

審査の結果の要旨

氏名 佐久間 信行

本研究は消化管癌における分泌型プロテアーゼ **KLK6** および **KLK7** の発現上昇と悪性形質との関連を明らかにする目的で、予後との関連、臨床検体を用いた発現解析、ならびに、消化管由来細胞株への **KLK6**・**KLK7** の遺伝子導入に基づく分子生物学的解析を行い、下記の結果を得ている。

1. 公共データベースを活用し、消化管癌における **KLK6**・**KLK7** の遺伝子発現と予後の関連を Kaplan-Meier 法にて解析したところ、**KLK6**・**KLK7** の発現が亢進した胃癌や大腸癌の予後は不良であった。
2. 大腸癌切除検体を用いて免疫組織染色による **KLK7** の発現解析を行ったところ、腺腫を含む粘膜内癌や粘膜下層浸潤癌において、非腫瘍部と比較して腫瘍部で有意な発現上昇が認められた。また、粘膜内癌と比べ、粘膜下層浸潤癌の腫瘍部で、発現上昇する傾向が認められた。加えて、癌浸潤の先進部で間質が染色されている検体があり、**KLK7** が浸潤に関与している可能性が示唆された。同様に **KLK6** の発現解析を行ったところ、非腫瘍部と腫瘍部に明らかな差は認められなかった。
3. レトロウイルスベクターにより **KLK6** および **KLK7** 遺伝子を導入し作成した安定発現細胞株を用いて、細胞増殖能やスクラッチアッセイによる遊走能を調べたところ、細胞増殖能や遊走能の著明な変化はみられなかった。
4. 軟寒天培地を用いた足場非依存性増殖能を調べたところ、**KLK7** 遺伝子を導入・発現させた胃癌細胞株 **IM95** では、コロニー形成能の上昇、細胞数の増加が認められた。一方、**KLK6** 遺伝子を導入・発現させると、細胞数が増加する傾向が認められたが、コロニー形成能も含めて、有意な変化は認められなかった。
5. マトリゲルインベーションアッセイにて、**KLK6**・**KLK7** の遺伝子導入による浸潤能の変化を調べたところ、**KLK6**・**KLK7** を発現させることによって、胃癌由来細胞株・大腸癌由来細胞株の浸潤能が亢進する傾向がみられた。
6. 間葉系マーカー **Vimentin** の発現を **Western blotting** と蛍光染色で調べたところ、**KLK6**・**KLK7** を安定発現させた大腸癌細胞株 **LoVo** において、発現上昇が観察された。**KLK6** や **KLK7** の発現上昇による浸潤能の亢進には、上皮間葉転換が関与していることが示唆された。
7. **KLK6** や **KLK7** を発現させた大腸癌細胞株 **LoVo** では、コントロールと比較して浮遊する細胞数が増え、その生存率も高いことが見いだされた。さらに継続培養すると、細胞凝集体を形成する傾向を認め、その一部に、癌幹細胞様の形態変化が観察され

た。そこで癌幹細胞マーカーの一つである CD44 の発現を蛍光染色で調べたところ、KLK6 や KLK7 の安定発現株では CD44 の発現が亢進していた。より詳細な解析が必要だが、KLK6 や KLK7 の発現上昇により癌幹細胞様の性質を獲得する可能性が示唆された。

以上、本論文は消化管癌において、分泌型プロテアーゼ KLK6・KLK7 の発現亢進が予後の悪化と関連すること、また、その発現上昇により足場非依存性増殖能や浸潤能が亢進すること、これらの形質転換に上皮間葉転換の関与が示唆されることを明らかにした。本研究は、消化管癌における KLK6・KLK7 の発現上昇が浸潤や転移等の悪性形質と関連することを示すもので、消化管癌における悪性度上昇の解明と、治療法の開発に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。