

Survivin は癌治療において重要な分子標的であるために、survivin の発現を調節する様々なメカニズムを反映して多くの治療法が開発されてきた。YM155 は survivin の発現を抑制する低分子化合物であり、in vitro、in vivo で YM155 は高い抗腫瘍効果を示した。また、単剤での第 1 相臨床試験がすでに施行されており、重篤な副作用を示さなかった事も報告されているものの、放射線との併用療法に関しては未だ検討されていない。

本研究において、我々は Clonogenic assay により YM155 が放射線感受性を増強させる事を示した。そのメカニズムの一つとして、YM155 が放射線障害性アポトーシスを増大させることにより放射線感受性を増大させたことを示唆した。また、survivin の他の機能として DNA DSBs 修復の調節を通して放射線照射後の腫瘍細胞生存を増強するということが報告されており、我々は、YM155 が肺癌細胞株において放射線障害性 DSBs の修復を抑制することを示した。この事は、YM155 による放射線誘発の DNA repair の抑制が放射線増感効果に繋がったことを示唆した。

放射線療法と化学療法間の交差耐性はアポトーシスの欠陥及び、DNA repair の増強に起因するとされている。従って我々の実験結果は、YM155 がアポトーシスを促進し、DNA repair を抑制することにより放射線耐性を克服する可能性を示し、また化学療法に対する感受性を増大させる可能性を示唆した。以上の事より我々の実験結果は、今後の YM155 と放射線療法の併用療法の臨床における有用性を示唆するものであった。

氏名	たなか 田中	かおる 薫
学位の種類	博士 (医学)	
学位記番号	医第 1002 号	
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 21 日	
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion (胃癌高発現遺伝子 SRPX2 は細胞の遊走・接着機能を誘導する)	
論文審査委員 (主査)	教授	中川和彦
(副主査)	教授	金丸昭久
(副主査)	教授	義江修

論文内容の要旨

【目的】

癌臨床検体 50 例の正常組織部と腫瘍組織部のペアサンプルを用いた DNA マイクロアレイの解析により新規癌遺伝子候補として SRPX2 遺伝子 (Sushi repeat containing protein, X-linked 2) を同定した。SRPX2 遺伝子は急性白血病における E2F-HLF キメラ遺伝子の下流分子として報告され、Sushi・HYR ドメインを有することから細胞接着因子との関連が考えられている。しかし過去の報告では実証されておらず、その機能は未だ明らかにされていない。SRPX2 遺伝子の癌遺伝子としての可能性を検討するとともに生物学的な機能について検討する。

【方法】

RT-PCR 法を用いて、臨床検体や癌細胞株などでの SRPX2 遺伝子の発現を調べるとともに強制発現株を樹立することで細胞機能の変化を検討した。

【結果】

RT-PCR 法による細胞株を用いた検討では SRPX2 遺伝子は胃癌のほかは大腸癌や一部肺癌でも発現上昇を認め、臨床検体を用いた検討では正常組織部と比較して約 8 倍高発現であり SRPX2 遺伝子の高発現が予後不良因子となる可能性が示唆された。SRPX2 遺伝子の生物学的機能を明らかにするため SRPX2-GFP 融合遺伝子を正常細胞株 (HEK293) へ導入し安定発現株を樹立したところ、SRPX2 遺伝子の細胞質への局在、培養液中への SRPX2 蛋白の分泌が確認できた。またその生物学的機能を明らかにするため Retrovirus Vector を用いて SRPX2 遺伝子を細胞株へ導入し安定発現株を樹立したところ、細胞増殖能においては変化が認められなかったがコントロール群と比較して細胞遊走能の亢進が認められた。次に分泌された SRPX2 蛋白の機能解析のために胃癌細胞株を用いて migration assay を行ったところ SNU-16 細胞において細胞遊走能の亢進が誘導された。また、SRPX2 蛋白を固層化して行った Adhesion assay においては SNU-16 細胞の他に HSC39 細胞においても細胞接着能の亢進、FAK のリン酸化レベルの亢進が誘導された。

