

## 審査の結果の要旨

高橋 良太

本研究は多様な機能を持つ Mitogen-activated protein kinase (MAPK)ファミリーの一つである c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)の膵臓癌における役割を明らかにするため、ヒト膵臓癌細胞株を用いた検討に加えて遺伝子改変マウスによる膵臓癌モデルを用いて、JNK が膵臓癌の増殖に与える影響や、JNK 阻害によって得られる治療効果についての検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト膵臓癌組織アレイにおいて免疫染色にて JNK の活性を検討したところ、93 例中 85 例 (91.4%)において JNK の活性化が認められた。ヒト膵臓癌細胞株においても 10 種類中 9 種類の細胞株においてウェスタンブロットで JNK の活性化が認められ、ヒト膵臓癌において JNK の活性化が高率に認められることが示された。
2. 膵臓癌細胞株(BxPC-3, KP-4)に対して small interfering RNA (siRNA) を用いて JNK1、JNK2 それぞれをノックダウンしたところ、いずれも増殖抑制効果が認められた。また JNK1 に対する short hairpin RNA (shRNA) を発現するレンチウイルスを BxPC-3 細胞に感染させる実験も行い、増殖抑制を認めた。JNK 阻害剤の投与によっても濃度依存的に BxPC-3, KP-4 の増殖が抑制された。
3. siRNA によって JNK を阻害した BxPC-3, KP-4 細胞株においてフローサイトメトリーを用いて細胞周期の変化を調べたところ、JNK1, JNK2 を阻害した細胞株いずれにおいても G0/G1 期細胞の増加が認められた。さらに同じ条件の細胞において細胞周期関連のタンパクの発現をウェスタンブロットにて検討したところ、cyclin D1 の減少が認められた。
4. 変異型の Ras 遺伝子を膵臓癌細胞株 BxPC-3, KP-4 に対して強制発現させ、JNK の活性について野生型の Ras 遺伝子を強制発現させた細胞株と比較した結果、変異型の Ras を発現させた細胞株において JNK の活性増加が認められた。
5. 膵特異的に transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 2 型受容体(Tgfb $\beta$ 2)をノックアウトし、同時に変異型 K-Ras (*Kras*<sup>G12D</sup>)を発現させた遺伝子改変マウスである *pancreatic transcription factor-1a*(*Ptfla*<sup>cre/+</sup>;*Lox-Stop-Lox*(*LSL*)-*Kras*<sup>G12D/+</sup>;*Tgfb $\beta$ 2*<sup>lox/lox</sup> マウス(*Kras*<sup>G12D</sup>+*Tgfb $\beta$ 2*<sup>KO</sup> マウス)は膵臓癌のモデルとして知られており、また *Ptfla*<sup>cre/+</sup>;*LSL-Kras*<sup>G12D/+</sup> マウス(*Kras*<sup>G12D</sup> マウス)は Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) と呼ばれる前癌病変を発生することが知られている。これらのマウスの膵組織における JNK の活性を免疫染色、ウェスタンブロットにて検討したところ、野生型マウスの正常膵組織では JNK の活性化が認められなかったのに対し PanIN 及び癌組織においては JNK の活性化が認められた。
5. *Kras*<sup>G12D</sup>+*Tgfb $\beta$ 2*<sup>KO</sup> マウスに対して JNK 阻害剤 SP600125 を 4 週間投与し膵組織を対照群と比較したところ、H&E 染色において膵全体に占める腫瘍の面積が対照群 86.6%から SP600125 投与群 44.8%へと縮小が認められた。JNK 阻害剤 D-JNKI1 を投与した場合にも同様の

傾向が認められた。また SP600125 を投与したマウスの膵腫瘍組織においては免疫染色にて cyclin D1 や PCNA の発現が減少していた。一方 transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色と Cytokeratin-19 の二重染色において、アポトーシス細胞の数は SP600125 投与群と対照群の間に差は認められなかった。また  $Kras^{G12D}+Tgfr2^{KO}$  マウスに SP600125 を投与し続けたところ、生存期間が対照群の 58.5 日に対して SP600125 投与群 72.6 日と延長が認められた。

6.  $Kras^{G12D}+Tgfr2^{KO}$  マウス膵組織を用いて血管内皮細胞マーカーである von Willebrand factor に対する免疫染色を行ったところ、JNK 阻害剤 SP600125 投与群において腫瘍中の血管数の減少が認められた。サイトカインアレイを用いて KP-4 細胞株の上清中のサイトカインを検討したところ、SP600125 投与によって interleukin-8, growth related oncogene  $\alpha$  (GRO $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF) といった血管新生に関わるサイトカインの減少が認められた。SP600125 で処理した KP-4 の上清を用いてヒト血管内皮細胞を培養したところ、対照群と比較して毛細血管形成の減少が認められた。

以上、本論文は JNK が膵臓癌の増殖、血管新生に重要な役割を有しており、JNK 経路が膵臓癌の治療標的となりうることを示した。本研究はこれまで明らかにされていなかった、膵臓癌における JNK の機能解明について重要な貢献をなすとともに、膵臓癌に対する新たな治療法の確立へ貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。