



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

氏 名	谷 口 博 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 3 2 0 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 発現は細胞質に局限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'-AATTACACCGGAAGTATTCGA-3', 3'-TTAAGTGGCCTTCATAAGCT-5')。Random sequence を用いた scrambled decoy とし、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* デコイ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。