The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer
Author(s)	谷口, 博一
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49011
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【97】

氏　　名	谷　口　博　一（たに　ぐち　ひろ　かず）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２２３２０　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer （胃癌腹膜播種に対する ets-1 デコイを用いた遺伝子治療）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　野口眞三郎　　教　授　金田　安史

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

進行胃癌において、腹膜播種は最多の再発形式であるが、腹膜播種に対する有効な治療法は確立されていない。ets-1 は細胞増殖、浸潤、血管新生などに関連する遺伝子群の転写因子であり、胃癌を含めた多くの悪性腫瘍において、その高発現と悪性度との相関が報告されている。本研究では、デコイ oligo DNA の投与で ets-1 を抑制することによる胃癌腹膜播種の抑制効果について、胃癌細胞株、ヌードマウス胃癌腹膜播種モデルを用いて基礎的検討を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

・３種類の胃癌細胞株 MKN28、MKN45、MKN74 を用いて免疫染色法により ets-1 蛋白の発現を検討した。いずれの細胞株においても ets-1 の発現は認められたが、MKN45 が最も高発現を示した。一方、MKN28 における ets-1 発現は細胞質に限局した微弱なものであった。

・ets-1 の特異的 DNA 結合配列４塩基を含んだ 20 塩基の二本鎖 oligo を作成し、ets-1 decoy とした（5'-AATTCACCGGAAGTATTCGA-3',3'-TTAAGTGGCCTTCATAAGCT-5'）。Random sequence を用いた scrambled decoy として、20 塩基の二本鎖 oligo を作成した（5'-ATACTACGAGCATATGCATG-3',3'-TATGATGCTCGTATACGTAC-5'）。

・４種類の細胞株 MKN28、MKN45、MKN74、及び HUVEC に ets-1 decoy あるいは scrambled decoy を加えて、MTT assay を施行した。Scramble decoy による有意な増殖抑制は認めなかった。ets-1 decoy では MKN28 と HUVEC に対しては効果を示さなかったが、MKN45 と MKN74 において用量依存性の増殖抑制効果を示し、MKN45 でその効果は顕著であった（ED50＝0.8257 nM）。

・MKN28、MKN45、MKN74 に対して 10 nM のデコイを投与後、核蛋白を抽出し、EMSA を行った。MKN45 と MKN74 において ets-1 decoy による ets-1 binding activity の軽度低下を認め、MKN45 において著明な減少を認めた。

・４週齢のヌードマウスを用い、GFP を導入した胃癌細胞株 MKN45-EGFP を 1×10^6 個、腹腔内投与し、腹膜播種モデルを作成した。翌日より PBS 0.5 ml（control 群）、scrambled decoy 40 nmol/0.5 ml（scramble 群）、ets-1 decoy 40 nmol/0.5 ml（ets-1 群）の腹腔内投与を 7 回、隔日で行った後、播種結節の評価を行った。播種結節の総重量は control 群 60.1±29.7 mg、scramble 群 43.5±17.1 mg、ets-1 群 24.2±18.7 mg であり、ets-1 群では control

群（p＝0.004）、scramble 群（p＝0.0274）のいずれにおいても有意に播種結節の縮小傾向を認めた。control 群と scramble 群の間には有意差を認めていない（p＝0.1405）。

・播種結節に対して PCNA、CD31、VEGF の各免疫染色を施行した。いずれの染色においても ets-1 群で発現の減弱が認められ、ets-1 decoy による播種結節内の増殖抑制、微小血管減少、血管新生抑制効果が示された。

・さらに４週齢のヌードマウスに MKN45-P を 5×10^6 個、腹腔内投与を行い、腹膜播種モデルを作成した。同様に PBS、scrambled decoy、ets-1 decoy の隔日腹腔内投与を行い、生存率を検討した。有意差には到らなかったが、scramble 群と比較して ets-1 群で生存期間の延長傾向が認められた〔P＝0.056〕。

〔　総　　括　〕

In-vitro、In-vivo 実験により、ets-1 デコイの胃癌細胞に対する増殖抑制効果、腹膜播種に対する治療効果が示された。大部分の胃癌組織において ets-1 は高発現していることより、これまで困難であった腹膜播種治療において、ets-1 デコイ治療は有望であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

進行胃癌において腹膜は最多の再発部位となっているが、腹膜播種に対する標準的治療の確立には至っていない。ets-1 は増殖、浸潤、血管新生などと関連するとされる転写因子であり、胃癌を含めた多くの悪性腫瘍において、その高発現と悪性度との相関が報告されている。本研究では、デコイの投与で ets-1 を抑制することによる腹膜播種の抑制効果について胃癌細胞株、ヌードマウス胃癌腹膜播種モデルを用いて基礎的検討を行った。

ets-1 の結合部位を含んだ二本鎖 oligo として ets-1 decoy を作成した。Random sequence である scrambled decoy も同様に二本鎖 oligo として作成した。

４種類の細胞株 MKN28、MKN45、MKN74、HUVEC にデコイを加えて、MTT assay を施行した。ets-1 decoy では MKN45 と MKN74 において増殖抑制を示した。

MKN28、MKN45、MKN74 に対してデコイを投与後、EMSA を行った。MKN45 と MKN74 において ets-1 decoy による ets-1 binding activity の低下を認めた。

ヌードマウスに GFP を導入した胃癌細胞株 MKN45-EGFP の腹腔内投与を行い、腹膜播種モデルを作成した。PBS、scrambled decoy、ets-1 decoy の腹腔内投与を行った後、播種結節の評価を行った。ets-1 群では control 群、scramble 群のいずれにおいても有意に播種結節の縮小傾向を認めた。

播種結節に対して PCNA、CD31、VEGF の各免疫染色を施行した。いずれの染色においても ets-1 群で発現の減弱が認められ、ets-1 デコイによる増殖抑制、微小血管の減少、血管新生抑制が示された。

さらにヌードマウスに MKN45-P の腹腔内投与を行った後、同様に PBS、各デコイの腹腔内投与を行い、生存率を検討したところ、scramble 群と比較して ets-1 群で生存期間の延長傾向が認められた。

ヌードマウスを用いた胃癌腹膜播種モデルにおいて、ets-1 デコイの腹腔内投与によって播種の抑制が認められた。ets-1 の高発現を示す多くの胃癌症例において、困難であった腹膜播種治療に ets-1 デコィ腹腔内投与が有用となりうる可能性が示された。よって、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。