

論文内容要旨

Overexpression of aldolase, fructose-bisphosphate
C and its association with spheroid formation in
colorectal cancer

(大腸癌における aldolase, fructose-bisphosphate
C 過剰発現の意義とスフェロイド形成への関与)

Pathology International, in press.

主指導教員：大上 直秀教授

(医系科学研究科 分子病理学)

副指導教員：武島 幸男教授

(医系科学研究科 病理学)

副指導教員：宮内 睦美教授

(医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

丸山 諒太

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

本邦における大腸癌の死亡数は男女ともに高く、部位別の癌死亡数は男性で第3位、女性では第1位となっている。新しい分子標的薬の有効性が示されるようになったが、進行・再発大腸癌の予後はいまだ十分に改善されているとはいえ、新規診断・治療標的分子の同定が期待されている。

近年、癌の再発や転移の原因として癌幹細胞が注目されている。癌幹細胞は正常組織幹細胞と同様の性質を持つ癌細胞であり、腫瘍形成能・自己複製能・抗癌剤抵抗性を持ち、癌の転移や再発と深く関係しているとされている。癌幹細胞の解析方法として有用とされるものにスフェロイドを用いた手法がある。

本研究では、幹細胞維持用培地、低接着性培養プレートを用いて、大腸癌細胞株のスフェロイドを作成した。続いて、大腸癌スフェロイドおよび対応する接着細胞でマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、スフェロイドで高発現している遺伝子群を大腸癌幹細胞性関連遺伝子の候補とした。スフェロイドにおいて発現が上昇している遺伝子群から治療標的となりうる遺伝子として ALDOC に着目した。ALDOC は、解糖系を調節するアルドラーゼファミリーに属する。

大腸癌外科的切除検体 135 例を対象に ALDOC の蛋白質レベルでの発現を免疫染色で検討した。その結果、ALDOC は非癌部の上皮や間質の細胞ではほとんど発現がみられなかったが、癌細胞の細胞質に強く染色がみられた。癌部で 20%以上の発現がみられたものを陽性としたところ、135 例中 66 例(49%)が陽性であった。Kaplan-Meier 法で予後との関連を検討したところ、ALDOC 陽性例は陰性例と比較して優位に予後不良であった($p = 0.0011$)。また、癌部における ALDOC の発現は不均一で一定の傾向はみられなかった。ALDOC の発現と臨床病理学的因子との相関を検討したところ、ALDOC の発現は T 因子($p = 0.0127$)と M 因子($p = 0.0067$)と有意な相関がみられた。多変量解析の結果、ALDOC は独立予後不良因子であることが分かった。

次に、135 症例の大腸癌切除例について ALDOC と代表的な癌幹細胞マーカーである CD44 との関連について免疫組織化学的に解析を行った。135 症例の大腸癌切除例のうち 70 例 (52%) が CD44 陽性であった。続いて、ALDOC の染色パターンと CD44 の染色パターンを比較したところ ALDOC と CD44 は同じ腫瘍細胞で発現する傾向がみられた。ALDOC の発現は CD44 の発現と有意に相関することが見出された($p = 0.0091$)。

大腸癌における ALDOC の機能を明らかにするため、ALDOC を大腸癌細胞株において siRNA を用いてノックダウンし、MTT assay にて増殖能を評価した。ALDOC をノックダウンした大腸癌細胞は negative control で処理した大腸癌細胞と比較して、細胞増殖能が有意に低下していることが判明した(LoVo: $p < 0.05$ 、RKO: $p < 0.05$)。また、ALDOC をノックダウンした大腸癌細胞を用いてスフェロイドを作成したところ、negative control で処理した大腸癌細胞と比較して、スフェロイドのサイズは小さくなり(LoVo: $p < 0.05$ 、RKO: $p < 0.05$)、スフェロイドの形成数が減少した(LoVo: $p < 0.05$ 、RKO: $p < 0.05$)。これらのことから、ALDOC が癌幹細胞性に関与していることが示唆された。続いて、wound healing assay を用いて遊走能を評価した。ALDOC をノックダウンした大腸癌細胞は negative control で処理した大腸癌細胞と比較して、

遊走能が有意に抑制された(LoVo: $p < 0.05$ 、RKO: $p < 0.05$)。また、invasion assay を用いて、細胞の浸潤能を評価した。ALDOC をノックダウンした大腸癌細胞は negative control で処理した大腸癌細胞と比較して、浸潤能が有意に低下していた(LoVo: $p < 0.05$ 、RKO: $p < 0.05$)。これらのことから、ALDOC は大腸癌において、細胞の移動を促進する可能性があることが示唆された。

また大腸癌において ALDOC が解糖系へ与える影響を確認するため、大腸癌細胞で ALDOC をノックダウンし、乳酸の産生量を測定した。ALDOC のノックダウンにより乳酸の産生が低下したことから、ALDOC は大腸癌において解糖系を制御し、大腸癌の悪性化に関与している可能性が考えられる。

これらの結果から、ALDOC が大腸癌の発生、進展において重要な役割を担っていることが示唆された。また、大腸癌における診断・治療標的になる可能性があることが示された。