

氏名	たかはし きいち 高橋 貴一
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2020年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	食道扁平上皮細胞における Suprabasin を介した転写因子 Sox2 による細胞増殖能と血管新生能亢進に関する検討
論文審査委員	主査 教授 正宗 淳 教授 笹野 公伸 教授 玉井 恵一

論文内容要旨

【背景・目的】発癌早期段階である表在型食道癌は、上皮内血管の新生と形態変化に基づく内視鏡 narrow band imaging 観察によって早期発見が可能となり、多くは内視鏡治療が行われている。転写因子 Sox2 は進行食道扁平上皮癌を含む多くの癌で発現増幅が認められ、癌増殖・進展に関与している。Suprabasin は近年同定された重層扁平上皮に特異的に発現している分泌蛋白であるが具体的な生理活性や分子生物学的な発現誘導メカニズムについては不明である。そこで、Sox2 が食道扁平上皮に発現しているかどうか、Suprabasin に着目して明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト表在型食道癌における Sox2 の発現を免疫組織化学で、さらに TissueFAXS®を用いて定量化した。in vitro の検討で、ヒト正常扁平上皮培養細胞株 Het-1A と各ヒト食道癌培養細胞株の Sox2 の発現をウエスタンブロット法と qPCR 法を用いて検討した。Doxycycline 添加により Sox2 を発現誘導する Het-1A 細胞 (HetSox2) を樹立し、MTS およびスフェロイドアッセイで細胞増殖能と造腫瘍能を、細胞遊走および発芽アッセイで血管新生能を評価した。さらに Sox2 の発現増幅によって Suprabasin が発現誘導することを qPCR 法、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法で確認した。また、細胞増殖作用と血管新生作用、さらに AKT および MAPK 細胞内シグナル系の活性化を検討した。最後にヒト表在型食道癌における Sox2、CD34、Suprabasin の発現の相関を免疫組織化学的に検討した。

【結果】ヒト表在型食道癌における Sox2 の発現は免疫組織化学的には非癌部と比べて平均 1.37 倍と有意に増強していた。また、各ヒト食道癌細胞株における Sox2 の発現はヒト正常食道扁平上皮細胞株 Het-1A に比べて増強していた。HetSox2 細胞を用い Sox2 を強制発現したところ、MTS アッセイでは 1.26 倍、スフェロイドアッセイでは 2.21 倍と、有意な細胞増殖能および造腫瘍能の亢進を認めた。HetSox2 細胞の培養上清を用いると、細胞遊走アッセイでは 2.26 倍と有意な血管内皮細胞 HUVEC の遊走を、発芽アッセイでは 1.78 倍と有意なスプラウトの伸長を認め、Sox2 誘導によって HUVEC の血管新生が誘導されることが示された。Sox2 を誘導した HetSox2 細胞において分泌蛋白 Suprabasin の発現は、2.58 倍と有意に亢進しており、ルシフェラーゼアッセイと ChIP 法を用いた検討で、Sox2 が直接 Suprabasin プロモーター領域-1566 位/-1559 位に結合することが判明した。Suprabasin を添加した Het-1A 細胞では、MTS アッセイで 1.18 倍と有意な細胞増殖能の亢進を認め、HUVEC においては、細胞遊走アッセイで 5.00 倍、発芽アッセイで 2.28 倍と有意な血管新生能の亢進を認めた。また、Suprabasin 添加により AKT シグナルおよび p38 MAPK シグナルの活性化を認めたが、各シグナル阻害剤を用いた細胞遊走アッセイにより血管新生は AKT シグナルの活性化によるものと考えられた。最後に、Sox2 の発現が増強した表在型食道癌では CD34 陽性の毛細血管が有意な増生し、Suprabasin の発現が有意に増強していることが判明した。

【結論】食道扁平上皮細胞においては、Sox2 の発現増強によって、Suprabasin の発現が誘導され、血管新生や細胞増殖を介して発癌を促進することが示唆された。食道扁平上皮細胞における Suprabasin を介した転写因子 Sox2 による細胞増殖能と血管新生能亢進に関する検討

審査結果の要旨

博士論文題目 食道扁平上皮細胞における Suprabasin を介した転写因子 Sox2 による細胞増殖能と血管新生能亢進に関する検討.....

