

氏 名（本籍）	はら だ あき ひこ 原 田 昭 彦
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 9 8 6 号
学位授与年月日	平 成 1 5 年 3 月 2 4 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
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	膵癌におけるオステオポンチンの発現とその血管 新生促進作用について (Expression of Osteopontin in Human Pan- creatic Cancer and its Effect on Tumor Angio- genesis)

(主 査)

論文審査委員	教授 松 野 正 紀	教授 下瀬川 徹
	教授 金 丸 龍之介	

論文内容要旨

背景・目的

膵癌は転移浸潤能が高く、その予後は極めて悪い。これまで膵癌に対する新しい診断技術・治療法を開発するために、膵癌の遺伝子学的検討を進めてきた。膵癌には多彩な遺伝子異常が存在し、特に *KRAS* の異常について、この遺伝子異常が膵癌の細胞生物学的悪性度をどのように高めるかに関心を寄せている。

オステオポンチン (Osteopontin, 以下 OPN とする) OPN は *KRAS* 遺伝子により発現が誘導されるという報告があり、膵癌における OPN の発現、そして OPN による膵癌細胞における細胞生物学的特徴の変化について検討した。OPN は分泌型の糖タンパクで、生体内の様々な組織中に存在し、また、脳、乳腺、甲状腺、肺、胃、大腸、肝臓、膵臓、骨、前立腺などの腫瘍組織にも存在することが確認されている。腫瘍組織では、サイトカイン、細胞外基質の作用を持ち、癌の浸潤、転移に大きく関与している。OPN は細胞接着に関与する RGD (arginine-glycine-asparatic acid) 配列を持ち、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 等と結合することにより、細胞の遊走能、接着能を亢進させる。

本研究では膵癌組織における OPN の発現を検索するとともに、膵癌細胞に OPN と RGD 配列を欠失させた OPN 遺伝子を導入し、発現した OPN タンパクと RGD 配列欠失 OPN タンパクの腫瘍血管新生に及ぼす影響について検討した。

方法

OPN 弱発現であった膵癌細胞株 AsPC-1 に OPN、及び RGD 配列欠失 OPN 遺伝子を発現させたアデノウイルスベクターを用い、培養液中の細胞増殖 (in vitro) とマウス皮下腫瘍モデル (in vivo) での増殖を比較した。また、血管内皮細胞の遊走能は Boyden chamber を用い、マウス血管内皮細胞 KOP2.16 で migration assay を行った。さらに合成した GRGDS ペプチドを使い、KOP2.16 の遊走能を同様に評価した。このとき KOP2.16 に発現したインテグリン αv を flowcytometry で解析した。AsPC-1 細胞の培養上清を採取し、血管新生因子のひとつ VEGF (vascular endothelial cell growth factor) タンパクを ELISA、その mRNA を RT-PCR で確認した。腫瘍血管新生過程は、マウス skinfold chamber モデルで観察した。

結果

各遺伝子を導入した AsPC-1 細胞の腫瘍増殖は、in vitro では差を認めなかったが、皮下腫瘍移植モデルで、OPN を強発現させた AsPC-1 細胞は、移植 14 日以降の腫瘍増殖が促進された。

migration assay における KOP2.16 の遊走は、OPN 強発現細胞の培養上清液では促進されたが、RGD 配列欠失遺伝子導入細胞の培養上清では促進されなかった。一方、OPN 強発現細胞培養上清に GRGDS ペプチドを添加すると、KOP2.16 の遊走は著明に阻害された。このときの OPN 強発現細胞培養上清は KOP2.16 におけるインテグリン αv の発現を強く誘導した。skinfold chamber モデルでは、OPN 強発現 AsPC-1 細胞が、腫瘍移植 7 日後から強く血管新生を誘導することが確認された。遺伝子導入した AsPC-1 細胞はいずれも、VEGF の産生を促進していなかった。

考 察

KRAS の異常が認められる膵管の異型上皮や膵癌にも OPN の発現が認められ、活性化した *KRAS* により OPN の発現が誘導されるというこれまでの報告と一致する結果が得られた。

KRAS により発現が誘導されると考えられる OPN には、RGD 配列を介した直接的な血管新生誘導作用が存在することが示された。*KRAS* により形質転換した細胞での OPN の発現が転移形成を促進する一因となっている可能性がある。

審査結果の要旨

膵癌は転移浸潤能が高く、その予後は極めて悪い。これまでに膵癌の遺伝子学的検討が進められ、多彩な遺伝子異常の存在が報告されている。なかでも *KRAS* の異常は膵癌の細胞生物学的悪性度を高めていることが明らかになってきた。オステオポンチン (Osteopontin, 以下 OPN) は腫瘍組織に存在し、*KRAS* 遺伝子により発現が誘導されるという報告がある。

本研究は膵癌での OPN の発現を検索し、膵癌細胞に OPN と RGD 配列を欠失させた OPN 遺伝子を導入、発現した OPN タンパクと RGD 配列欠失 OPN タンパクの腫瘍血管新生に及ぼす影響について検討したものである。

OPN 弱発現膵癌細胞株 AsPC-1 に OPN 及び RGD 配列欠失 OPN 遺伝子を発現させたアデノウイルスベクターを用い、培養液中の細胞増殖 (in vitro) とマウス皮下腫瘍モデル (in vivo) での増殖を比較した。また、血管内皮細胞の遊走能を合成 GRGDS ペプチドを使い migration assay で解析した。このとき血管内皮細胞に発現したインテグリン αv を flowcytometry で解析した。さらに AsPC-1 細胞の培養上清を採取、血管新生因子のひとつ VEGF (vascular endothelial cell growth factor) タンパクの発現を確認した。腫瘍血管新生過程はマウス skinfold chamber モデルで観察した。

遺伝子導入した AsPC-1 細胞の腫瘍増殖は、in vitro では差を認めなかったが、皮下腫瘍移植モデルで、OPN を遺伝子導入させた AsPC-1 細胞は、移植 14 日以降の腫瘍増殖が促進された。migration assay における血管内皮細胞の遊走は、OPN 遺伝子導入細胞の培養上清液では促進されたが、RGD 配列欠失遺伝子導入細胞の培養上清では促進されなかった。一方、OPN 遺伝子導入細胞培養上清に GRGDS ペプチドを添加により遊走は著明に阻害された。このとき OPN 遺伝子導入細胞培養上清は血管内皮細胞上のインテグリン αv の発現を強く誘導した。遺伝子導入した AsPC-1 細胞はいずれも、VEGF の産生を誘導していなかった。skinfold chamber モデルの腫瘍血管新生過程では、OPN 遺伝子導入 AsPC-1 細胞が、腫瘍移植 7 日後から強く血管新生を誘導することが確認された。

以上から *KRAS* により発現が誘導される OPN には、RGD 配列を介した直接的な血管新生誘導作用が存在することが示された。本研究は、膵癌において *KRAS* により形質転換した細胞での OPN の発現が、転移形成を促進する一因となっている可能性を明らかにした点で独創的で十分に学位に値するものである。