

京都大学	博士（医学）	氏 名	塩 せいじ
論文題目	Loss of RUNX3 expression by histone deacethylation is associated with biliary tract carcinogenesis (ヒストン脱アセチル化による RUNX3 の発現低下が胆道癌形成に關与する)		
(論文内容の要旨)			
胆道癌は近年増加傾向にある。しかし診断時には唯一の治療法である手術療法が不可能な症例が多いことに加え、有効な化学療法も確立されておらず、依然予後不良な疾患である。RUNX3 遺伝子は 1p36 に位置し、TGF-β シグナルの構成因子をコードする癌抑制遺伝子であり、胃癌をはじめとする様々な癌において、ヘテロ接合性消失、DNA メチル化、あるいはヒストンアセチル化などの異常による不活性化が報告されている。胆道癌においても多くの細胞株で RUNX3 の発現が低下していることが報告されているが、その調節機構については未だ不明な点が多い。本研究は、ヒト胆道癌における RUNX3 の発現とその制御におけるヒストンアセチル化の関与を明らかにすることを目的とする。 外科的切除を施行された 17 例のヒト胆道癌症例を対象とし、癌部および非癌部における RUNX3 蛋白の発現を、免疫組織化学染色により検討した。結果、RUNX3 は非癌部の正常組織において胆管上皮のみに発現していることが確認された。一方癌部では、17 例中 13 例において正常胆管上皮と比較して RUNX3 の発現低下が認められた。次に癌部と非癌部における RUNX3 のヒストンアセチル化状態を ChIP PCR で調べたところ、解析可能であった 3 例中 2 例において、癌部におけるヒストンの低アセチル化が認められた。これらの結果により、胆道癌における RUNX3 の発現低下にヒストン脱アセチル化が関与している可能性が考えられた。 次に、RUNX3 の発現低下が確認されている胆管癌細胞株 Mz-ChA-2 細胞を用い、ヒストンアセチル化状態と RUNX3 発現の関連について in vitro の検討を行なった。結果、ヒストンアセチル化は低下状態にあることが明らかとなり、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である vorinostat の投与によりヒストンのアセチル化誘導を行なったところ、mRNA および蛋白レベルでの RUNX3 の発現回復が確認された。これらの結果より、胆道癌における RUNX3 発現抑制にはヒストン脱アセチル化が関与していることが裏付けられた。 次に、ヒストンのアセチル化による RUNX3 発現回復が TGF-β シグナル伝達に与える影響について検討した。vorinostat 存在下あるいは非存在下に Mz-ChA-2 細胞を TGF-β で刺激したところ、vorinostat 存在下では有意に TGF-β シグナル伝達が増強されることが、下流遺伝子 p21 の発現、あるいはレポーターアッセイにより確認された。さらにこの増強は、SiRNA による RUNX3 遺伝子のノックダウンにより部分的に抑制された。これらの結果により、Mz-ChA-2 細胞においてヒストンのアセチル化が RUNX3 の発現回復依存性に TGF-β シグナルを活性化することが示唆された。 最後に、vorinostat による RUNX3 の発現誘導を介した TGF-β シグナルの活性化が胆道癌の増殖に与える影響について検討を行なった。結果、MzChA-2 細胞において、vorinostat は TGF-β の細胞増殖抑制を有意に増強することが明らかとなった。また vorinostat と TGF-β は強力に p21 を誘導することにより、臨床において胆道癌治療に用いられている抗腫瘍薬 5FU の細胞増殖抑制効果をさらに増強することが確認された。 以上の結果より、ヒストン脱アセチル化による RUNX3 の発現低下が胆道癌の形成に深く関与しているものと考えられた。また RUNX3 の発現回復を介した増殖抑制効果により、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が今後の胆道癌治療に有用となる可能性が示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） 胆道癌は未だ有効な治療法が無く予後不良な疾患である。TGF-β シグナルの構成因子をコードする <i>RUNX3</i> 遺伝子は、1p36 に位置する癌抑制遺伝子であり様々な癌において不活性化が報告されている。本研究の目的はヒト胆道癌における RUNX3 の発現とその制御におけるヒストンアセチル化の関与を明らかにすることである。 RUNX3 蛋白はヒト正常胆管上皮に発現が認められたが、ヒト胆道癌組織ではその発現が低下していた。また、ヒト胆道癌組織では非癌部と比較して <i>RUNX3</i> 遺伝子のヒストンアセチル化が低下していた。さらに、RUNX3 の発現が低下している胆管癌細胞株にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を投与したところ、ヒストンのアセチル化に伴い RUNX3 の発現回復が認められた。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与は胆管癌細胞株において、RUNX3 の発現回復依存性に TGF-β シグナル伝達を増強し、TGF-β シグナルの下流分子 p21 の発現を介する細胞増殖抑制効果を誘導した。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、TGF-β 存在下において抗腫瘍薬 5FU の効果も増強した。 以上の結果より、ヒストン脱アセチル化による RUNX3 の発現低下が胆道癌の形成に深く関与していると考えられた。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による RUNX3 の発現回復を介した増殖抑制作用が、今後の胆道癌治療に有用となる可能性が示唆された。 以上の研究は RUNX3 発現低下の解明に貢献し、癌抑制遺伝子の研究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、本学位授与申請者は、平成 23 年 6 月 28 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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			