【結論】

以上より SRPX2 遺伝子の高発現は胃癌細胞の遊走・接着機能を亢進させ、SRPX2 遺伝子が癌細胞の遊走・接着機能に関わることを報告する。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2008 年 月 日 公表予定	出版物名 International Journal of Cancer Vol. p. ~
	公 表 内 容	2008 年 月 日 発行予定
	全 文	

論文審査結果の要旨

【目的】胃癌臨床検体 50 例の正常組織部と腫瘍組織部のペアサンプルを用いた DNA マイクロアレイの解析により新規癌遺伝子候補として SRPX2 遺伝子 (Sushi repeat containing protein, X-linked 2) を同定した。SRPX2 遺伝子は急性白血病における E2F-HLF キメラ遺伝子の下流分子として報告され、その構造上に Sushi・HYR ドメインを有することから細胞接着因子との関連が考えられている。過去の報告では SRPX2 の生物学的機能および癌領域での関連は明らかにされていない。本研究は SRPX2 遺伝子の癌遺伝子としての可能性を検討するとともに、SRPX2 の生物学的な機能を明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法】SRPX2 遺伝子発現の検討では、リアルタイム RT-PCR 法を用いて 21 の正常組織および臓器、57 例の臨床検体、32 株の癌細胞株の cDNA に対して遺伝子発現の検討を行った。また SRPX2 遺伝子の強制発現株を樹立することで SRPX2 蛋白発現分布および強制発現細胞の増殖・接着・遊走機能の変化を検討した。細胞の増殖能は Cell growth assay にて、接着能は蛋白を固層化して行う Adhesion assay で、遊走能は Boyden chamber を用いた Migration assay 及びスクラッチ法を用いた Wound healing assay にてそれぞれ評価を行った。SRPX2、GFP、FAK、リン酸化 FAK の蛋白発現はウエスタンブロット法を用いて検出した。

【結果】正常組織における SRPX2 遺伝子発現分布をリアルタイム RT-PCR 法により検討したところ、SRPX2 遺伝子は胎盤、肺、気管、子宮などで発現が高い傾向が認められた。細胞株の cDNA を用いた検討では SRPX2 遺伝子は胃癌・大

腸癌・肺癌などの癌細胞株とヒト正常血管内皮細胞株である HUVEC において発現が高い傾向が認められた。臨床検体を用いた検討では個人差は認められたが全体に癌部において発現が高く、平均すると正常組織部と比較して約 8 倍高発現であった。SRPX2 発現と 57 例の臨床検体の患者背景との相関を解析したところ、年齢・性別・組織分化度との相関は認められなかったのに対して、予後不良群において SRPX2 遺伝子の発現レベルが有意に高く SRPX2 遺伝子が予後不良因子であることを示した。

SRPX2 遺伝子の生物学的機能を明らかにするため SRPX2-GFP 融合遺伝子を正常細胞株 (HEK293) へ導入し安定発現株を樹立したところ、SRPX2-GFP 融合蛋白は細胞質への局在パターンを示し、また Western blot 法による検討では培養液中への SRPX2 蛋白の分泌を確認した。またその生物学的機能を明らかにするため Retrovirus Vector を用いて SRPX2 遺伝子を細胞株へ導入し安定発現株を樹立した。SRPX2 強制発現細胞は細胞増殖能においては変化が認められなかったが、細胞遊走能の亢進を認められた。次に分泌された SRPX2 蛋白の機能解析のために胃癌細胞株を用いて Migration assay を行ったところ SNU-16 細胞において細胞遊走能の亢進が誘導された。また、SRPX2 蛋白を固層化して行った Adhesion assay においては SNU-16 細胞の他に HSC-39 細胞においても細胞接着能の亢進、FAK のリン酸化レベルの亢進が誘導された。

【結論】胃癌高発現遺伝子である SRPX2 は、臨床的予後不良因子であり、胃癌細胞の遊走・接着機能を亢進させ、Focal Adhesion Kinase を介して癌細胞の遊走・接着機能を増強する生物学的機能を明らかにした。これらの知

見は、SRPX2 の生物学的機能を初めて明らかにしたことのみならず、分子腫瘍学領域においても新しい癌関連分子として転移・浸潤メカニズムの解明につながる研究結果と考えられ学位論文として価値ある研究と判断した。