所属専攻・分野名 医科学専攻 消化器病態学分野.....

学籍番号 B6MD5078 氏名 高橋 貴一.....

【背景・目的】発癌早期段階である表在型食道癌は、上皮内血管の新生と形態変化に基づく内視鏡 narrow band imaging 観察によって早期発見が可能となり、多くは内視鏡治療が行われている。転写因子 Sox2 は進行食道扁平上皮癌を含む多くの癌で発現増幅が認められ、癌増殖・進展に関与している。Suprabasin は近年同定された重層扁平上皮に特異的に発現している分泌蛋白であるが具体的な生理活性や分子生物学的な発現誘導メカニズムについては不明である。そこで、Sox2 が食道扁平上皮癌の発癌早期の段階において、細胞増殖や血管新生にどのような分子生物学的メカニズムで作用しているかどうか、Suprabasin に着目して明らかにすることを目的とした。【方法】ヒト表在型食道癌における Sox2 の発現を免疫組織化学で、さらに TissueFAXS® を用いて定量化した。*in vitro* の検討で、ヒト正常扁平上皮培養細胞株 Het-1A と各ヒト食道癌培養細胞株の Sox2 の発現をウエスタンブロット法と qPCR 法を用いて検討した。Doxycyline 添加により Sox2 を発現誘導する Het-1A 細胞 (HetSox2) を樹立し、MTS およびスフェロイドアッセイで細胞増殖能と造腫瘍能を、細胞遊走および発芽アッセイで血管新生能を評価した。さらに Sox2 の発現増幅によって Suprabasin が発現誘導することを qPCR 法、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法で確認した。また、細胞増殖作用と血管新生作用、さらに AKT および MAPK 細胞内シグナル系の活性化を検討した。最後にヒト表在型食道癌における Sox2、CD34、Suprabasin の発現の相関を免疫組織化学的に検討した。【結果】ヒト表在型食道癌における Sox2 の発現は免疫組織化学的には非癌部と比べて平均 1.37 倍と有意に増強していた。また、各ヒト食道扁平上皮癌細胞株における Sox2 の発現はヒト正常食道扁平上皮細胞株 Het-1A に比べて増強していた。HetSox2 細胞を用い Sox2 を強制発現したところ、MTS アッセイでは 1.26 倍、スフェロイドアッセイでは 2.21 倍と、有意な細胞増殖能および造腫瘍能の亢進を認めた。HetSox2 細胞の培養上清を用いると、細胞遊走アッセイでは 2.26 倍と有意な血管内皮細胞 HUVEC の遊走を、発芽アッセイでは 1.78 倍と有意なスプラウトの伸長を認め、Sox2 誘導によって HUVEC の血管新生が誘導されることが示された。Sox2 を誘導した HetSox2 細胞において分泌蛋白 Suprabasin の発現は、2.58 倍と有意に亢進しており、ルシフェラーゼアッセイと ChIP 法を用いた検討で、Sox2 が直接 *Suprabasin* プロモーター領域 -1566 位/-1559 位に結合することが判明した。Suprabasin を添加した Het-1A 細胞では、MTS アッセイで 1.18 倍と有意な細胞増殖能の亢進を認め、HUVEC においては、細胞遊走アッセイで 5.00 倍、発芽アッセイで 2.28 倍と有意な血管新生能の亢進を認めた。また、Suprabasin 添加により AKT シグナルおよび p38 MAPK シグナルの活性化を認めたが、各シグナル阻害剤を用いた細胞遊走アッセイにより血管新生は AKT シグナルの活性化によるものと考えられた。最後に、Sox2 の発現が増強した表在型食道癌では CD34 陽性の毛細血管が有意な増生し、Suprabasin の発現が有意に増強していることが判明した。【結論】食道扁平上皮細胞においては、Sox2 の発現増強によって、Suprabasin の発現が誘導され、血管新生や細胞増殖を介して発癌を促進することが示唆された。

第一次審査において指摘された点に関しては適切に修正されている。本研究は食道扁平上皮において Sox2 が発現増強することにより、Suprabasin の発現が亢進し、血管新生や細胞増殖が誘導されることを明らかにした。以上の結果は食道扁平上皮癌の発癌機序解明の基礎的資料となり意義深く、学位に値すると思われる。よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。