

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	杉山 祥晃
<p>学位論文題目</p> <p>The paracrine effect of hedgehog occurs at later stage on pancreatic tumorigenesis. (Hedgehogのパラクライン作用は膵腫瘍形成の後期段階で起こる)</p> <p>共著者名 水上裕輔、高後 裕</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>膵癌 (Pancreatic ductal adenocarcinoma ; 以下PDAC) は予後が不良な疾患で、その早期診断と新たな治療法の開発が望まれている。PDACには、前癌病変であるPancreatic intraductal neoplasia (以下PanIN) や膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm ; 以下IPMN) から進展するタイプがあり、膵発癌を解明する良いモデルとなる。膵癌では、胎生期の器官形成を担うmorphogenであるHedgehog (以下Hh) が、腫瘍細胞自身から産生され腫瘍細胞自身に働くオートクライン作用と、間質の主に骨髄由来のpro-angiogenic cellのHhシグナル経路の活性化を介して腫瘍血管の安定化を引き起こすパラクライン作用があり、とくに後者のパラクライン作用の重要性を、我々は示してきたが、膵発癌のどの時期で関与するか不明であった。</p> <p>本研究では、変異型Kras導入とp53欠失の遺伝子改変膵癌自然発症マウスおよびヒト膵腫瘍手術材料検体を用い、膵癌の前癌病変および癌病変におけるHhシグナル経路を検討し、膵発癌におけるHhシグナルの変化とその意義について明らかにすることとした。</p>			

材 料・方 法

1. 動物実験モデル

Cre-LoxPシステムを用いて、膵管発生に必須のPdx1遺伝子プロモーターの制御下に、膵特異的に変異型Kras発現とp53欠失を誘導する遺伝子改変マウスを用いた (1)。

2. ヒト手術材料検体

当院外科で切除された膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 5例と膵癌 (PDAC) 5例の検体を使用した。

3. 免疫組織染色

Hh経路の転写因子であるGli1とGli2、Hh経路のnegative regulatorであるHedgehog interacting protein (以下Hip) に対する各々の市販特異抗体を用いた。

4. マウス腫瘍腺管の分離と定量的リアルタイムRT-PCR

遺伝子改変マウスから膵を摘出・細切、コラゲナーゼ処理後、幹細胞用培地 (StemPro hESC medium) で24時間培養し、腫瘍腺管を分離した (2)。分離した腫瘍腺管を用い、Sonic hedgehog (以下Shh), Indian hedgehog (以下Ihh) とHhの輸送担体であるDispathed1 (以下Displ) およびHhの抑制因子であるExt1, Hipに対する特異的プローブを用い、定量的RT-PCRを行った。

成 績

1. 遺伝子改変マウスに発生した膵腫瘍の分子病理学的検討

部位特異的に変異型Krasを導入したマウスではPanINが、変異型Kras導入とp53欠失を起こしたマウスではPDACが形成された。Shhの発現は、PanIN、PDACの腫瘍腺管で共に認められた。一方、Gli1, Gli2の発現は、PanIN、PDAC由来腫瘍腺管の両方で認められ、間質ではPDACのみでその発現がみられ、PanINではみられなかった。

2. 遺伝子改変マウス膵腫瘍から分離した腫瘍腺管の遺伝子発現に関する検討

PanIN, PDACから分離した腫瘍腺管のHh関連遺伝子発現を定量的RT-PCRで評価した。Shh, Ihh, Displ, Ext1 mRNAの発現は、PanIN, PDAC腫瘍腺管の間で、明らかな差は認めなかったが、Hip mRNAの発現はPanINに比べてPDACで著明に低下していた。さらに免疫組織学的にHip蛋白の発現を評価したところ、PanINでのみ認められ、PDACでは認めなかった。PanINではHipを介したHhシグナルに対する抑制が存在し、PDACではその抑制が消失していると考えられた。

3. ヒト膵癌、IPMNの手術材料での検討

ヒトPDACと前癌病変としてのIPMNで、Gli1, Gli2, Hipの発現を免疫染色で評価した。マウスと同様にGli1, Gli2の発現は、腫瘍腺管ではPDAC、IPMNの両者に、間質ではPDACのみであった。Hipの発現は、IPMNで認められ、PDACでは認められなかった。

