

論文の内容の要旨

論文題目 TSPAN8 遺伝子の発現制御解明と胃癌組織における発現解析

氏名 松本裕太

長らく我が国の癌死の主因の一つである胃癌は、内視鏡技術や外科的治療の進歩によって予後が改善しつつあるものの、切除不能進行胃癌の予後は極めて不良であり、発症頻度の高さとともに、実臨床において依然として最も重要な悪性疾患の一つである。胃癌の最大のリスク因子として *Helicobacter pylori* 感染が確立しており、その持続感染によって胃粘膜の萎縮が進行し、誤った組織分化である「腸上皮化生」が生じて、最終的に胃癌に至るといふ仮説が、現在、広く受け入れられている。腸上皮化生はしばしば「胃の前癌病変」と言われ、腸上皮化生自体、あるいは、胃癌の評価のために、腸型マーカーである MUC2・CDX2・CK20 や、胃型マーカーである MUC5AC・MUC6 の免疫染色が、しばしば行われている。

今回、我々は様々な悪性腫瘍に過剰発現することで転移や浸潤を促進すると報告されている TSPAN8 に着目した。TSPAN8 は正常組織においては腸管や膵臓に強く発現し、腸型マーカーの一つと予想される発現分布であるが、悪性腫瘍においては大腸癌や膵臓癌のみならず、胃癌・食道癌・肝臓癌・卵巣癌などにおいても発現亢進が報告されており、過剰な発現によって癌細胞の増殖及び転移に関与していると報告されている。TSPAN8 の発現は生命予後と負の相関も報告されており、胃癌においては予後予測のマーカーとなるのみならず、分子標的治療の対象ともなりうる重要なタンパクである可能性が示唆されている。既報において TSPAN8 タンパクは浸潤能・転移能との関連が報告されているが、その発現制御や過剰発現の分子機序についての報告は未だにない。我々は今回、TSPAN8 遺伝子の発現制御の解明、ならびに、胃癌組織における発現異常の意義の解明を目的に、研究を行った。

まず、各種のヒト癌由来細胞株における TSPAN8 の発現を RT-PCR で確認した。正常組織で主に腸管に発現する TSPAN8 は、大腸癌細胞株においては 90% (9/10) と高頻度の発現を認め、胃癌細胞株においても 80% (16/20) と高頻度の発現を認めた。

次いで TSPAN8 の発現制御解明のために、TSPAN8 遺伝子上流プロモーター領域に結合しうる転写因子を、転写因子結合部位予測サイト TFBIND を用いて検索した。転写開始点 (TSS) に関してはプライマーウォーク実験を行うことで信頼性を確認した後、その上流

2000bp を解析した。*TSPAN8* 遺伝子上流配列との結合が予想される複数の転写因子のうち、腸分化における必須転写因子であり、胃癌で発現増強が報告されている CDX (CDX2、CDX1) の結合予測部位が 25 ヶ所と大量に存在していることを発見した。この結果から、CDX が *TSPAN8* 発現に関与しているという仮説を立て、検証していくこととした。

CDX 発現陰性が確認された胃癌細胞株 (SH-10-TC・TMK1・MKN7) に、レトロウイルスベクターを用いて CDX2・CDX1 を過剰発現させた細胞において *TSPAN8* の発現を RT-PCR で確認したところ、遺伝子導入した細胞の全てで *TSPAN8* の転写が増強していた。また、CDX2 と CDX1 を過剰発現させた細胞の全 RNA を抽出してマイクロアレイを行ったところ、CDX2・CDX1 のいずれを導入した TMK1・MKN7 細胞においても、*TSPAN8* 遺伝子の発現増加が全遺伝子の中で最も高いことが確認された。CDX が発現制御に関与している遺伝子は数多く報告されているが、*TSPAN8* 遺伝子発現には特に強く関わっていることが明らかとなった。

次に siRNA を用いて CDX2 を knock down した SW480・LOVO 細胞を樹立し、*TSPAN8* 発現を RT-PCR で確認したところ、明らかな転写の抑制が確認された。過剰発現・knock down 実験の結果から、*TSPAN8* の発現制御において CDX が主要な役割を担っていることが確実となった。

