

氏名・(本籍)	辻 正博(秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第875号
学位授与の日付	平成27年3月22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	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Agr2 Mediates Paracrine Effects on Stromal Fibroblasts That Promote Invasion by Gastric Signet-Ring Carcinoma Cells (Agr2は間質線維芽細胞が胃印鑑細胞癌の細胞浸潤を促進させる際の傍分泌 作用を仲介する)
論文審査委員	(主査) 教授 大森 泰文 (副査) 教授 山本 雄造 教授 羽瀨 友則

学 位 論 文 内 容 要 旨

Agr2 Mediates Paracrine Effects on Stromal Fibroblasts That Promote Invasion by Gastric Signet-Ring Carcinoma Cells

(癌細胞が間質線維芽細胞に及ぼす Agr2 のパラクライン効果は、胃印環細胞癌の浸潤を促進する)

申請者氏名 辻 正博

研 究 目 的

胃癌の約 15%を占める印環細胞癌(SRCC)は周囲の間質線維芽細胞がその浸潤能に影響を与えていると言われている。

Agr2 は小胞体タンパクジスルフィドイソメラーゼの 1 種であり、タンパク質の折り畳みの制御や小胞体ストレスに対しての抵抗性に働いている。今回、我々は Agr2 が SRCC において高発現している点に注目した。Agr2 は通常小胞体に局在しているものの、癌患者では尿中および血清に検出される。しかし、そのような細胞外での Agr2 の役割はよくわかっていない。

本研究は SRCC と間質線維芽細胞を中心に Agr2 の機能を解析し、癌細胞が分泌する Agr2 が周辺の間質線維芽細胞の浸潤能を活性化するパラクライン効果を示し、Agr2 が癌細胞による間質細胞の教育的分子として働く事を示唆するものである。

研 究 方 法

・腫瘍の胃から採取した癌関連線維芽細胞 (CAF) と非腫瘍部の胃壁から採取した正常線維芽細胞 (NF) を用いた。

・種々の胃癌細胞株、またそれらに Agr2miRNA を安定発現させノックダウンさせた株、またそれらに miRNA 不応性 Agr2 を再導入した add-back 株を作成した。それらの細胞増殖能、および酸化、低酸素ストレスに対する耐性などを解析した。

・癌細胞株と NF をそれぞれ蛍光標識し、コラーゲン、ラミニンなどの細胞外基質を含んだゲルへの浸潤能を三次元的に解析した。

・in vivo でヌードマウスの胃壁に SRCC および NF を移植し、SRCC における Agr2 の発現変化によって癌細胞と線維芽細胞の胃壁内の浸潤範囲がどう変化するかをそれぞれ比較した。

・臨床検体を用いて Agr2 の発現とステージ分類や予後、転移などとの関連を統計学的手法を用いて解析した。

研 究 成 績

・Agr2 は SRCC で発現が高い。

臨床検体を用いた解析ではステージが高いほど、またリンパ節浸潤や血管浸潤の度合いが高いほど Agr2 の発現が強かった。

・Agr2 は SRCC の細胞増殖、および酸化ストレスに対する抵抗性を促進させる。

2 つの SRCC 細胞株で Agr2 の発現が落ちると細胞増殖能が低下した。また酸化、および低酸素ストレスに対しても Agr2 低発現株では抵抗性が落ち、Agr2 が増加すると抵抗性を高めた。

・Agr2 は SRCC から分泌され、線維芽細胞と協調的な動きをとる。

2 つの SRCC 細胞株を培養した培地に Agr2 が検出され、細胞外に分泌していることが分かった。

3D イメージを用いた蛍光免疫染色にて Agr2 は癌細胞周囲の線維芽細胞内に取り込まれていた。

・細胞外の Agr2 は間質線維芽細胞を活性化し、線維芽細胞と癌細胞の協同した浸潤を促す。

Gel invasion assay において Agr2 を発現する SRCC と線維芽細胞を共培養した場合に SRCC、NF 双方の浸潤能が上昇した。この SRCC と NF の共培養による浸潤促進は、SRCC の Agr2 の発現に依存していた。

