HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Frequent Expression of Genes for Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Human Pancreatic Cancer Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 及川, 哲郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1513

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第　２３６号	学位授与年月日	平成　８年　３月　８日
氏　　名	及　川　哲　郎		
論文題目	Frequent Expression of Genes for Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Human Pancreatic Cancer Cells (ヒト膵がん細胞では,ある種のレセプターチロシンキナーゼとそのリガンドの遺伝子が高頻度に発現している)		

博士(医学)　及川哲郎

論文題目

Frequent Expression of Genes for Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Human Pancreatic Cancer Cells

（ヒト膵がん細胞では、ある種のレセプターチロシンキナーゼとそのリガンドの遺伝子が高頻度に発現している）

論文の内容の要旨

既知あるいは未知の増殖因子受容体と考えられるレセプターチロシンキナーゼは種々のがんの発生、進展に関与していることが知られているが、膵がんに関する情報は少ない。膵がんは難治がんの代表であり、膵がん細胞におけるレセプターチロシンキナーゼ、さらにはそれらのリガンドの発現を検討することは、その細胞増殖機構を解明するとともに、細胞増殖メカニズムをブロックする新しい治療法を考える上でも重要である。本研究ではヒト膵がん培養細胞株を用い、レセプターチロシンキナーゼ、及びepidermal growth factor (EGF) 関連増殖因子の発現を検討した。

対象としたのはヒト膵がん培養細胞株12株である。遺伝子構造が知られている9種類のレセプターチロシンキナーゼすなわちEGF receptor, c-*erb*B-2, c-*erb*B-3, c-*met*, c-*trk*, c-*ros*, c-*fms*, c-*eph*, c-*kit* および6種類のEGF関連増殖因子すなわちEGF, transforming growth factor-a (TGF-a), amphiregulin (AR), heparin-binding EGF (HB-EGF), betacellulin (BTC), *cripto* について合成プローブを作成し、ノザンブロット法にてそれらの発現を検討した。全RNAの抽出はacid guanidinium phenol chroloform法で、poly (A)+RNAの精製はOligotex-dT30を用いて行った。各細胞につき5 μgのpoly (A)+RNAを1%アガロース・ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写しハイブリダイゼイションを行った。また、抗TGF-aモノクローナル抗体の細胞増殖に対する影響を、2株のヒト膵がん細胞株 (ASPC-1, KP3) に対して検討した。96穴プレートに2000-4000 cells/wellの細胞密度で播種した膵がん細胞に、抗TGF-α モノクローナル抗体を5-500 μg/mlの濃度で加え、95% CO_2, 5% O_2, 37℃の条件で3日間incubateした後、3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 法にて判定した。さらに、膵がん細胞培養上清中のHepatocyte growth factor (HGF) をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。

ノザンブロット法では、レセプターチロシンキナーゼのうちEGF receptor, c-*erb*B-2, c-*erb*B-3の発現がそれぞれ12株 (100%)、12株 (100%)、7株 (58%) に認められた。またc-*met* mRNAも8株 (67%) に検出された。その他の5種類のレセプターチロシンキナーゼについては、いずれも検出されなかった。一方、増殖因子の発現についてはTGF-αが10株 (83%)、ARが10株 (83%) に認められたが、EGF, HB-EGF, BTC, *cripto* のmRNA及び培養上清中のHGFは検出されなかった。さらにTGF-α, AR及びEGF receptorの同時発現が9株 (75%) に認められた。また、検討した2株では抗TGF-αモノクローナル抗体の添加により、コントロールに比し用量依存性の細胞増殖抑制効果が認められ、モノクローナル抗体の最高濃度においてASPC-1では38%、KP3では51%の増殖抑制が見られた。

以上の結果から、膵がん細胞では*erb*B familyに属するEGF receptor, c-*erb*B-2, c-*erb*B-3の発現が高頻度に認められ、これらの膵がん細胞増殖への関与が推察された。一方TGF-αの発現も

高頻度に観察されたこと、抗 TGF−αモノクローナル抗体の添加によりこれらの細胞増殖が抑制されたことから、TGF−α が膵がん細胞のオートクリン増殖因子として機能している可能性が考えられた。さらに新しい EGF 関連増殖因子である AR の発現も多くの株で認められ、ほとんどの場合 TGF−α,EGF receptor と同時発現をしていることから、EGF receptor を巡る膵がんのオートクリン増殖機構は少なくとも TGF−α，AR という複数のリガンドによって支配されている可能性が示唆された。このほか、c−*met* の発現が多数の細胞株で認められたことも含め、これら特定の種類のレセプターチロシンキナーゼとそのリガンドが膵がん細胞の増殖調節に重要な役割を果たしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

