重要視されてきた *EVI1* 遺伝子が膵癌細胞でも腫瘍促進的な機能を有し、その背景の一つとして EVI1 が miRNA を介して膵発癌の initiator として重要である KRAS を正に制御し、その下流の ERK のリン酸化、p27 の発現量を調節する経路があることを明らかにした。