

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 裕史

本研究は治療法が未確立な小腸癌の発生機序解明及び治療薬の開発を目的として小腸癌由来細胞株を世界で初めて樹立し、この細胞より得られた特徴を経験症例と照合することで小腸癌の分子生物学的特徴を検討するとともに、細胞増殖能を利用して有効な薬剤の探索を試みたものである。本研究により下記の結果を得ている。

1. 小腸癌組織より内視鏡下に採取し、培養・樹立した細胞株（SIAC 細胞）は、ウェスタンブロット及び細胞染色による解析から上皮細胞の細胞骨格タンパクである CK19 及び腸管上皮細胞に特異的発現する CDX-2 の発現を認める一方で線維形成のマーカーである  $\alpha$  SMA では検出されず、上皮由来の細胞であることを証明した。
2. SIAC 細胞ではウェスタンブロット及び細胞染色から主要なミスマッチ修復遺伝子である MLH1、MSH6 の発現消失及び MSH2 の発現低下を認めた。このうち MLH1 は、脱メチル化剤である 5-aza-2-deoxycytidine 及び脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A を用いた解析からエピジェネティックな発現制御を受けていることが判明した。また、抽出したゲノム DNA を用いたダイレクトシーケンスにより、ミスマッチ修復機構の標的遺伝子として知られる TGF  $\beta$  RII、BAX、MSH3 に heterozygous な 1 塩基欠失を、ACVR II 及び MSH6 に homozygous な 1 塩基欠失を認めた。
3. SIAC 細胞ではウェスタンブロットにより  $\beta$ -カテニンの分子量（92KDa.）とは別に 10 数 KDa. 低位置に特徴的なバンドを認め、更にルシフェラーゼ解析よりこの細胞の Wnt/ $\beta$ -カテニン経路が活性化していることを明らかにした。抽出したゲノム DNA を用いたダイレクトシーケンスにより、Exon3-4 のほぼ全域を含む 30-410b. p. 領域が heterozygous に欠失していた。タンパク合成阻害剤である cycloheximide を用いた解析では野生型に比べて欠失変異体が安定であることが示され、Wnt/ $\beta$ -カテニン経路が担う増殖シグナルの活性化に寄与している可能性が示唆された。
4. リン酸化アレイを用いた解析の結果、SIAC 細胞では EGFR、HER2、HER3 を含む EGFR ファミリーで最も強いリン酸化を認めたほか、大腸癌治療の標的因子となっている VEGFR1 についてもリン酸化が確認された。ウェスタンブロットでは EGFR、HER2、VEGFR1 でリン酸化が確認できなかった一方で、HER3 は他の大腸癌細胞株では検出されない強いリン酸化を認めた。
5. 当科でダブルバルーン内視鏡を行い小腸癌と診断された 9 症例のうち、免疫組織染色により MLH1、MSH2、MSH6 の少なくとも 1 つのミスマッチ修復タンパクに異常が生じる頻度は 55% に上り、いずれのタンパクも既報に比べて高い発現異常が認められた。

(MLH1 ; 44%, MSH2 ; 22%, MSH6 ; 33%)。また、標的遺伝子のうち TGF $\beta$  R II は 100%、MSH6 は 55% と高頻度に変異を認めたのに対し、ACVR II (11%) や BAX (22%) の変異は低頻度であった。

6. 小腸癌症例 9 症例のうち、33% に  $\beta$ -カテニンの局在異常 (細胞膜 $\rightarrow$ 細胞質)、22% に Exon3 領域を中心とした大きな遺伝子欠失を認めた。また、各腫瘍組織よりゲノム DNA を抽出して解析すると、KRAS は 33% に変異を認めたのに対し、BRAF の異常は検出できなかった。
7. SIAC 細胞を用いた細胞増殖試験及び SIAC 細胞移植マウスモデルを用いた解析では EGFR 阻害剤、HER2 阻害剤、VEGFR1 阻害剤のいずれにおいても増殖抑制効果は認められなかった。そこで、細胞増殖試験を用いて 140 種類の薬剤をスクリーニングした結果、プロアソーム阻害剤であるボルテゾミブ及び微小管重合阻害剤であるエリブリンの 2 剤に細胞増殖抑制効果が得られ、治療に有用である可能性が示唆された。

以上、本論文は小腸癌由来細胞株における解析から、小腸癌の発生病序には大腸癌では互いに排他的な発癌経路の標的分子とされているミスマッチ修復遺伝子と  $\beta$ -カテニン遺伝子の発現異常の合併が比較的多く見られることを示しただけではなく、ボルテゾミブと微エリブリンが治療に有用である可能性を初めて明らかにした。本研究はこれまで困難であった小腸癌のシグナル伝達解明及び未確立に等しかった小腸癌治療の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。