TSPAN8 の上流プロモーター領域に認められた CDX との転写因子結合予測部位について検証するために、TSS (転写開始点) より上流の配列 (92bp、336bp、468bp、775bp、1059bp、1375bp、1748bp、1899bp) を挿入したプロモーター解析用プラスミドを様々な細胞株にトランスフェクションして、ルシフェラーゼアッセイを施行した。CDX2・*TSPAN8* を共発現している AGS・MKN45 細胞を用いた実験においては、より多くの CDX 結合配列を含むプラスミドを導入した場合に、より強いルシフェラーゼ活性が認められた。特に、775bp~1059bp 間と 1748~1899bp 間のルシフェラーゼ活性の増強は顕著であり、この領域の CDX 結合部位の重要性が示唆された。他方、CDX2・*TSPAN8* のいずれも発現していない SH-10-TC 細胞、CDX2 発現がなく *TSPAN8* のみが発現している KE-39 細胞では、TSS の上流 1899bp までの様々な上流配列を挿入したプラスミドの全てで、ルシフェラーゼ活性はほとんど認められなかった。これらの結果は、CDX が *TSPAN8* の発現において重要であることが強く支持される結果であった。一方で、CDX2 が発現しているものの *TSPAN8* の発現が認められない HGC-27 細胞を用いた実験でも、同様にルシフェラーゼ活性は殆ど認められなかった。*TSPAN8* 遺伝子上流プロモーター配列に CDX2・CDX1 が動員され、強い転写活性化を促進することが確実な一方で、これだけでは十分ではなく、転写因子 CDX をサポートする補因子の存在が示唆される結果であった。

実際の臨床検体においても、CDX と *TSPAN8* の発現に関連があるかを検証するために、早期胃癌の内視鏡的切除検体 81 症例を用いて、CDX2・CDX1・*TSPAN8* の免疫染色を行い、その染色性を評価した。正常胃粘膜では、CDX2・CDX1・*TSPAN8* はいずれも検出されなかった。一方、前癌病変とされる腸上皮化生では、腸上皮化生を認めた全 78 症例 (96.3%)

において、CDX2・CDX1・TSPAN8の発現が確認された。胃粘膜に腸上皮化生が生じる際に、ほぼ例外なくCDX2・CDX1・TSPAN8の発現が誘導されることが明らかとなった。一方、胃癌細胞における染色では、その組織型によってCDX2・CDX1・TSPAN8の発現様式が異なっていた。50%以上の癌細胞が染色性を示した場合を陽性、それ未満の場合を陰性として評価したところ、高分化型管状腺癌(tub1)では、CDX2が73.1%(38/52)、CDX1が67.3%(35/52)、TSPAN8が71.1%(37/52)と、いずれの抗体でも比較的高い染色の陽性率を示した。しかし、中分化型管状腺癌(tub2)では、CDX2が50%(7/14)、CDX1が21.4%(3/14)、TSPAN8が50%(7/14)と、染色性は低下した。未分化型の代表的な組織型である印環細胞癌(sig)では、CDX2が33.3%(2/6)、CDX1が16.7%(1/6)、TSPAN8が0%(0/6例)と、発現は大きく低下した。腸上皮化生を呈した全症例におけるTSPAN8の発現、胃癌組織型の分化度が高いほどCDX2・CDX1・TSPAN8の発現が高いという結果は、CDX2・CDX1と同様、TSPAN8が腸型マーカーであるという仮説を強く支持するものであった。なお、腸上皮化生部では100%の一致率であったが、胃癌組織においても有意な相関が認められた。CDX(CDX2・CDX1)がTSPAN8発現制御を担う主要な転写因子であることが強く支持される結果であった。

本研究の結果をまとめると、胃癌において異常発現し、その浸潤能や転移能を増強するとされるTSPAN8は、腸型マーカーとしての性質を持ち、転写因子CDX(CDX2・CDX1)によってその発現を強力に制御されていることが明らかとなった。実際の臨床検体における発現解析は、CDXによるTSPAN8の発現制御を強く支持するものであった。ただし、CDXとTSPAN8の発現は完全には合致しておらず、プロモーター解析の結果からもCDXによる転写制御を補助する別の因子の存在が示唆された。このメカニズムの解析、ならびに、CDXとTSPAN8プロモーター領域の相互作用の分子機序を解明することが、将来の目標である。