

氏 名 ・ (本籍)	工藤 智司 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 904 号
学位授与の日付	平成 28 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	C-reactive protein inhibits expression of N-cadherin and ZEB-1 in murine colon adenocarcinoma (マウス大腸癌における N-cadherin および ZEB-1 に対する CRP の抑制効果)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 明輝 (副査) 教授 高橋 勉 教授 田中 正光

学位（博士一甲）論文内容要旨

C-reactive protein inhibits expression of N-cadherin and ZEB-1 in murine colon adenocarcinoma (マウス大腸癌におけるN-cadherinおよびZEB-1に対するCRPの抑制効果)

申請者氏名 工藤 智司

研究目的

癌の再発は局所再発だけでなく、その多くは遠隔転移で発見され、患者の予後に大きく影響する。転移には多くの段階があるが、上皮系細胞が間葉系細胞へと変化し遊走能を得ること(上皮間葉転換)で、転移し易くなることが近年明らかになってきた。そのことより上皮間葉転換を制御し、遠隔転移を抑制することが、良好な予後に寄与すると考えられる。

我々はこれまで、CRP投与がマウスの食道癌におけるリンパ節転移抑制効果や遊走能抑制効果に関与することを発表してきた。本研究ではCRPが、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を抑制すると仮説を立て実験を行った。

研究方法

マウス大腸癌細胞株(MCA-38)を、CRP 50 μ g/mlを加えた群とコントロール群に分けWound healing assayを用いて遊走能を比較した。また、C57BL/6Jマウスの背部皮下にMCA-38を移植し、recombinant CRP 1 μ gを皮下注射する群(CRP群)とPBSを投与する群(コントロール群)に分け、3日おきに計9回の投与を行い、腫瘍を摘出した後、腫瘍体積・腫瘍重量を計測した。さらに、EMTに関与する間葉系細胞のマーカー(N-cadherin, E-cadherin)や、シグナル(Snail, SLUG, TWIST, ZEB-1)に関して real time PCR法で

mRNAの発現を、Western blotting(以下WB)・免疫組織化学染色で蛋白の発現に関して検討した。

研究成績

Wound healing assayでの比較では、CRPを投与した培地において4時間後、12時間後で細胞が存在しない面積が有意に広く、CRP群で遊走能が抑制されることを確認した。また、マウスを用いた研究では、腫瘍体積と腫瘍重量においてCRP群とコントロール群の間に有意差は認められなかった。EMTにおける転写因子のreal time PCRでは、CRP群でZEB-1 mRNAの発現が有意に抑制されていたが($p < 0.05$)、他の転写因子では有意差は認められなかった。WB・免疫組織化学染色でもCRP群でZEB-1発現抑制が認められた。

EMTのマーカーにおけるreal time PCRでは、CRP群でN-cadherinの発現が有意に抑制されていた($p < 0.05$)。また、WB・免疫組織化学染色でもCRP群でN-cadherin発現抑制が認められた。

結論

E-cadherinの発現低下によりEMTが促進するといわれている一方で、膀胱癌や乳癌の転移や遊走能が亢進している細胞株においては、E-cadherinの発現抑制を伴わず、N-cadherinの発現増強のみ認められたとの報告もある。このことから、癌種によってEMTのバイオマーカーは異なるとも考えられる。

本研究ではCRP投与により、ZEB-1とN-cadherinの発現を抑制した。このことから、CRP投与によりZEB-1を抑制することでEMTを抑制する可能性が示唆された。

学位（博士・甲）論文審査結果の要旨

主 査：後藤 明輝

申請者：工藤 智司

論文題名：C-reactive protein inhibits expression of N-cadherin and ZEB-1 in murine colon adenocarcinoma

（C-reactive protein 投与による N-cadherin および ZEB-1 発現の抑制効果）

要旨

癌の再発は局所再発だけでなく、その多くは遠隔転移で発見され、患者の予後に大きく影響する。転移には多くの段階があるが、上皮系細胞が間葉系細胞へと変化し遊走能を得ること(上皮間葉転換)で転移し易くなることが近年明らかになってきた。そのことより上皮間葉転換を制御し、遠隔転移を抑制することが、良好な予後に寄与すると考えられる。

申請者らはこれまで、CRP投与がマウスの食道癌におけるリンパ節転移抑制効果や遊走能抑制効果に関与することを発表してきた。本研究ではCRPが、上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)を抑制すると仮説を立て実験を行っている。

マウス大腸癌細胞株(MCA-38)を、CRP 50 μ g/ml を加えた群とコントロール群に分け Wound healing assay を用いて遊走能を比較した。また、C57BL/6J マウスの背部皮下に MCA-38 を移植し、recombinant CRP 1 μ g を皮下注射する群(CRP 群)と PBS を投与する群(コントロール群)に分け、3日おきに計9回の投与を行い、腫瘍を摘出した後、腫瘍体積・腫瘍重量を計測した。さらに、EMTに関与する間葉系細胞のマーカー(N-cadherin, E-cadherin)や、シグナル(Snail, SLUG, TWIST, ZEB-1)に関して real time PCR 法で mRNA の発現を、Western blotting(以下 WB)・免疫組織化学染色で蛋白の発現に関して検討している。

Wound healing assayでの比較では、CRPを投入した培地において4時間後、12時間後で細胞が存在しない面積が有意に広く、CRP群で遊走能が抑制されることを確認した(4時間後 $p < 0.05$, 12時間後 $p < 0.01$)。また、マウスを用いた研究では、腫瘍体積と腫瘍重量においてCRP群とコントロール群の間に有意差は認められなかった。EMTにおける転写因子のreal time PCRでは、CRP群でZEB-1 mRNAの発現が有意に抑制されていたが($p < 0.05$)、他の転写因子では有意差は認められなかった。WB・免疫組織化学染色でもCRP群でZEB-1発現抑制が認められた。

EMTのマーカーにおけるreal time PCRでは、CRP群でN-cadherinの発現が有意に抑制されていた($p < 0.05$)。また、WB・免疫組織化学染色でもCRP群でN-cadherin発現抑制が認められた。

E-cadherinの発現低下によりEMTが促進するといわれている一方で、膀胱癌や乳癌の転移や遊走能が亢進している細胞株においては、E-cadherinの発現抑制を伴わず、N-cadherinの発現増強のみ認められたとの報告もある。このことから、癌種によってEMTのバイオマーカーは異なるとも考えられる。

本研究ではCRP投与により、ZEB-1とN-cadherinの発現を抑制した。このことから、CRP投与により

ZEB-1を抑制することでEMTを抑制する可能性が示唆されている。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1)斬新さ

EMTに関する研究の報告は多々あるが、CRPによるEMTの抑制に関する論文は少なく、CRPによるEMTを促進する転写因子の抑制を検討した論文は本論文が初めてである。その意味できわめて斬新な論文であると言える。

2)重要性

多くの癌において遠隔転移の割合は局所転移と比較して多く、転移の抑制は良好な予後に寄与すると考えられる。本研究はCRP投与が新たな術後補助化学療法になる可能性があり、臨床につながる研究としても重要である。

3)研究方法の正確性

mRNA測定はreal time RT-PCRを用いて行われ、Western blottingと免疫組織化学染色を用いて蛋白発現との相関性を検討するなど、研究手法は正確に行われている。また統計手法も妥当であり、正確性が高い研究と考えられる。

4)表現の明瞭さ

論文は論理的であり、表現も明瞭である。英文に関しても問題ない。

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。