考 案

本研究によって、マウス・ヒトともに前癌病変ではHh経路の転写因子であるGli1, Gli2の発現が、腫瘍腺管で認められ、Hhのオートクライン作用が主体であるのに対し、PDACでは腫瘍腺管に加えて間質にも認められ、Hhのパラクライン作用が見られることが示された。

分離したマウス腫瘍腺管のHh関連遺伝子発現を定量的RT-PCRで評価したところ、Hip mRNAの発現がPDACで著明に低下していた。更に、免疫染色によりHh経路のnegative regulatorであるHipの蛋白発現は前癌病変であるPanINでのみ認められ、PDACではその発現は著明に抑制されていることが示された。すなわち、膵発癌の早期段階ではHipによりHhのパラクライン作用が抑制され、後期段階ではHipによる抑制が消失しHhのパラクライン作用が誘導されたと考えられる。

本研究の結果は、これまでにHipの低下がいくつかのがん細胞で見られるとする報告を支持するとともに、とくに進行膵癌では、間質誘導と悪性化が著明であるとする事実にも、新たな説明を与えるものである。今後Hipの抑制機構を更に解明することで、膵癌に対する新規分子標的治療に繋がると考えられる。

結 論

膵発癌過程の後期段階で、Hhのパラクライン作用が、Hipによる抑制が消失することによって誘導されることを明らかにした。




引用文献

1. Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, *et al.* Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *PNAS* 2006; 103: 5947-52
2. Kondo J, Endo H, Okuyama H, *et al.* Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *PNAS* 2011; 108: 6235-6240

参考文献

1. Yamazaki M, Nakamura K, Mizukami Y, Ii M, Sasajima J, Sugiyama Y, *et al.* Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci* 2008; 99: 1131-8.
2. Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y, Sugiyama Y, *et al.* Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS One* 2010; 5: e8824

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	杉山 祥晃
<p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 古川 博之 </p> <p>審査委員 高後 裕 </p>			
学位論文題目			
The paracrine effect of hedgehog occurs at later stage on paracrine tumorigenesis (Hedgehog のパラクライン作用は腭腫瘍形成の後期段階で起こる)			
<p>腭腫は現在でもきわめて予後が悪い疾患であり、新たな治療の開発が望まれている。そのためには腭腫発生メカニズムをより詳細に知ることが不可欠である。胎生期の器官形成に重要な役割を担う Hedgehog (Hh)が腭腫細胞により産生されることが知られている。Hh は腭腫細胞自身にオートクライン的に作用し、増殖を促進していると考えられている。しかし、Hh の腭間質細胞に対するパラクライン作用も重要であり、申請者らは腭腫細胞由来の Hh が骨髄由来の腭間質細胞に働き、腫瘍血管の安定化を引き起こすことを示してきた。しかし、このパラクライン作用が腭発癌において、早期（前癌病変）、後期（癌病変）のいずれで活性化しているのかは不明であった。</p> <p>本研究で申請者らは、遺伝子改変マウスを用いた腭前癌病変発症モデル、腭腫発症モデルマウスにおいて、Hedgehog (sonic hedgehog)、Hedgehog 経路の転写因子 (Gli1, Gli2)、Hedgehog 経路の抑制因子 (Hip) の発現を比較検討した。その結果、前癌病変、癌病変いずれでも Hedgehog 経路が活性化されるが、Gli1 や Gli2 の腭間質細胞での発現は癌病変のみで起こることが明らかになった。一方、Hip は前癌病変で発現するが、癌</p>			

癌病変では消失していた。ヒトの膵前癌病変（IPMN）と膵癌での検討でもマウスと同様の結果が得られた。以上より、Hedgehog の間質細胞へのパラクリン作用は前癌病変ではなく、癌病変で重要な役割を担っていることが明らかになり、そのメカニズムとして癌における Hip 発現低下が関与していることが示唆された。

本研究は、膵発癌における間質誘導と腫瘍血管の形成についての新しい知見と興味深い仮説を提示したものであり、高く評価できる。今後、膵発癌の後期における Hip 発現抑制機構が解明されれば、新たな膵癌治療法の開発につながる可能性がある。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者自身の着想と努力の結果であり、学術的にも十分に貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。