HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アテローム性動脈硬化症ならびに膵癌における細胞ストレス誘導分子の発現［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	池下, 隼司
Description	配架番号：2337
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12833号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67438
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shunji_Ikeshita_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　池下　隼司

学位論文題名

アテローム性動脈硬化症ならびに膵癌における細胞ストレス誘導分子の発現
（Expression of cellular stress-induced molecules in atherosclerosis and pancreatic carcinoma）

【背景】我々の体を構成する細胞は常に様々なストレスにさらされており、ストレス応答の破綻が癌や代謝性疾患など種々の疾患と関連していることが明らかになっている。本研究では、細胞ストレス誘導分子に着目し、アテローム性動脈硬化症および膵癌における発現動態と病態との関わりについて解析を行った。

第1章　ヒトアテローム性動脈硬化症における NKG2D リガンドの発現

【背景と目的】アテローム性動脈硬化症は、LDL などの脂肪性物質を貪食して泡沫化したマクロファージが血管内膜に集積し、アテロームを形成することで血管内膜の限局性肥厚をきたす疾患である。これまでに NK 細胞や NKT 細胞が病態の進展に関与することが明らかになっている。NK 細胞活性化受容体の 1 つに NKG2D があり、ヒトにおけるリガンドとして MICA/B、ULBP1-6 などが知られている。これらのリガンドは感染や腫瘍化などの細胞ストレスによって膜表面に発現が誘導され、ストレスを受けた細胞は NKG2D 陽性細胞によって排除される。しかし癌細胞では NKG2D リガンドを発現しているにもかかわらず NKG2D 陽性細胞による細胞傷害が抑制されることも報告されている。また、近年の研究では、マウスにおけるアテロームの形成に NKG2D システムが関与していることが明らかになっているが、ヒトでの関与については未だ不明な点が多い。そこで本研究ではヒトのアテローム性動脈硬化症の病態制御に NKG2D システムが関与しているかどうか、MICA/B に焦点をあてて *in vitro* にて検討を行った。

【材料と方法】アテローム性動脈硬化症を認めた大動脈の剖検材料 7 検体、正常または軽度動脈硬化症を認めた大動脈の剖検材料 5 検体を使用し、MICA/B 発現を免疫組織化学的に解析した。また、健常人より末梢血を採取し、非接着細胞との間接共培養によって成長因子等を加えずにマクロファージへの分化培養を行い、変性 LDL 貪食による MICA/B 発現を検討した。

【結果】アテローム性動脈硬化症を認めた大動脈では、アテロームを覆う線維性被膜下にマクロファージマーカーの CD68 陽性細胞が観察され、その一部に MICA/B 陽性像が認められた。しかし、その周囲に NKG2D 陽性細胞の浸潤像は認められなかった。健常人末梢血より分化培養したマクロファージは M2 マクロファージのフェノタイプを示し、変性 LDL の貪食によって、MICA/B 発現を亢進した。変性 LDL 貪食マクロファージに対する NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害アッセイの結果、マクロファージでは MICA/B 発現が亢進しているにも関わらず、細胞傷害が有意に抑制されていた。

【考察】ヒトアテローム性動脈硬化症では泡沫細胞が MICA/B を発現しているにもかかわらず、周囲に NKG2D 陽性細胞が認められなかった。また、*in vitro* において変性 LDL を貪食したマクロファージでは MICA/B 発現が亢進していたが、細胞傷害が有意に抑制され

ていた。以上より、アテローム性動脈硬化症の病態では、泡沫細胞が MICA/B を発現するものの、NKG2D 陽性細胞によって適切に排除されないために病態が進展する可能性が示唆された。
【結論】ヒトアテローム性動脈硬化症において、実際に NKG2D システムが関与し、何らかの原因によって泡沫細胞が排除されていない可能性が示唆され、NKG2D システムの破綻が病態の増悪に関与することが推測された。

第 2 章　膵癌細胞の分裂期における CD44v9 の高発現
【背景と目的】膵癌は 5 年生存率が 10%以下と極めて予後不良な難治性固形癌の代表である。その要因として高い浸潤・転移能、治療抵抗性などが挙げられるが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。悪性腫瘍組織中に存在する癌幹細胞は、自己複製能や多分化能、治療抵抗性や細胞周期静止状態などの特性を有しており、これによって癌の再発・転移に関与すると考えられている。癌幹細胞マーカーの CD44 にはスタンダードフォーム（CD44s）の他に多くのバリアントフォーム（CD44v）が存在し、EMT の過程において CD44v から CD44s へのスイッチングが起こり、CD44s が間葉系形質獲得に関与することが報告されている。また CD44v の中でも CD44v8-10（CD44v9）には活性酸素抑制作用があり、癌幹細胞の治療抵抗性に寄与することがわかっている。臨床的にも、CD44v9 発現が大腸癌や胃癌の予後予測因子として有用であることが明らかになっているが、膵癌における CD44v9 発現パターンに関しては不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、膵癌細胞のサブタイプと CD44v9 発現パターンの関連性について *in vitro* にて検討した。
【材料と方法】CD44 陽性膵癌細胞株 5 種を用いて、RT-PCR 法および免疫蛍光染色を施行し、膵癌細胞株の上皮・間葉系サブタイプ、CD44v 発現パターンについて検討した。
【結果】RT-PCR 法による解析の結果、膵癌細胞株のうち 3 種で E-cadherin の発現が認められ、上皮系形質を有することがわかり、残り 2 種で Vimentin、ZEB1 の発現がみられ、間葉系形質を有することがわかった。また、上皮系形質を持つ膵癌細胞株は $CD44v^{high}$ であり、間葉系形質を持つ膵癌細胞株では $CD44s^{high}$ であった。上皮系形質を持つ $CD44v^{high}$ 膵癌細胞では、細胞分裂時に CD44v9 の発現亢進が観察され、細胞周期の分裂前期から分裂終期にかけて劇的に発現亢進していることが確認された。また、CD44v9 陰性細胞を細胞ソーティングによって分離して培養した場合でも、細胞分裂時に同様の CD44v9 発現亢進が観察された。さらに、上皮系形質を持つ $CD44v^{high}$ 膵癌細胞では、細胞分裂時に多剤耐性因子 MDR1 の発現が微小管の局在に一致して観察された。
【考察】本研究において、上皮系形質を有する膵癌細胞株では、細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 発現を亢進することがわかり、細胞分裂時に特異的に治療抵抗性を獲得することで、膵癌の難治性形質の特徴である高い増殖能や治療抵抗性に寄与していると考えられる。また、分離した CD44v9 陰性細胞でも細胞分裂時には CD44v9 発現を亢進させたことから、CD44v9 の発現は細胞周期依存的であり、可塑性があることが確認された。したがって、癌幹細胞を排除したとしても、再び発生し得る能力を秘めていることが示唆される。
【結論】上皮系形質を有する膵癌細胞株は、細胞分裂時特異的に治療抵抗性を獲得しており、このことが膵癌の難治性形質の原因となり得ると考えられた。

【総括】本研究において、アテローム性動脈硬化症では泡沫細胞が MICA/B を高発現するにも関わらず適切に排除されていない可能性が示された。また、膵癌では CD44v9 が細胞分裂期特異的に高発現し治療抵抗性を獲得していることが示唆された。細胞ストレス応答は種々の疾患における病態制御に重要である。今回得られた知見をもとに更なる詳細な解析を行うことで、アテローム性動脈硬化症の予防法の確立や、膵癌の難治性形質獲得の原因解明および治療法開発へとつながることが期待される。