

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 医 学 ）	氏名	藤 國 宣 明
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論 文 題 目			
<p>Hypoxia-mediated CD24 expression is correlated with gastric cancer aggressiveness by promoting cell migration and invasion.</p> <p>(低酸素によって促進される CD24 の発現は胃癌細胞の運動・浸潤能亢進因子である)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教授	安 井 弥 印	
審査委員	教授	今 泉 和 則	
審査委員	准教授	北 台 靖 彦	
〔論文審査の要旨〕			
<p>CD24 は膜結合型の糖蛋白質で、ヒト正常組織では、B リンパ球前駆細胞の膜表面に発現しており、P-selectin のリガンドとして機能し、上皮細胞や血小板への接着分子として知られている。悪性新生物においては、乳癌、肝細胞癌、膀胱癌などの癌種で、その発現の有無と癌転移や癌幹細胞性との関連性が報告されている。このように CD24 の重要性を報告した多くの研究があるにもかかわらず、胃癌領域においては、CD24 の果たす役割や発現誘導機序については未だ十分に検討されているとは言えない。著者等は、胃癌細胞の幹細胞性因子を探索する過程で、CD24 の胃癌細胞における特異な発現様式を見出し、その機能解析や発現誘導機序について解析を行った。</p> <p>胃癌患者の腹水中から採取した胃癌細胞およびヒト胃癌細胞株を用いて、これまで複数の癌種で報告のある癌幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリーを用いて検討した。次に CD24 の発現の有無による胃癌細胞の特性について検討した。続いて、RNAi 法を用いて CD24 の発現を抑制した胃癌細胞の特性について検討した。CD24 発現誘導機序の検討では、胃癌細胞を低酸素環境に曝露し、CD24 の発現をフローサイトメトリーを用いて評価し、さらに RNAi 法を用いて HIF-1<math>\alpha</math> および HIF-2<math>\alpha</math> の発現を抑制して、CD24 の発現変化を検討した。また、広島大学病院消化器外科での胃癌根治手術症例 119 例を対象として免疫組織学的解析を行い、CD24 と臨床病理学的因子や予後との関連性を検討した。さらに CD24 と HIF-1<math>\alpha</math></p>			

および HIF-2 $\alpha$  の発現の関連についても検討した。

各種胃癌細胞での癌幹細胞マーカーの発現を検討したところ、CD44, CD133 は均一な発現様式であったが、CD24 は陽性細胞と陰性細胞の混在型あるいは陰性型に分類され、多様性を規定する因子の一つである可能性が示唆された。次に CD24 陽性細胞と陰性細胞の特性を検討したところ、通常酸素環境下で CD24 陰性細胞を長期継代培養すると、CD24 陽性細胞割合は、TMK-1 細胞で約 1% から 62% と増加し、44As3 細胞でも約 1% から 67% と増加し定常状態に達した。次に、CD24 が胃癌細胞の悪性度に及ぼす影響について解析したところ、CD24 陽性胃癌細胞は陰性細胞と比較して、細胞増殖能には差を認めなかったが、細胞接着能、運動能、浸潤能が有意に高かった。さらに CD24 発現を抑制すると、細胞接着能、運動能、浸潤能が維持されず、CD24 は胃癌細胞の浸潤能維持に重要な因子であると考えられた。次に CD24 の発現誘導機序について検討した。CD24 のプロモーター領域には Hypoxia Responsive Element が複数箇所存在することから、HIF が胃癌細胞の CD24 発現を制御するとの仮説を立てた。そこで胃癌細胞を低酸素環境 (O<sub>2</sub> 1%) に曝露すると、まず HIF-1 $\alpha$  の発現が 24 時間以内に安定化し、その後 HIF-2 $\alpha$  の発現が安定化した。癌幹細胞マーカーについては CD44 や CD133 の発現には変化を認めなかったが、CD24 陽性割合は経時的に 63.0% から 86.9% に増加した ( $p < 0.001$ )。また、低酸素環境下で運動能、浸潤能もそれぞれ約 1.4 倍、1.3 倍に亢進した ( $p = 0.025$ ,  $p = 0.042$ )。さらに HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  の発現を抑制すると、低酸素で誘導された CD24 発現が有意に抑制された。この事から胃癌細胞は低酸素環境下で HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  を介して CD24 の発現が亢進し悪性度が増強するものと考えられた。臨床病理学的検討では、CD24 陽性は 61 例 (51%)、HIF-1 $\alpha$  陽性 25 例 (21%)、HIF-2 $\alpha$  陽性 45 例 (38%) に認められた。CD24 発現は組織型とは相関を認めなかったが、進行病期、腫瘍深達度、リンパ節転移、尿管侵襲と有意な相関を認めた ( $p = 0.044$ ,  $p = 0.036$ ,  $p = 0.045$ ,  $p = 0.004$ )。また、組織型に関わらず CD24 は胃癌の予後規定因子になることを確認した。CD24 と HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  の発現は有意な相関関係があった ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$ )。これらの結果から、CD24 は胃癌の悪性化マーカーであると同時に予後規定因子となり得ると考えられた。

CD24 は胃癌の多様性を規定するマーカーとしてだけでなく、胃癌細胞の悪性化のマーカーになり得るものと考えられた。CD24 は低酸素によって安定化する HIF-1 $\alpha$  や HIF-2 $\alpha$  により発現誘導され胃癌細胞の浸潤能を亢進すると考えられた。CD24 やそれを制御する HIF-1 $\alpha$  や HIF-2 $\alpha$  を標的とした治療戦略は、高度進行胃癌における新たな選択枝の一つとなる可能性があると考えられる。

以上の結果から、本論文は CD24 が胃癌の悪性化因子の一つである事および、その発現誘導機序について検討したものであり、胃癌の悪性化機序を解明した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。