

審査の結果の要旨

氏名 田中 麻理子

本研究は膵癌の早期診断・早期治療のための研究解明を行うことを目的とし、ヒト浸潤性膵管癌 (以下PDAC) とその前癌病変において胃型形質が発現することに基づいて、これらの腫瘍性病変で発現する分子として上皮細胞間接着分子Claudin-18 (以下CLDN18) と転写因子EVI1を同定し、それらの発現の意義を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト正常膵組織及び腫瘍性膵組織を用い、浸潤性膵管癌の前癌病変とされる膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN)、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN)、粘液性嚢胞腫瘍 (MCN)、ならびに PDAC について CLDN18 発現を免疫組織学的に検討した。非腫瘍性膵組織では CLDN18 の発現は認められなかった。一方、PanIN の 96.9%、IPMN の 95.3%、MCN の 80%、PDAC の 69.9%で CLDN18 の発現が認められた。これまで膵腫瘍マーカーとして報告されてきた胃型形質マーカーMUC5AC や MUC6 等との発現比較では、CLDN18 は既報告のマーカーよりも特異度と感度が高く、かつ早期病変まで検出可能な膵腫瘍性病変関連マーカーとなりうることが明らかとなった。また、膵癌細胞株に対して Phorbol 12-myristate 13-acetate (以下PMA) およびPKC阻害剤を用いた検討からは、CLDN18 の発現が PKC 経路の活性化に依存して PMA により誘導されることが確認され、膵発癌早期の CLDN18 の発現において PKC 経路の活性化

が関与している可能性が示された。

2. 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、転写因子 **EVI1** に着目した。正常膵、膵前癌病変および **PDAC** の免疫組織学的検討から、**EVI1** は正常の形態を維持した膵管上皮に発現しない一方、ほぼすべての膵前癌病変でび漫性に発現することが確認された。膵腫瘍性病変における **EVI1** の発現範囲は **CLDN18** よりも広く、かつ組織亜型に依存しておらず、**EVI1** が腫瘍性上皮の検出に際して極めて優れたマーカーとなりうることを示された。
3. 膵管上皮細胞と **EVI1** 陽性膵癌細胞の細胞増殖、細胞移動能、細胞周期に対する **EVI1** の影響について、**EVI1** に対する **siRNA** を用いたノックダウン実験で検討した。**EVI1** を抑制するとこれらの **EVI1** 陽性細胞は丸い細胞形態をとるようになり、細胞増殖能 (**MTT assay**) と細胞移動能 (**wound healing assay**) が低下し、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。さらに、膵管上皮細胞や膵癌細胞において **EVI1** が細胞増殖、細胞移動能、細胞周期に影響を及ぼすという結果の背景にあるメカニズムとして **RAS-MAPK** 経路を検討したところ、**EVI1** ノックダウン実験にて定量的 **RT-PCR** および **western blotting** を用い、**EVI1** の抑制により **KRAS** の発現が低下し、**KRAS** の下流である **ERK** のリン酸化も低下することが示さ

れた。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。すなわち膵管上皮細胞および膵癌細胞において EVI1 は細胞増殖・細胞移動・細胞周期に対し正の作用をもたらし、その過程には KRAS、ERK のリン酸化、p27 が関与しうることが明らかとなった。

4. EVI1 のスプライシングバリエントの中で代表的なものは MDS1/EVI1、EVI1、 Δ EVI1 であり、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、細胞が類円形となり、ERK のリン酸化が低下した。EGF 刺激による ERK のリン酸化の上昇については、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。即ち、EVI1 の代表的な 3 つのバリエントはいずれも ERK のリン酸化に影響を及ぼすことが示された。
5. EVI1 が KRAS の発現量を調節するメカニズムを検討した。In silico 解析から、EVI1 の標的となりうる microRNA 群と KRAS を標的としうる microRNA 群とに共通する microRNA を検討対象とし、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

microRNA の発現調節を転写レベルで行い、また、これらの microRNA の過剰発現系を用い、これらの microRNA が実際に KRAS を負に制御していることを見出した。

以上、本論文は形態学を端緒として同定した 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持ち、その背景の一つとして EVI1 が microRNA を介して膵発癌の initiator として重要とされる 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。本研究は未だ研究の途上段階にある、膵発癌初期に起こりうるメカニズムの一端を解明するに際して重要な貢献を為すと思われ、学位の授与に値するものと考えられる。