

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	新津 宏明
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
<p>論文題目</p> <p><i>KRAS</i> mutation leads to decreased expression of regulator of calcineurin 2, resulting in tumor proliferation in colorectal cancer.</p> <p>(大腸癌において、<i>KRAS</i> 遺伝子変異は、regulator of calcineurin 2 蛋白質の発現抑制を誘導し、その結果、腫瘍が増殖する)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教授 安 井 弥</p> <p>審査委員 教授 田 中 信 治</p> <p>審査委員 教授 大 毛 宏 喜</p>			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>大腸癌において、様々な遺伝子異常が蓄積し、発癌・進展のプロセスをたどる多段階発癌モデルが提唱されており、<i>KRAS</i> 遺伝子は <i>APC</i> 遺伝子とともに発癌早期に遺伝子異常をきたすとされる。<i>KRAS</i> 遺伝子は、低分子量 GTP 結合蛋白質 RAS ファミリーに属し、上皮成長因子受容体の下流で細胞増殖に関わる細胞内シグナル伝達機構の調節に重要な役割をもっているが、遺伝子変異により恒常活性化することで、がん遺伝子として機能することが知られている。一方でヒト大腸癌において 30-40%に体細胞系列で <i>KRAS</i> 遺伝子変異が認められるが、その分子腫瘍学的解析は不十分であり、臨床応用が可能な分子標的治療も確立されておらず、その特異的治療法の開発が待たれる。</p> <p>本論文では、臓器特異的遺伝子改変技術である Cre-loxP システムを用い、<i>Apc</i> 欠損を背景とした <i>Kras</i> 野生型および <i>Kras</i> 変異型大腸癌マウスモデルを作製し、2 つのマウスモデルより発生する大腸腫瘍の遺伝子発現プロファイルをモノヌクレオチド・マイクロアレイ法により網羅的に解析することで、<i>KRAS</i> 変異型大腸癌の新規分子治療標的となりうる候補遺伝子の検索を行った。解析を行った約 34,000 個の転写産物のうち、6 個の遺伝子で 5 倍以上の遺伝子発現亢進、19 個の遺伝子で 5 倍以上の遺伝子発現低下が認められた。この中で、定量的 RT-PCR でも発現量の変化が確認できたのは、<i>Clps</i>、<i>Irx5</i>、<i>Bex1</i>、<i>Rcan2</i> の 4 つの遺伝子であり、このうち細胞増殖に関与していることが分かっているが、大腸癌での発現の既報告のない <i>Rcan2</i> (regulator calcineurin 2) に着目し、<i>KRAS</i> 変異型大腸癌の新規分子治療標的の候補遺伝子として解析を進めた。</p> <p>ヒト大腸癌検体を用いた免疫組織学的染色では、RCAN2 は正常部や腺腫部では発現を認めないのに対して、大腸癌細胞特異的に強く発現し、その発現部位は腫瘍先進部に多い傾向が見られること、また RCAN2 は <i>KRAS</i> 野生型大腸癌と比べ <i>KRAS</i> 変異型大腸癌で低発現であることが確認された。さらに、RCAN2 発現低下部で細胞増殖マーカーである Ki-67 が発現亢進し、一方発現亢進部では Ki-67 の発現が低下していることから、RCAN2 の腫瘍先進部における大腸癌細胞増殖に関与することが示唆された。一方で、既知の大腸癌分子マーカーとの比較では、大腸上皮・大腸癌の分化に関わる CDX2、血管新生に関わる</p>			

VEGF-A、細胞周期に関わる p53 の発現と RCAN2 の発現には相関が認められなかった。

続いて *RCAN2* の大腸癌細胞での機能を評価するため、SW837、RKO ヒト大腸癌細胞株においてレトロウイルスベクターを用いた *RCAN2* 過剰発現細胞株を、Colo320 ヒト大腸癌細胞株において、shRNA 導入による *RCAN2* 発現抑制細胞株を作製し、カルシニューリン酵素活性、増殖能、遊走能に及ぼす影響を検討した。*RCAN2* 過剰発現株ではコントロール群と比べ、カルシニューリン酵素活性および細胞増殖能の低下を認めたが、遊走能の変化は認めなかった。一方、*RCAN2* の発現抑制細胞株 (Colo320) ではコントロール群と比べ、カルシニューリン酵素活性および細胞増殖能の有意な上昇を認めたが、遊走能の変化は認めなかった。さらに、*RCAN2* 発現抑制細胞株 (Colo320) を用い、ヌードマウスへの皮下移植モデルでの腫瘍形成能を評価し、*RCAN2* 発現抑制により腫瘍形成能が亢進することが確認された。このことから *RCAN2* はがん抑制遺伝子として機能していることが示唆された。

さらに、*RCAN2* のがん細胞増殖抑制能が Calcineurin-NFAT 経路に依存していることを確認するため、*RCAN2* 発現抑制細胞株 (Colo320) に、カルシニューリン阻害剤 (シクロスポリン、タクロリムス) を投与した際の、細胞増殖能に及ぼす影響を評価した。*RCAN2* 発現抑制群ではコントロール群に比べ増殖能が亢進していたが、カルシニューリン阻害剤投与により両群間の細胞増殖能の差は消失し、このことから *RCAN2* のがん抑制機能は、Calcineurin-NFAT 経路依存性であることが確認された。

以上の結果から、本論文は *KRAS* 変異型大腸癌では *RCAN2* の発現抑制を介して、Calcineurin-NFAT 経路依存的に大腸癌が増殖することを示唆し、*RCAN2* が変異型 *KRAS* 大腸癌の新規分子治療標的の候補遺伝子となりうることを示した点で、高く評価できる。

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