レセプターチロシンキナーゼ (RTK) は既知あるいは未知の増殖因子受容体と考えられる糖蛋白質である。近年多くの RTK ががん遺伝子として分離され、そのがん発生および進展への関与を示唆する知見が集積されつつある。

申請者は、膵がん細胞の生物学的特性のなかでもその増殖機構を解明することを目的に、報告の少ない膵がん細胞における RTK、さらにそれらのリガンドの発現を検討した。ヒト膵がん培養細胞株12株を用い、遺伝子構造が知られている 9 種類の RTK および 6 種類の epidermal growth factor (EGF) 関連増殖因子について、ノザンブロット法にてそれらの発現を検討したところ、RTK のうち EGF receptor, c−*erb*B−2，c−*erb*B−3　の発現がそれぞれ12株（100％），12株（100％），7株（58％）に認められた。またc−*met* mRNA も 8 株（67％）に検出された。その他の 5 種類のRTK の発現は認められなかった。増殖因子については transforming growth factor（TGF）−αが10株（83％）、amphiregulin（AR）が10株（83%）に発現が認められ、その他の 4 種類の EGF 関連増殖因子の mRNA は検出されなかった。c−*met* のリガンド hepatocyte growth factor については、培養上清中濃度を ELISA で検討したがいずれも測定感度以下であった。TGF−α，EGF receptor,c−*erb*B−2 についてサザンブロット法による検討では、いずれの細胞株でも遺伝子増幅は観察されなかった。また申請者は、抗 TGF−αモノクローナル抗体の細胞増殖に対する影響、2 株のヒト膵がん細胞株に対して検討した。その結果、いずれの細胞株においても抗 TGF−αモノクローナル抗体の添加により、コントロールに比し用量依存性の細胞増殖抑制効果が認められ、モノクローナル抗体の最高濃度において38％から51％の増殖抑制が観察された。

申請者はこれらの結果にもとづき、まず膵がん細胞における *erb*B family に属する EGF receptor，c−*erb*B−2，c−*erb*B−3 の高頻度発現の膵がん細胞増殖への関与を推察した。また TGF−α の発現も高頻度に観察され、抗 TGF−αモノクローナル抗体の添加によりこれらの細胞増殖が抑制されたことから、TGF−αが膵がん細胞のオートクリン増殖因子として機能しているものと考えた。さらに新しい EGF 関連増殖因子である AR の発現も多くの株で認められ、ほとんどの場合 TGF−α,EGF receptor と同時発現をしていることから、EGF receptor を巡る膵がんのオートクリン増殖機構は従来考えられていたような TGF−α単独ではなく、TGF−α, AR という複数のリガンドによって支配されていると評価した。

論文審査委員会では、本論文が特定の種類の RTK とそのリガンドが膵がん細胞の増殖調節に重要な役割を果たしている可能性を明らかにし、膵がん細胞の生物学的特性の解明および関連研究領域の知見の蓄積に寄与するものと判断した。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

1）実験に用いた細胞株の由来と、確かに膵がん株とする根拠について
2）これらの細胞の character（ヌードマウス移植の可否、genetic background）について
3）合成プローブ作成の時に選択した部位の基準
4）ノザンブロットで内部マーカーとしてβ−actin を使うことの妥当性
5）RNA を抽出するときは、どの程度の細胞数を使ったか
6）RNA を抽出するさい、subconfluent な細胞からとった理由
7）培養上清中の HGF を測定した理由
8）MTT assay で選んだ2株の細胞を選択した理由
9）リコンビナント TGF−αの作成法について
10）primary pancreatic cancer での TGF−α, AR の発現について
11）K−ras point mutation と growth factor 発現の間の相関の有無
12）膵がんで発現している met は wind type か
13）erbB family 遺伝子の過剰発現の原因は、転写レベルの問題か
14）膵がん細胞における Insulin like growth factor およびその receptor の発現について
15）TGF−α negative な細胞での抗 TGF−αモノクローナル抗体の効果について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　教授　椙　村　春　彦
副査　教授　菅　野　剛　史　　副査　教授　馬　場　正　三
副査　教授　藤　田　道　也　　副査　講師　花　井　洋　行