

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	内藤 聡雄
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Mesenchymal stem cells induce tumor stroma formation and epithelial-mesenchymal transition through SPARC expression in colorectal cancer (MSC は大腸癌細胞における SPARC 発現を介して腫瘍間質の形成や EMT を誘導する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	有廣 光司 印	
審査委員	教授	東 幸仁	
審査委員	准教授	大上 直秀	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>大腸癌において、癌と間質の相互作用により腫瘍発育が促進されることが知られている。大腸癌において、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) が腫瘍間質に遊走し、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts; CAFs) に分化した結果、腫瘍の発育進展を促進することを報告した。また、マイクロアレイ解析を行い、大腸癌細胞を MSC と直接接触培養することで、secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) をはじめとする epithelial-mesenchymal transition (EMT) 関連遺伝子の発現が上昇することを報告している。</p> <p>大腸癌の発育進展に対して、SPARC がどのように影響を与えるかを、臨床検体、細胞株、マウスモデルを用いて検討した。ヒト大腸癌外科切除標本 42 検体を用いて、以前のマイクロアレイ解析で発現上昇を認めた EMT 関連遺伝子 (SPARC, pentraxin 3; (PTX3), fibronectin 1; (FN1), follistatin-related protein 1; (FSTL1), galectin 1; (GALS1) について免疫組織化学的評価を行い、臨床病理学的特徴や予後との関連を解析した。次に、ヒト大腸癌細胞株 KM12SM (wild type; WT) を用いて、SPARC 発現抑制株である short hairpin RNA SPARC; (shSPARC) を作成し、MSC との相互作用による SPARC の腫瘍発育に対する影響を評価するため、WT もしくは shSPARC の癌細胞の単独培養もしくは MSC との共培養を行った際の増殖能や遊走能をタイムラプスシステムで評価した。さらに、大腸癌同所移植マウスモデルを用いて、BALB/c マウスの盲腸壁に WT もしくは shSPARC の癌細胞の単独移植もしくは MSC との共移植を行い、癌細胞移植 6 週後に腫瘍発育、EMT、間質反応などに与えた変化を、免疫組織化学的評価および RNA シークエンスを用いて解析した。T 因</p>			

子、N 因子、Stage の高い症例で、癌細胞における SPARC の高発現を有意に認めており、癌細胞において、SPARC の発現した症例で、SPARC の発現していない症例と比較して有意に予後不良であった。*in vitro* では、MSC との共培養により、shSPARC 株は、コントロール株に比べて増殖能や遊走能が有意に抑制されたが、癌細胞のみの培養では、癌細胞の増殖能と遊走能の抑制は認めなかった。これらのことから、癌細胞における SPARC 発現が、癌細胞の増殖能と遊走能を促進しており、SPARC の機能に癌細胞と MSC の直接的な接触が重要であることが示唆された。また、*in vivo* では、shSPARC 株と MSC の共移植群で、WT 株と MSC の共移植群に比べて、マウスの体重減少や腫瘍の増大、リンパ節転移が有意に抑制されていた。さらに、腫瘍組織を免疫組織化学的に Ki-67、CD31、Lyve1、 α -SMA、type I collagen、FN、E-cadherin を用いて、増殖能や血管新生能、間質反応、EMT について評価すると、MSC との共移植により shSPARC 株で WT 株に比べて、増殖能や血管新生能、間質反応、EMT が有意に抑制され、腫瘍微小環境との相互作用が抑制されたが、癌細胞のみの移植ではそれらの変化は認めなかった。さらに、移植腫瘍における遺伝子発現に対する SPARC の影響を調べるため、WT 株と MSC の共移植腫瘍と shSPARC 株と MSC の共移植腫瘍を用いて、RNA シークエンスにより GO 解析、pathway 解析、gene set enrichment analysis (GSEA) 解析を行ったところ、shSPARC 株と MSC の共移植腫瘍において、WT 株と MSC の共移植腫瘍と比較して、間質反応や血管新生、EMT に関連する遺伝子群やシグナル伝達経路の発現が抑制されていた。

以上の結果から、本論文は癌細胞と間質の直接接触により癌細胞での SPARC 発現が上昇し、EMT や間質反応が誘導されることで大腸癌が発育進展していることが示唆され、また、SPARC は、大腸癌の進行や転移と関連しており、大腸癌の有用な予後不良マーカーであるだけでなく、大腸癌治療における有望な標的分子となり得ると考えられた。

よって審査委員会委員全員は、本論文が内藤聡雄に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。