

論文の内容の要旨

論文題目 小腸癌の分子生物学的特徴の検討

氏名 鈴木 裕 史

背景・目的

小腸は最も診断の困難な領域の1つであり、中でも小腸癌は発見が難しく、診断時には切除困難となっていることが少なくない。小腸癌は全消化管悪性腫瘍の0.2-2%を占める稀な悪性疾患であり、罹患率は0.66/100,000と低い。臨床症状としては腹痛が最も多く、次いで悪心・嘔吐、貧血などを呈するが、いずれも特徴的な症状ではないため、これも診断を難しくしている。小腸癌はその稀少性から診療ガイドラインは存在せず、海外では結腸癌に準じた治療が推奨されているが、本邦では、現在のところ治癒切除の困難な小腸癌に対して効果・効能を有する薬剤は承認されていない。小腸癌と大腸癌は、組織病理学的な特徴や、生活習慣における発癌のリスクなどから類似点が多く指摘されているが、疾患の発生頻度や5年生存率の低さなどの面で、相違点も存在することから、小腸癌の分子生物学的特徴を理解し、病態を解明する必要がある。

現在、小腸の発癌過程には以下の2つのゲノム不安定性、①染色体不安定性及び②マイクロサテライト不安定性(MSI)：ミスマッチ修復機構の異常に伴う1~数塩基レベルの複製エラー(RERs)、に加えて、③エピジェネティックな変化、なかでもCpG islandの高度なメチル化(CIMP)による遺伝子の転写制御が腫瘍の進展に影響を与えていると考えられ、研究が進められているが、いずれも臨床検体を用いた解析に留まっている。そこで我々は、小腸癌細胞株を樹立して既存の遺伝子変異との比較解析を行うとともに、細胞内シグナル伝達の解明に着手し、得られた特徴を小腸癌の臨床検体で参照することで小腸癌により普遍性のある性状の解析を試みた。更に、細胞増殖能を利用した薬剤感受性試験を行い、小腸癌に特化した治療薬についても検討した。

方法・材料

小腸癌生検検体の一部を酵素処理により融解し、約 2 週間培養した。培養の過程で生き残り、コロニーを形成したものを拾い上げて培養し続けることにより、小腸癌由来細胞株 (small intestinal adenocarcinoma cell : SIAC 細胞) を樹立した。

SIAC 細胞の可溶化物を用いてウェスタンブロットを行うことにより、異常を有する特徴的なタンパクを検索した。また、ゲノム DNA を抽出し、シーケンス解析を行うことで、変異を有する癌 (抑制) 遺伝子を探索した。これらの解析で得られた特徴は、小腸癌臨床検体を用いた免疫組織染色やパラフィン包埋切片より抽出したゲノム DNA を用いたシーケンスを行うことで、小腸癌により普遍性のある解析を試みた。また SIAC 細胞の増殖能を利用して、Dual Luciferase assay を行うことでシグナル伝達の解明に着手した。

小腸癌に有用な抗癌剤の探索を目的として、SIAC 細胞用いた異種移植マウスモデルを作製して、大腸癌治療に用いられている 2 つの分子標的薬 (アバスチン及びセツキシマブ) の抗腫瘍効果を検討し、140 種類の化合物に対して細胞増殖試験によりスクリーニングを行った。

結果

【1】 小腸癌由来細胞株 SIAC 細胞の分子生物学的特徴の検討

- 1) SIAC 細胞の特徴の検討 : SIAC 細胞では腸管上皮細胞に特異的な発現を認める CK19 や CDX2 の発現を認めていることから上皮由来の細胞であることが確認された。
- 2) ミスマッチ修復機能に関する検討 : SIAC 細胞ではミスマッチ修復(MMR)タンパクである MLH1 及び MSH6 の発現消失、MSH2 の発現減弱を認めた。
- 3) MMR 遺伝子異常と CIMP の関連性についての検討 : SIAC 細胞における MLH1 の消失は CIMP によるサイレンシングである可能性が示唆された。また、トリコスタチン A (ヒストン脱アセチル化阻害剤) を併用することにより、更に mRNA の発現量は回復していた。
- 4) MMR 標的遺伝子の MSI に関する検討 : SIAC 細胞では MMR の標的遺伝子である、BAX 及び TGF β R II、ACVR II、MSH6、MSH3 に複製異常を認めた。
- 5) 癌 (抑制) 遺伝子の異常に関する検討 : p53 や Smad4 のタンパク発現には異常なく、また、KRAS や BRAF の遺伝子に変異を認めなかった。 β -カテニンタンパクは野生型よりも十数 kDa.低い位置にもバンドを認め、欠失変異体の存在が示唆された。
- 6) シグナル伝達の活性化に関する検討 : SIAC 細胞では Wnt/ β -カテニン経路の異常な活性化 (TOP/FOP 比で約 2.9 倍、正常とされる系 (RKO 細胞) では<1) が認められた。
- 7) β -カテニンの局在解析 : β -カテニンは細胞染色では通常は細胞膜上に局在を示すが、SIAC 細胞では細胞質にも局在を認めた。
- 8) β -カテニンの欠失領域に関する検討 : ゲノムシーケンスの結果、エクソン 3 のほぼ全域を含む 30-410b.p.領域に欠失を認めた。
- 9) β -カテニンの欠失変異体に関する検討 : タンパク合成阻害実験より、SIAC 細胞において β -カテニンの欠失変異体は野生型と比較して分解されにくいことが確認された。また、

