

氏名	お ばま かず たか 小 濱 和 貴
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2930 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 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	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma (cDNA マイクロアレーを用いたゲノムワイドな肝内胆管癌遺伝子発現プロファイルの解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 千葉 勉 教授 杉田 昌彦 教授 野田 亮

論 文 内 容 の 要 旨

肝内胆管癌は原発性肝癌の中で二番目に多く、その罹患率は日本や欧米で増加傾向にある。肝内胆管癌に対する有効な治療は外科的切除しかなく、その他の化学療法、放射線療法などはまだ満足の行く結果を得られていない。また、診断に関しても、早期発見のための信頼できる腫瘍マーカーが存在せず、早期の診断は困難である。肝内胆管癌は予後の悪い悪性腫瘍のうちのひとつであり、そのため新たな診断・治療薬の開発が急務であると考えられる。

そこで、肝内胆管癌発癌の分子メカニズムを明らかにし、診断・治療のための新しい標的分子を同定するために、25例の肝内胆管癌標本を用いて、ゲノムワイドな cDNA マイクロアレー解析 (27,648 遺伝子) を行った。解析にあたっては、レーザーマイクロダイセクション法を採用し、純粋な腫瘍細胞・正常胆管上皮を採取することで、より正確な遺伝子発現プロファイルが得られるよう配慮した。

その結果、27,648 遺伝子の中から、腫瘍と正常上皮の発現比が5倍以上の症例が半数以上でなおかつ統計学的に腫瘍における発現上昇が有意である52 遺伝子を同定した。その中には、シグナル伝達に関わるもの (midkine など)、転写因子 (homeobox B7, forkhead box M1 など)、DNA 合成に関わるもの (topoisomerase 2A, 2B など)、抗アポトーシス分子 (survivin, *S100P* など)、血管新生 (*ECGF1*)、細胞骨格に関わるもの (anillin, *KIF2C* など)、細胞接着・運動に関わるもの (P-cadherin, citron など) があり、肝内胆管癌の発癌・進展に重要な働きをしていると考えられた。

また、発現比が0.2以下の症例が半数以上でなおかつ統計学的に腫瘍における発現低下が有意である421 遺伝子も同定した。その中には、*EGR1*, *DLC1* など、細胞増殖抑制に関わるものが含まれていた。

これらの遺伝子の中から任意に10 遺伝子を選び、定量的 RT-PCR を行ったところ、マイクロアレーの結果とよく相関しており、マイクロアレーのデータの信頼性が確認された。また、発現上昇遺伝子の中から P-cadherin と survivin を選んで臨床検体を用いた免疫組織染色を施行した所、いずれも肝内胆管癌組織で発現が高く、それに対して正常肝内胆管上皮ではほとんど発現が認められなかった。これらの遺伝子はタンパクレベルでも発現が上昇していることが示された。

次にリンパ節転移に関連する遺伝子群を同定するために、クラスター解析を行った。病理学的にリンパ節転移の有無が判明している21例 (陽性15例, 陰性6例) でランダムパーミュテーションテストを用いてクラスター解析を行い、30のリンパ節転移関連遺伝子を同定した。これらの中には、転移陽性例で有意に発現が上昇している遺伝子 *RAB27B* (Ras ファミリーのメンバー)、有意に発現の低下している遺伝子 *TIMP3* (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) などが含まれていた。*RAB27B* は Rac/Rho シグナル伝達経路に関わっており、細胞運動や浸潤を制御するとされている。また、*TIMP3* は細胞浸潤に関わる MMP の作用を阻害するとされており、それぞれ肝内胆管癌のリンパ節転移においても何らかの働きをしていることが示された。

これらのデータによって、肝内胆管癌の発癌・進展の分子メカニズムの網羅的な理解が可能になると考えられる。さらに、発現上昇遺伝子群の機能解析を進めることで、新たな診断・治療薬の開発につながる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、肝内胆管癌（ICC）の遺伝子発現プロファイルを解析し、ICC 特異的に発現が亢進している遺伝子群及びリンパ節転移に関連する遺伝子群を同定したものである。

ICC は手術以外の有効な治療法はなく、その発癌・進展に関わり、治療の分子標的の候補となる遺伝子は未解明である。そこで本申請者は、27,648遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイで、ICC 手術検体25例から採取した RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。正常組織と癌部のより正確な比較解析のために、純粋な腫瘍及び正常胆管上皮の採取が可能なレーザーマイクロダイセクション法を採用した。その結果、癌特異的発現亢進遺伝子として、*FOXM1*, *HOXB7*（転写因子）、*TOP2A*（核酸合成）、*survivin*（抗アポトーシス）、*ECGF*（血管新生）、*FSCN1*, *ANLN*（細胞骨格）、*P-cadherin*, *CIT*（細胞運動・浸潤）などを同定した。これらの結果は定量的 RT-PCR や免疫染色で再確認された。また症例をリンパ節転移陽性例と陰性例に分けてランダムパーミュテーションを行い、リンパ節転移関連遺伝子として *TIMP3*, *RAB27B* などを同定した。

以上の研究は、ICC の遺伝子発現情報を網羅的に解析し、癌関連遺伝子やリンパ節転移関連遺伝子を解明したものであり、ICC に対する新たな治療標的分子の同定及び治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与者は、平成17年11月18日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。