

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 今野（清水） 真己

本研究では、アスパラギン酸プロテアーゼの一種である *Cathepsin E* の印環細胞癌を中心とした胃癌における発現変化の意義につき検討した。

胃印環細胞癌はその発生機序に不明な点が多く、悪性度の評価も定まっていない。今回の研究では、胃癌由来細胞株を用いて遺伝子のスクリーニングを行い *Cathepsin E* に着目した。外科手術検体、内視鏡切除検体を用いた臨床検体での解析を中心に、胃癌の発生機序や組織型の解明を試み、下記の結果を得ている。

1.印環細胞癌において発現変化を認め、それが印環細胞癌の発症メカニズムの解明に繋がる可能性のある遺伝子につき検索を行なった。網羅的解析を施行した既報を基に、分化型癌、未分化型癌での発現の差異が報告されている遺伝子 9 種類に着目した。胃癌由来細胞株 20 種類、大腸癌由来細胞株 10 種類、消化管外由来細胞株 2 種類から total RNA を抽出し RT-PCR を施行したところ、胃印環細胞癌由来細胞株で発現が明瞭であり、胃高分化管状腺癌にて発現の欠失を認める *Cathepsin E* に着目した。RT-PCR で *Cathepsin E* の発現が明瞭であった細胞株と欠失した細胞株にて Western Blotting を施行したところ、RT-PCR で *Cathepsin E* 陽性の細胞株での mRNA レベルでの発現と、蛋白レベルでの発現はほぼ連動した。この結果より、*Cathepsin E* の発現は転写レベルでの制御であることが示唆された。

2.胃癌手術検体 118 例につき *Cathepsin E* 免疫染色を試みた。印環細胞癌 51 例では、51 例 50 例の検体で細胞質均一に *Cathepsin E* が染色された。次に高分化管状腺癌、中分化管状腺癌、乳頭腺癌、低分化腺癌、粘液癌につき *Cathepsin E* の発現を解析した。印環細胞癌と同じ未分化型癌に分類される低分化腺癌は、*Cathepsin E* の染色性が腫瘍部の 50% 以上を占めるものが 58% あり、高分化管状腺癌、中分化管状腺癌、乳頭癌、粘液癌に比較して *Cathepsin E* の染色性が高かったが、印環細胞癌よりは明らかに低かった。他の組織型では、腫瘍内での染色性が 50% 以上認められるものが、高分化管状腺癌では 30%、中分化管状腺癌では 39%、乳頭腺癌では 40% であり、ある割合で染色性が得られていた。

3.早期胃癌の内視鏡的粘膜下剥離術切除検体を用いた *Cathepsin E* の免疫染色の検討を行った。印環細胞癌は 7 検体のうち 6 検体で 90% 以上の染色性を得られ、進行胃癌の染色性の傾向と同様であった。他の組織型では 50% 以上染色されている検体の割合は、高分化管状腺癌が 14%、中分化管状腺癌が 41%、乳頭腺癌が 29%、腺腫が 0% であり、分化度が高いと考えられる高分化腺癌、腺腫で *Cathepsin E* の発現が欠失する傾向を認めた。

4.*Cathepsin E* の性質の検討を施行した結果、*Cathepsin E* は胃の胃底腺領域や幽門腺領域の正常上皮細胞の細胞質に均一に染色され、表層粘液細胞から腺底部まで一様に染色されることが特徴と考えられた。また、腸上皮化生性変化においては腸型の腸上皮化生性変化で発現が低下し、胃腸

混合型の腸上皮化生性変化では発現を認めた。Cathepsin E は胃のマーカーである MUC5AC には正の相関があり、腸のマーカーである MUC2 には負の相関があることがわかった。さらに食道、十二指腸、回腸、大腸といった消化管他臓器では染色されなかった。以上より Cathepsin E は胃型形質を表すと考えられた。

5. 早期胃癌の内視鏡切除検体において、腫瘍部、周辺非腫瘍粘膜部の評価をするために、各々の組織型で Cathepsin E と胃型マーカーである MUC5AC、腸型マーカーである MUC2 の免疫染色を施行した。印環細胞癌において、胃型形質を表す Cathepsin E と MUC5AC は、腫瘍部、周辺非腫瘍粘膜部において染色性が高い一方、腸型形質を表す MUC2 では、染色性が低く、発現が低い傾向が示唆された。一方、腺腫、高分化管状腺癌では、胃型形質、腸型形質の発現傾向が、腫瘍部と周辺非腫瘍粘膜部で乖離する傾向を認めた。中分化管状腺癌、乳頭腺癌は明瞭な傾向を認めなかった。

6. Cathepsin E の制御機構の検討を行うため、5'-RACE 法、Primer Walking 法を施行し転写開始点の検索を行った後、転写開始点上流 2001bp からの欠失変異を作成し Luciferase assay 法を施行した。その結果、転写開始点上流-2001bp~-847bp、-200bp~-150bp の領域で活性があると考えられ、複数の制御機構の存在が示唆された。エピジェネティクス薬による Cathepsin E の発現変化を調べるために、脱メチル化薬、脱アセチル化酵素阻害薬処理を 5 つの胃癌細胞株に施行した。3 種類の Cathepsin E 発現細胞と 2 種類の Cathepsin E 発現欠失細胞の処理を行ったが、薬剤処理にいずれの発現の変化も認めなかった。

7. Cathepsin E の抗癌活性につき検討するため、Cathepsin E 導入細胞の軟寒天培地のコロニー形成およびアポトーシス誘導および検出を行った。いずれの実験においても、Cathepsin E 導入細胞とコントロール細胞では明らかな差異を認めることができなかった。

以上、本論文では、胃印環細胞癌臨床検体の性質にかかわらず、Cathepsin E が腫瘍細胞に一致して細胞質均一に染色されることを見出した。また、Cathepsin E 免疫染色のみならず、胃型マーカーである MUC5AC、腸型マーカーである MUC2 を用いた、組織型毎の染色性の検討、腫瘍部と周辺非腫瘍粘膜部での検討を行い、Cathepsin E が胃癌の組織型決定、発生進展を考える上で重要なキー遺伝子であることが示唆された。

本研究結果は、胃癌の発症や組織型決定の機構において、キー遺伝子の組織型毎の発現や腫瘍部と周辺非腫瘍粘膜部における発現のパターンを解析することにより、胃癌メカニズムの解明に寄与する可能性を示唆するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。