SIAC 細胞と同じ β -カテニン変異体を強制発現させた細胞では野生型を強制発現させた細胞よりも Wnt/ β -カテニン経路に強い活性 (約 2.6 倍) が認められた。

- 1 0) チロシンキナーゼ活性に関する検討: チロシンキナーゼアレイを用いた検討では EGFR > HER3 > HER2 の順で EGFR ファミリーに最も強い活性が認められた。

【2】 臨床検体における小腸癌の分子生物学的特徴の検討

- 1) 臨床検体を用いた MMR タンパクの発現異常についての検討
臨床検体 9 症例では MLH1: 44% (4/9)、MSH2: 22% (2/9)、MSH6: 33% (3/9) に発現異常があり、少なくとも 1 つ以上の MMR タンパクに異常を認めたものは全体の 55% であった。
- 2) MMR 標的遺伝子の MSI に関する検討
BAX の変異が 22% に、MSH6 の変異が 44% に、全例に TGF β R II の変異を認めた。一方で、IGF II R では変異を認めなかった。
- 2) 癌 (抑制) 遺伝子の異常に関する検討
約 33% に KRAS 変異を認めた。一方で BRAF 変異は検出されなかった。またいずれの検体もエクソン 3 の内部の配列には点変異や欠失変異は認められなかった。
- 3) β -カテニンタンパクの発現異常についての検討
約 22% に β -カテニンの局在異常 (細胞質への集積) を認めた。

【3】 SIAC 細胞株を用いた小腸癌治療法の検討

- 1) 異種移植モデルの作製と性状解析
SIAC 細胞を皮下に移植した異種移植マウスモデルの結節及び結節から採取した腫瘍細胞はウェスタンブロット及び免疫組織染色にて SIAC 細胞やその由来となる臨床検体の性質が保持されていることを確認した。
- 2) 異種移植モデルを用いた抗腫瘍効果の検討
大腸癌治療に使用されるアバスチン、セツキシマブを異種移植マウスモデルに週 2 回、約 1 か月間投与したが、腫瘍の縮小効果は得られなかった。
- 3) EGFR ファミリー阻害薬の細胞増殖抑制効果の検討
チロシンキナーゼアレイの結果を受けて、EGFR 阻害薬 4 種および HER2 阻害薬を用いて、細胞及び腫瘍増殖抑制試験を行ったが、有意な増殖抑制効果は得られなかった。
- 4) SIAC 細胞に細胞増殖抑制効果を発揮する薬剤の探索
140 種の薬剤を用いて細胞増殖実験によるスクリーニングを行った結果、プロテアーゼ阻害剤であるボルテゾミブおよび微小管重合阻害剤であるエリブリンにおいて細胞増殖抑制効果を認めた

考察

消化管の腫瘍形成・悪性化のプロセスには① 染色体不安定性 (CIN)、② マイクロサテライト不安定性 (MSI)、の 2 つのゲノム不安定性に、③ エピジェネティックな遺伝子発現

抑制機構を組み合わせた経路が重要な役割を担っていると考えられている。本研究においても SIAC 及び使用した小腸癌検体の特徴を理解するにあたり、上記の 3 要素を中心に解析を進めた。

樹立した小腸癌由来細胞株 SIAC 細胞は上記の経路に対応して、

- ① CTNNB1 (β -カテニンの遺伝子) のエクソン 3 領域の大部分に heterozygous な欠失があり、これによりタンパクが安定化して細胞質に蓄積し、転写活性が亢進すること。
- ② MLH1、MSH6 の発現消失、及び MSH2 の発現減弱、とそれに伴う TGF β RII、BAX、MSH3、MSH6 の遺伝子コード領域における RERs があること。
- ③ MLH1 において CIMP に関連したエピジェネティックな発現抑制が示唆されたこと。

以上の特徴を有していた。CIN と MSI/CIMP は大腸癌では互いに排他的経路であるため、これを重複して有する SIAC 細胞は小腸癌に特徴的なものかもしれない。

小腸癌臨床検体 9 検体は病歴及び検査歴より家族性大腸腺腫症 1 検体を認めたが、8 検体は孤発性の小腸癌と考えられた。SIAC 細胞と同様の解析を行った結果、

- ① KRAS 変異は 33%、BRAF 変異は認めなかった。22%に β -カテニンの局在異常を認めた。
- ② MLH1: 43% (4/9)、MSH2: 22% (2/9)、MSH6: 33% (3/9) に発現異常があり、少なくとも 1 つ以上の MMR タンパクに異常を認めたものは全体の 55%であった。

既報と比較して β -カテニンの異常は少なく、逆に MMR 遺伝子発現異常が多い印象はあったが、より正確な頻度を把握するためには、今後も症例を蓄積して検討する必要がある。

新規抗癌剤の検討として、SIAC 細胞を用いた細胞増殖抑制試験により、ボルテゾミブ及びエリブリンの 2 つの薬剤の有用性が示唆された。今後、SIAC 細胞を用いた異種移植マウスモデルを用いて in vivo での有用性を検討していきたいと考えている。