

氏 名	くさ かり たか し 草 刈 孝 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2815 号
学位授与の日付	平成 17 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	<i>C-erbB-2</i> or mutant <i>Ha-ras</i> induced malignant transformation of immortalized human ovarian surface epithelial cells <i>in vitro</i> (<i>C-erbB-2</i> または変異 <i>Ha-ras</i> 遺伝子は <i>in vitro</i> で不死化したヒト卵巣上皮細胞の悪性転化を誘導する)
論文調査委員	(主 査) 教授 小川 修 教授 和田 洋 巳 教授 下遠野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

卵巣癌は大半が進行期に診断されるため、手術療法や化学療法を積極的に行っても、いまだ予後不良な疾患の一つである。卵巣癌は化学療法に対して開始直後には反応するが、反復する治療により耐性が発現することが問題である。そこで、病態に基づいた新しい治療法の開発が望まれている。卵巣癌の発生過程には未だに不明な部分が多く、この過程を解明するためには、適切な発生過程のモデルの確立は有用と思われる。本研究では、上皮性卵巣癌の発生母地と考えられているヒト卵巣上皮細胞 (OSE) の初代培養細胞に卵巣癌で高頻度に異常が報告されている遺伝子を導入することで、不死化、さらには癌化する過程を解析しうる系の確立を試みた。

患者の同意を得て採取した OSE に SV40 largeT 抗原 (LT) およびヒトテロメラーゼサブユニット (hTERT) をリポフェクション法にて導入後、さらに *c-erbB2* または変異 *Ha-ras* 遺伝子のいずれかを同法にて導入した。OSE への LT, *c-erbB2*, 変異 *Ha-ras* 遺伝子の導入についてはウエスタンブロット法にて、hTERT 遺伝子導入については RT-PCR 法および stretch PCR 法でそれぞれ確認された。

OSE に LT 抗原および hTERT を遺伝子導入した結果、population doubling level (PDL) は 100 以上となり、非導入群に比べ有意な life span 延長が認められ不死化したと考えられた。

この不死化細胞に、さらに *c-erbB2* または変異 *Ha-ras* 遺伝子を導入すると、軟寒天培地でのコロニー形成数は有意に増加し、*c-erbB2* または変異 *Ha-ras* 遺伝子導入により OSE の足場非依存性の細胞増殖能が増強したことが示された。LT 抗原および hTERT 遺伝子導入により確立された不死化細胞をヌードマウスに皮下移植しても腫瘍形成はみられなかったが、この不死化細胞に *c-erbB2* または変異 *Ha-ras* 遺伝子を導入した細胞はヌードマウスへの皮下移植により各々 50%、40% の割合で腫瘍形成が認められ、悪性転化が確認された。腫瘍組織は形態学的には未分化癌の形態を示したが、免疫組織化学的に調べた結果はいずれもサイトケラチン陽性であったことから上皮性腫瘍と考えられた。

また、*c-erbB2* または変異 *Ha-ras* の遺伝子導入により悪性転化した細胞群では *c-erbB2* または変異 *Ha-ras* を導入していない不死化細胞と比較して血清除去によっておこるアポトーシスの割合は有意に減少し、低酸素下での培養によって VEGF 分泌が亢進する傾向が認められた。

LT 抗原および hTERT 遺伝子導入により確立されたヒト OSE の不死化細胞に *c-erbB2* あるいは変異 *Ha-ras* 遺伝子を導入して、癌化が確認されたことより、卵巣癌で高頻度に異常が報告されている *c-erbB2* あるいは *ras* の異常が癌化過程に関与することが示唆された。また、この過程にアポトーシス抵抗性の獲得と血管新生の亢進が関与している可能性が示唆された。さらに本研究で確立された不死化細胞株および卵巣癌細胞株は、両者の発現遺伝子の差異の検討等により、今後卵巣癌発癌過程の解明に寄与することが期待しうると考えている。

論文審査の結果の要旨

卵巣癌は予後不良な疾患の一つであり、新たな治療法の開発が望まれている。卵巣癌の発生過程には不明な部分が多く、発生過程のモデルの確立は有用と思われる。本研究では、上皮性卵巣癌の発生母地と考えられているヒト卵巣上皮細胞 (OSE) の初代培養系に卵巣癌で高頻度に異常が報告されている遺伝子を導入して、癌化を誘導し、さらに、その癌化過程の解析を試みた。

患者の同意を得て採取した OSE に SV40 large T 抗原 (LT) およびヒトテロメラーゼサブユニット (hTERT) をリポフェクション法にて導入後、さらに c-erbB2 または変異 Ha-ras のいずれかを同法にて導入した。OSE への LT, c-erbB2, 変異 Ha-ras の導入については Western blotting 法にて、hTERT 導入については RT-PCR 法および stretch PCR 法でそれぞれ確認された。

OSE に LT 抗原および hTERT を遺伝子導入した結果、細胞は不死化した。

この不死化細胞に、さらに c-erbB2 または変異 Ha-ras 遺伝子を導入すると、足場非依存性の細胞増殖能が増強し、ヌードマウスへの皮下移植により腫瘍形成が認められ、悪性転化が確認された。

また、c-erbB2 または変異 Ha-ras 遺伝子を導入した細胞群では c-erbB2 または変異 Ha-ras を導入していない不死化細胞と比較して血清除去によっておこるアポトーシスの割合は有意に減少し、低酸素下での培養で VEGF 分泌が亢進する傾向が認められた。

以上の結果より、c-erbB2 あるいは ras の異常が OSE の癌化に関与しうることを初めて *in vitro* で証明し、この過程にアポトーシス抵抗性の獲得と血管新生の亢進が関与している可能性が示唆された。

以上の研究は、将来的に新たな卵巣癌治療法の開発に寄与しうる、卵巣癌発生過程の解明に貢献するところが多い。

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、本学位授与申請者は平成17年1月20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。