

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 中山 千恵美

本研究は、胃癌は多彩な病理像を呈するが多くの癌と同様、細胞分化における異常が生じているという仮説を検討するため、腸への分化・維持を担い、胃癌背景粘膜で高頻度に随伴する腸上皮化生にも発現する Caudal-type ホメオボックス転写因子 *CDX* を、*CDX* を発現していない胃癌細胞株へ安定導入する系で腸形質を誘導した際の変化の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. *CDX* 非発現の MKN-7 および TMK-1 の胃癌細胞株にレトロウイルスベクターを用いて *CDX2* および *CDX1* を導入したところ、両細胞株で導入 5 日後以降、伸展・平板化を伴う形態変化を生じた。また増殖試験 MTT アッセイでは、7~9 日後には *CDX* を導入した細胞で増殖が停止することがわかった。MKN-7 では著明な形態変化と完全な増殖停止を認め、TMK-1 は MKN-7 と比べると変化はやや穏やかであるものの、同様の傾向を示した。
2. *CDX2*・*CDX1* の導入後は Western blotting で確実に *CDX2*、*CDX1* 各々のタンパクの発現が確認され、また抽出した RNA における RT-PCR で、腸分化マーカーである *LI-Cadherin* や *KRT20* (*cytokeratin20*) が誘導されており、導入した *CDX2*、*CDX1* が正常に機能し、腸分化が誘導された状態であることが確認できた。MKN-7・TMK-1 に *CDX* を導入することにより、「腸への分化誘導を伴う形態変化と増殖停止」という形質転換が引き起こされることが示された。
3. MKN-7 では *CDX* 導入により活性型 caspase-3 や TUNEL 陽性となるアポトーシス細胞の割合増加はみられなかった。TMK-1 では *CDX* の導入で TUNEL 法では有意に、活性型 caspase-3 では有意ではないが若干のアポトーシス細胞の増加傾向がみられた。
4. 老化関連 (Senescence-associated) β -galactosidase 活性反応は *CDX* 導入後も陰性であり、急激な老化による増殖停止ではないことが示された。
5. フローサイトメトリーによる細胞周期解析では、*CDX* を導入した両細胞で G0-G1 期の分布が増加し、S 期が減少し、TMK-1 では G2/M 期も減少しており G0-G1 arrest が主に生じている状態であると考えられた。Western blotting による細胞周期関連タンパクの解析でも、G1→S 期のチェックポイントに関する Cyclin E2 や CDK4 の発現が、両細胞株で *CDX* を導入した細胞に共通して発現が低下しており、G0-G1 arrest として矛盾しなかった。*CDX* 非発現の MKN-7 および TMK-1 に *CDX* を導入した際に生じた形態変化と増殖停止は、分化促進により G0-G1 arrest が主に誘導され、アポトーシスも一部で伴っ

た結果であると考えられた。

6. MKN-7 を用いた網羅的遺伝子発現解析では、特に消化管幹細胞マーカーとして知られている、LGR5 と DCLK-1 の発現の上昇に注目した。CDX の導入は、腸分化マーカーの誘導を伴う腸への分化傾向を示すと同時に、癌増殖抑制の背景には腸幹細胞への reprogramming を生じている可能性も示唆していると考えた。
7. 外科的に切除された胃癌検体をランダムに 89 症例選択し、免疫染色で CDX2・CDX1 の染色性を評価した。CDX の発現が 10%未満である CDX2 陰性胃癌が 45 例 (51.7%)、CDX1 陰性胃癌が 59 例 (68.5%) に認められた。CDX2・CDX1 の発現は有意に相関し (相関係数: 0.62)、CDX2・CDX1 とともに発現しない胃癌は 40 例 (44.9%) 認められた。
8. 外科的に切除された胃癌検体の背景粘膜では CDX の発現は腸上皮化生に限られ、CDX1 はほぼ 90-100%腸上皮化生腺管粘膜に発現している一方、CDX2 は腸上皮化生の腺底部に強く発現が認められ、発現のない腸上皮化生もあった。腫瘍と背景粘膜の CDX の発現には明らかな傾向性はなかった。

以上、本論文では、CDX 陰性胃癌に CDX を導入することで、腸への分化が生じ、apoptosis を一部に、大部分においては G0-G1 arrest を誘導することで、胃癌細胞に形態変化と増殖停止をもたらすことを明らかにした。また臨床では CDX を発現していない胃癌は約半数を占めていることを示した。本研究は従来の胃癌治療とは全く異なる新たな着想から、CDX 陰性胃癌に対する CDX による分化誘導が、進行胃癌の治療へ応用できる可能性を示唆するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。