

氏 名	佐藤 翔
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第419号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成27年 9月 9日
学位論文題目	Continuous taurocholic acid exposure promotes esophageal squamous cell carcinoma progression due to reduced cell loss resulting from enhanced vascular development. (タウロコール酸の持続的曝露により血管新生が亢進され細胞死が減少し、食道扁平上皮癌の進展がおこる)
審査委員	主査 教授 前川 聡 副査 教授 後藤 敏 副査 教授 九嶋 亮治

論文内容要旨

※整理番号	423	(ふりがな) 氏名	佐藤 翔
学位論文題目	<p>Continuous taurocholic acid exposure promotes esophageal squamous cell loss resulting from enhanced vascular development</p> <p>(タウロコール酸の持続的曝露により血管新生が亢進され細胞死が減少し、食道扁平上皮癌の進展がおこる)</p>		
<p>【背景および目的】</p> <p>食道扁平上皮癌の発生には飲酒や喫煙が関与していることが広く知られているが、飲酒や喫煙には胃食道逆流を促す作用がある。胃切除後に発生してくる食道扁平上皮癌やバレット食道関連の食道腺癌の発生には、胆汁酸を含む十二指腸液の逆流が関与していることが報告されている。胆汁酸は様々な機序で腫瘍を進展させることが報告されており、我々は、タウロコール酸 (taurocholic acid; TCA) の慢性曝露が食道扁平上皮癌の進展に及ぼす影響を明らかにすることを目的として本研究を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>以前我々の研究室で、ラット十二指腸逆流モデルに発生した腫瘍から樹立した食道扁平上皮癌細胞株 ESCC-DR を研究に使用した。2ヶ月以上 TCA(2mM)を曝露した ESCC-DR (TCA cells) と control の ESCC-DR (control cells) との比較実験を下記の通り <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> で行った。</p> <p>(<i>in vitro</i>)</p> <p>flow cytometry、MTT assay、western blotting を行い、細胞周期、細胞増殖、細胞内増殖シグナル伝達 (Erk、Akt、Cox2) を評価した。また、qRT-PCR、ELISA、cell migration assay を行い、TGF-β1 や VEGF の mRNA 発現量、タンパク発現量を評価し、control cells と TCA cells の培養上清に対する HUVEC の遊走能を比較した。さらに、電子顕微鏡で細胞形態を観察し、invasion assay で浸潤能の評価を行った。</p> <p>(<i>in vivo</i>)</p> <p>マウスの皮下に control cells、TCA cells を別々に投与し、経時的に腫瘍の体積を評価した。移植後 4 週間で腫瘍を摘出し、形成された腫瘍からホルマリン固定パラフィンブロック標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本上で腫瘍実質に占める壊死部の割合の計測を行った。また、免疫染色を施行し、アポトーシス及び Ki-67 発現を評価した。さらに、CD31 陽性血管数と腫瘍切片の面積から血管密度を算出し比較した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】**<細胞増殖における TCA 曝露の影響>**

control cells と TCA cells を用いて、一時的な TCA 曝露による影響も検討した。TCA 曝露によりいずれの細胞においても S 期への移行促進が確認され、増殖速度の上昇を認めた。また、control cells において Akt や Erk は TCA 曝露により活性化されていたが Cox2 の発現は認めなかった。しかし Cox2 の発現量は control cells と比較し、TCA cells の方が高かった。

<血管新生における TCA 曝露の影響>

代表的な血管新生因子である TGF- β 1、VEGF の mRNA 発現量およびタンパク発現量は control cells と比較し、TCA cells の方が高かった。また、TCA cells の培養上清を用いた方がより多くの HUVEC を遊走させた。

<腫瘍細胞浸潤における TCA 曝露の影響>

control cells と比較して TCA cells では水平方向に伸長する突起の発現を認めた。同突起内には多量の太いアクチン線維が含まれていることから、形態的に糸状仮足と近似していると考えられた。また、TCA cells の方が高い浸潤能を有することが確認された。

<腫瘍増殖における TCA の影響>

control cells と比較して TCA cells から形成された腫瘍の体積は大きく、腫瘍実質に占める壊死部の割合は小さかった。また、アポトーシス及び Ki-67 発現の差は両者で認めなかったが、TCA cells から形成された腫瘍の CD31 陽性血管の密度は高く、一連の結果から TCA 曝露は腫瘍の血管新生能を促進させていると考えられた。

【考察】

今回、我々は TCA を曝露させた ESCC-DR を用い *in vivo* における腫瘍進展の促進を確認した。この背景として、*in vitro* において、TCA 曝露は ESCC-DR の浸潤能を亢進させており、これが腫瘍進展の促進に直接的に寄与していると考えられた。一般的に TGF- β 1 は、腫瘍細胞に糸状仮足を発現させて細胞運動性を増加させることにより浸潤能を亢進させることが知られており、ESCC-DR の浸潤能亢進も同様の機序によるものと示唆された。さらに、TCA を曝露された ESCC-DR は TGF- β 1 や VEGF といった血管新生因子をより多く放出することにより血管内皮細胞の遊走を誘導し、腫瘍の血管新生を亢進させることにより細胞死の減少を防ぎ、腫瘍進展の促進に間接的に寄与していると考えられた。*in vitro* では TCA 曝露により腫瘍細胞の増殖が促進されたが、*in vivo* では Ki-67 発現に差を認めなかったことから、*in vivo* での腫瘍成長における主要な律速因子は、血管新生による細胞死の減少であることが示唆された。

【結論】

TCA の慢性曝露は、食道扁平上皮癌の進展を促進させることが明らかとなった。これは、食道扁平上皮癌細胞から産生された TGF- β 1 や VEGF といった血管新生因子が血管新生を促し、細胞死を減少させているためであることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	423	氏名	佐藤 翔
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>食道扁平上皮癌細胞株(ESCC-DR)を用いてタウロコール酸(TCA)の持続暴露の影響を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> のヌードマウス皮下移植について検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ESCC-DR 細胞において、一時的な TCA 暴露および 2 ヶ月暴露にて S 期への移行、増殖速度が上昇し、Akt, Erk の活性化を認めた。 2) 2 ヶ月 TCA 暴露の ESCC-DR 細胞においてのみ Cox2 発現の増加を認め、一時的な暴露の対照細胞に比し細胞増殖活性が高く、TGF-β1, VEGF の mRNA および蛋白発現の増加、HUVEC に対する遊走能刺激が強く、水平方向に伸張する突起の発現および高い浸潤能を示した。 3) <i>in vivo</i> のヌードマウス皮下移植の検討で、2 ヶ月 TCA 暴露の ESCC-DR 細胞移植において形成された腫瘍体積が大きく、壊死部の割合も少なかった。また、CD31 陽性細胞密度が高く、血管新生の亢進が認められた。 <p>本論文は、タウロコール酸 (TCA) 持続暴露の食道扁平上皮癌細胞株(ESCC-DR)の増殖、浸潤能、血管新生に対する影響について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 529 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 27 年 9 月 1 日)</p>			