

審査の結果の要旨

氏名 荻島 樹里

本研究は卵巣癌腹膜播種において *KRAS* 活性型変異と腹膜播種の関連性を明らかにするため、マウス卵巣癌細胞株 ID8 と ID8 に *KRAS* G12V 活性型変異を導入した ID8-KRAS を用いて、足場非依存性細胞増殖およびスフェロイド形成能について評価したものであり、下記の結果を得ている。

1. ID8 と ID8-KRAS をそれぞれ 2D および 3D 培養し、生存細胞数カウントと、細胞増殖能をフローサイトメトリーで評価した結果、2D 培養では両細胞株の生存細胞数や細胞増殖能に変化が認められなかったが、3D 培養では、ID8-KRAS の生存細胞数と細胞増殖能は ID8 より有意に増加した。また、3D 培養下のスフェロイド形成を評価した結果、ID8-KRAS は鏡検下で、スフェロイドが多く形成されていたのに対し、ID8 はスフェロイド形成がほとんどみられなかった。このことより、*KRAS* 活性型変異導入に伴い、癌細胞増殖が亢進する可能性が示唆され、また、*KRAS* 活性型変異によりスフェロイド形成そのものが促進された可能性があり、足場非依存性の癌細胞増殖能亢進に寄与している可能性が示唆された。
2. マウス腹腔内に ID8 と ID8-KRAS をそれぞれ投与し、腹腔内洗浄液中の細胞増殖能も同様に变化するかどうかフローサイトメトリーで評価したところ、ID8-KRAS で ID8 よりも有意に細胞増殖能の亢進を認めた。*KRAS* 活性型変異導入により、腹腔内においても癌細胞の足場非依存性増殖が亢進する可能性が示唆された。
3. ID8 と ID8-KRAS を 2D および 3D 培養で培養した細胞から、それぞれ RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、2D 培養同士の比較では両細胞株における遺伝子発現パターンに著明な変化は認められなかったが、3D 培養同士の比較では、*KRAS* 活性型変異導入により遺伝子発現パターンが大きく変化した。3D 培養同士を比較した場合の方が、発現遺伝子の変化が大きかったことから、癌細胞が足場非依存性に増殖する際に遺伝子発現の変化が生じると考えられた。また、パスウェイ解析の結果より、細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子が、ID8 よりも ID8-KRAS で有意に発現上昇を認め、足場非依存の状態においては *KRAS* 活性型変異が導入されると細胞増殖が亢進することが、発現上昇した遺伝子からも明らかになった。2D 対 3D の比較を行うと、2D 培養下の ID8-KRAS と比較して 3D 培養下の ID8-KRAS だけで発現上昇していた上位 5 つの遺伝子は、*Tesc*、*Ifitm1*、*Spr2a2*、*Gas6*、*Dusp5* であった。そのうち *Tesc*、*Ifitm1*、*Gas6* は、RAS-RAF-MEK-ERK 経路における ERK 経路の活性化に関わる遺伝子であり、また

癌進展に関連する遺伝子であった。*KRAS* 活性型変異が足場非依存性の細胞増殖を亢進させる要因のひとつとして、ERK 経路の活性化が関わる可能性が示唆された。ERK の上流には RAF-MEK があることから、RAS 活性化により、その下流の RAF-MEK-ERK 経路が活性化し、足場非依存性細胞増殖に寄与していると考えられた。

4. MEK 阻害によって、*KRAS* 活性型変異に伴う足場非依存性の細胞増殖能が抑制されるかを評価した結果、*in vitro* で MEK 阻害薬トラメチニブを ID8-*KRAS* 培養時に添加すると、2D 培養では細胞増殖能に変化は認められなかったが、3D 培養ではトラメチニブ高濃度下でスフェロイド形成が抑制され、また濃度依存性に細胞増殖能も低下した。*In vivo* における MEK 阻害効果の評価のため、ID8-*KRAS* を投与したマウスを対照群とトラメチニブ投与群に分け、2 群の腹水産生量と生存率を比較した結果、腹水産生量はトラメチニブ群で有意に減少し、生存率も有意に改善した。*In vitro* においても *in vivo* においても、MEK 阻害によって、癌細胞の足場非依存性増殖抑制効果が認められた。また、腹腔内洗浄液中のスフェロイドは、対照群と比べて、トラメチニブ群で著明に抑制され、スフェロイド形成の抑制が腹水産生抑制と生存率の向上に寄与している可能性が示唆された。

以上、本論文はマウス卵巣癌細胞株 ID8 において、*KRAS* 活性型変異が導入されると、足場非依存性の癌細胞増殖が亢進することを明らかにした。本研究は、これまで明らかになっていない卵巣癌腹膜播種と *KRAS* 活性型変異の関連性について基礎的エビデンスを提供するものである。卵巣癌腹膜播種におけるスフェロイド形成の関与を示唆した点においても新規性が認められることから、学位の授与に値するものと考えられる。