・In vivo における胃印環細胞癌と線維芽細胞の協調的浸潤への効果

SRCC と NF を胃壁に共注入すると、SRCC の Agr2 をノックダウンする事で癌細胞と線維芽細胞双方の浸潤範囲が著名に抑制されることが示された。Agr2 は SRCC の増殖促進作用も有していたため、

浸潤に対する評価をより明確にする目的で、Agr2 を過剰発現させても細胞増殖に影響を受けなかった MKN-74 胃癌細胞株を別に用いて検証した。その結果、MKN-74 細胞での Agr2 過剰発現は NF と癌細胞双方の浸潤面積を増大させた。また、Agr2 過剰発現 MKN-74 単独の注入と比較しても、線維芽細胞との供注入により、癌細胞の浸潤面積が拡大した。

結 論

スキルス癌にしばしば存在する印環細胞癌(SRCC)からの Agr2 分泌が線維芽細胞を刺激することで癌の微小環境を形成する事が示唆された。また、Agr2 発現株と線維芽細胞は共同して浸潤し、in vivo でも線維芽細胞の浸潤能の上昇は癌細胞の浸潤に必須であると考えられた。Agr2 は癌の微小環境において治療のターゲット分子となりえるかもしれない。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 大森 泰文
申請者： 辻 正博

論文題名：Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells（癌細胞が間質線維芽細胞に及ぼす Agr2 のパラクライン効果は、胃印環細胞癌の浸潤を促進する）

要旨

小胞体(ER)ストレスに対する適応応答に関与する Agr2 タンパクが、様々ながん組織で高発現するという報告がなされている。著者は始めにヒト胃印環細胞癌(SRCC)の臨床検体 30 例を解析し、SRCC の深達度と脈管侵襲の頻度が Agr2 の発現量と相関することを見出した。次いで、Agr2 を発現する SRCC 由来の細胞株に、Agr2 mRNA に対応する microRNA を強制発現させ、Agr2 がこれらの細胞株の増殖を促進させるとともに、低酸素ストレスや酸化ストレスに対する抵抗性を高めることを明らかにした。さらに、Agr2 が ER タンパクとしてのみならず、SRCC 細胞から分泌されていることを見出し、SRCC 細胞由来の Agr2 タンパクが、周囲の正常線維芽細胞(NF)の細胞質に取り込まれることで、NF の細胞外基質に対する浸潤が誘導され、浸潤する NF に導かれるように SRCC 細胞の浸潤が進行することを示した。この研究により、SRCC から分泌される Agr2 が周囲の NF を「教育」し、SRCC が浸潤しやすい環境を作り出すことが明らかとなった。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

ER にのみ局在すると考えられてきた Agr2 が、がん細胞から分泌タンパクとして産

生されることを初めて証明した論文であり、その斬新さは際立っている。また従来より、がん細胞と周囲の NF との相互作用、特にがん細胞による NF から癌関連線維芽細胞(CAF)への「教育」が、がん細胞の増殖や浸潤、転移に重要であることは知られていたが、Agr2 がその「教育」を担う分子であることは全く新しい知見である。

2) 重要性

がん細胞が周囲の NF と相互作用し、NF を CAF 化する分子機構の一端を明らかにした点は極めて重要な発見といえる。また、これを担う Agr2 が SRCC から分泌されるタンパクであることから、NF の CAF 化や SRCC の進展を抑制する戦略として、Agr2 が新たな標的分子となる可能性を提唱した点は、「cancer control」を目指す上で重要な指針となるであろう。

3) 研究方法の正確性

すべての SRCC 検体は病理組織学的に確定されたものである。また、各種実験で使用された SRCC 細胞株は、異なる複数の株を使用しており、結果の普遍性が担保されている。実験手法は緻密に計画されており、確立された定法に従った実験となっている。*in vitro* と *in vivo* の実験結果に矛盾はなく、導かれた結論に無理はない。データの統計学的解析やその解釈も正しく行われており、信頼性の高い結果となっている。

4) 表現の明瞭さ

研究の背景と目的、研究方法、実験結果の記載と図表の提示方法は明瞭で理解しやすい。また、考察も論理的に組み立てられているとともに、文章も丁寧かつ明解な表現となっている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。