

氏名	や 八 ずみ 隅 しゅうじろう 秀二郎
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2284号
学位授与の日付	平成12年11月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Disrupted transforming growth factor- $\beta$ signaling and deregulated growth in human biliary tract cancer cells. (胆道癌細胞株における TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の異常とその意義についての検討)
論文調査委員	(主査) 教授 今村正之 教授 野田 亮 教授 千葉 勉

### 論文内容の要旨

胆道癌は膵癌と同様に著明な線維化を伴いながら浸潤増殖する傾向の強い癌である。このため、診断されたときにはすでに進行癌で切除不能例であることが少なくない。特に肝門部から肝内外胆管へ著明な線維化を伴いながら癌病巣が広がる Klatskin's tumor は治療抵抗性の胆道癌として古くから知られている。また、発生学的には胆道は膵臓と非常に近い前腸最肛門側より発生し、癌の遺伝子異常でも膵癌同様 *K-ras*, *p53*, *p16* の異常が比較的高率に報告されている。

我々は膵癌で高頻度に異常を指摘されている癌抑制遺伝子 *Smad4* を中心に TGF- $\beta$  シグナル伝達経路について胆道癌細胞株5種類 (RBE, KMBC, SK-ChA-1, Mz-ChA-1, Mz-ChA-2) を用いて検討を行った。TGF- $\beta$ -1 に対する増殖抑制試験では、RBE と Mz-ChA-2 は著明に抑制を受けたのに対し、KMBC, Mz-ChA-1, SK-ChA-1 は増殖抑制を示さなかった。次に TGF- $\beta$  に反応するヒト plasminogen activator inhibitor-1 を promoter とする luciferase reporter plasmid を細胞株5種類に安定導入し、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の異常を検討した。KMBC と Mz-ChA-1 は、TGF- $\beta$ -1 によるルシフェラーゼ活性の上昇が認められず、SK-ChA-1 は軽度上昇を示した。一方、RBE と Mz-ChA-2 では増殖抑制試験同様に TGF- $\beta$ -1 刺激に反応した。ノザンプロットでは SK-ChA-1 及び Mz-ChA-1 にて *Smad4* mRNA の発現を認めなかったが、RT-PCR では、SK-ChA-1 で *Smad4* のバンドを Mz-ChA-1 で *Smad4* と、別に二本のバンドを認めた。遺伝子解析でそれぞれ C 末端のナンセンス変異とエクソン5-6 及びエクソン4-6 の splicing variant であることが分かった。これらの splicing variant を *Smad4* が欠失している MDA-MB-468 の乳癌細胞株に遺伝子導入したところ、正常 *Smad4* と同等の TGF- $\beta$ -1 によるルシフェラーゼ活性の上昇を示し、エクソン5-6 及びエクソン4-6 の splicing variant も正常 *Smad4* 同様にシグナルを核まで伝えることが分かった。一方、正常 *Smad4* を Mz-ChA-1 及び SK-ChA-1 に遺伝子導入したところ、Mz-ChA-1 では TGF- $\beta$ -1 によるルシフェラーゼ活性の上昇が回復したが、SK-ChA-1 では回復しなかった。このことから Mz-ChA-1 では *Smad4* の発現が不十分なために、また SK-ChA-1 では *Smad4* の変異が原因でシグナルが伝わらないと判明した。また、KMBC の遺伝子解析では TGF- $\beta$  type II receptor 遺伝子に heterozygous deletion を認めた。以上のように胆道癌細胞株5株中3株に異なる TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の異常を認めた。そこでこれらの細胞株をヌードマウス皮下に移植したところ、TGF- $\beta$ -1 不応性細胞株 (KMBC, SK-ChA-1, Mz-ChA-1) では著明な線維化を伴う浸潤増殖像を示し、TGF- $\beta$ -1 反応性細胞株 (RBE, Mz-ChA-2) では内部の線維化は軽度で腫瘍周辺に皮膜様の線維化形成を認めた。in vitro の系で培養上清中の TGF- $\beta$ -1 産生量を測定したところ、TGF- $\beta$ -1 不応性細胞株ではほとんど産生していないが、TGF- $\beta$ -1 反応性細胞株では多く産生していた。以上より TGF- $\beta$ -1 反応性株では自ら TGF- $\beta$ -1 を産生することにより autocrine 作用で腫瘍周囲に線維性皮膜を形成するのに対して、TGF- $\beta$ -1 不応性細胞株は、自ら TGF- $\beta$ -1 を産生せず、また TGF- $\beta$ -1 に反応もしないため自由に浸潤増殖することが推測された。以上、胆道癌細胞において TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の異常が腫瘍の増殖と浸潤に深く関わっている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

著明な線維化を伴い増殖する胆道癌の特性を解明するため、TGF- $\beta$  シグナル伝達系路について胆道癌細胞株 5 種類 (RBE, KMBC, SK-ChA-1, Mz-ChA-1, Mz-ChA-2) を用いて検討した。TGF- $\beta$ -1 に増殖抑制を示さなかった KMBC, Mz-ChA-1, SK-ChA-1 は、TGF- $\beta$  に反応する luciferase reporter plasmid の導入実験で、TGF- $\beta$  シグナル伝達系路に異常がある事を確認した。これら TGF- $\beta$ -1 不応性細胞株の原因は、ノザンプロット、RT-PCR、遺伝子解析、遺伝子導入実験により Smad4 の変異、発現不足、及び TGF- $\beta$  type II receptor の変異のためであると判明した。これらの細胞株をヌードマウス皮下に移植したところ、TGF- $\beta$ -1 不応性細胞株では著明な線維化を伴う増殖像を示し、TGF- $\beta$ -1 反応性細胞株では腫瘍周辺に皮膜様線維化形成を認めた。培養上清中の TGF- $\beta$ -1 産生量を測定したところ、TGF- $\beta$ -1 反応性細胞株ではむしろ多く産生されており、TGF- $\beta$ -1 反応性株では自ら TGF- $\beta$ -1 を産生することにより腫瘍周囲に線維性皮膜を形成するものと考えられた。以上、胆道癌細胞において TGF- $\beta$  シグナル伝達系路の異常が腫瘍の増殖と浸潤に深く関わっている可能性が示唆された。

以上の研究は胆道癌の増殖及び線維化の解明に貢献し、消化器病学に寄与するところが多い。従って本論分は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成12年9月29日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。