

審査の結果の要旨

氏名 松本裕太

本研究は、過剰発現することで胃癌の浸潤・転移に関与していると考えられている *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、転写制御因子 CDX と *TSPAN8* の発現に関係性について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 各種癌細胞株において RT-PCR 施行し、*TSPAN8* の胃癌細胞株における過剰発現を確認した。プライマーウォークで *TSPAN8* の転写開始点の信頼性を確認したのち、その上流配列を解析し、*TSPAN8* の転写に深く関与すると予想される転写制御因子 CDX を同定した。

2. CDX2 及び CDX1 をレトロウイルスベクターを用いて癌細胞株へと過剰発現を促し、複数の細胞株において RT-PCR で *TSPAN8* の発現の増強を認めた。過剰発現させた MKN7 胃癌細胞株の全 RNA を抽出しマイクロアレイにて解析し、*TSPAN8* 遺伝子の発現増加が全遺伝子の中でも最も高いことを確認した。次いで、siRNA を用いて CDX2 を knock down した癌細胞株 SW480・LOVO を作成し、RT-PCR で *TSPAN8* の発現を確認したところ、明らかな転写の抑制を認めた。

CDX により *TSPAN8* の発現が著明な制御を受けていることが示された。

3. *TSPAN8* の転写開始点より上流 1899bp までの 8 種類の長さの DNA 片を切り出し、Luciferase assay にてプロモーター解析を行った結果、775bp～1059bp の Luciferase 活性に著しい上昇を認めた。同時に、CDX を co-transfection した細胞株では著明な Luciferase 活性の上昇を認め、CDX が発現していない癌細胞株では Luciferase 活性を認めず、*TSPAN8* のプロモーター活性における CDX の重要性が示された。他方、CDX が発現するも *TSPAN8* が発現しない細胞株では Luciferase 活性を認めないことから、CDX 以外の補因子の存在も疑われた。

4. CDX2 強制発現癌細胞株 SW480 にクロマチン免疫沈降施行し *TSPAN8* 上流配列で PCR 施行した。CDX2 は *TSPAN8* の上流配列に直接結合し転写制御していることが示された。

5. 早期胃癌 ESD 検体に対して CDX2, CDX1, *TSPAN8* で免疫染色を行ったところ、CDX と *TSPAN8* の発現に有意な相関関係を認めた。同時に発現の不一致も存在し、やはり CDX 以外にも *TSPAN8* の発現を制御しうる補因子の存在が疑われた。

以上、本論文は胃癌細胞において過剰発現しているタンパク TSPAN8 の発現制御において、転写制御因子 CDX が直接的にその上流配列に結合してその転写活性に働いていることを示した。本研究は、胃癌の浸潤・転移に関与するタンパクの発現制御機構について解明することで、胃癌の予後予測や治療法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。