

Title	Gene therapy with SOCS1 for gastric cancer induces G2/M arrest and has an antitumour effect on peritoneal carcinomatosis
Author(s)	中塚, 梨絵
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55730
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	中塚梨絵
論文題名 Title	Gene therapy with SOCS1 for gastric cancer induces G2/M arrest and has an antitumour effect on peritoneal carcinomatosis (胃癌に対するSOCS1遺伝子治療はG2/M停止を誘導し、腹膜播種に対する抗腫瘍効果を有する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>胃癌腹膜播種は有効な治療法が確立されておらず、予後不良の疾患である。近年、サイトカインシグナルの制御異常が癌細胞の増殖に関与することが知られており、なかでもSuppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) は癌の標的治療分子の一つとして注目されている。SOCS1は主にJAK/STAT, p38MAPK経路を介して多くの癌種で抗腫瘍効果を示すことが報告されてきたが、その抗腫瘍効果を示す機序について依然不明な点が多い。そこで、胃癌におけるSOCS1の抗腫瘍効果について検討すること、新たな作用機序として細胞周期の制御に与える影響について検討することを目的とした。さらに、動物モデルにおいて胃癌腹膜播種に対するアデノウイルスベクターを用いたSOCS-1遺伝子治療の有効性について明らかにすることを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>①臨床上問題となる腹膜播種を治療対象とするため、動物を用いた腹膜播種モデルを作成することを考慮し低分化型胃癌細胞株を選択した。胃癌細胞株5種類 (MKN45, AGS, KATO-III, NUGC-2, OCUM-1) にアデノウイルスベクターを用いてSOCS1を発現させ、48時間後にMST-8を用いてProliferation assayを行い増殖抑制効果の有無を確認したところ、うち4種類 (MKN45, AGS, KATO-III, NUGC-2) で増殖抑制効果を認めた。増殖抑制効果の高かった3株 (MKN45, AGS, KATO-III) においてアデノウイルスベクターに感染後48時間後にタンパク回収を行い、Caspase-3 fluorometric assayを用いてSOCS1発現によるApoptosisの亢進を認めた。さらにWestern blottingを行い、SOCS1の発現とともにSTAT3のリン酸化抑制及びCleaved caspase-3の発現を認めた。</p> <p>②胃癌細胞株3種類 (MKN45, AGS, KATO-III) においてアデノウイルスベクター (40MOI) を感染させ、24時間後にFACS (flow cytometry) を用いて細胞周期解析を行った。Control (LacZ) 群と比較し、SOCS1発現によりいずれの細胞株においても有意にG2/Mの割合増加を認めた。さらに細胞周期の制御を行うタンパクについてWestern Blottingを行い、SOCS1発現によってChk2のリン酸化が亢進し、CDC25Cのリン酸化、cdc2のリン酸化抑制を介してG2/M停止を誘導することを確認した。SOCS1がG2/M停止を誘導する機序として、細胞周期の制御におけるATR-Chk2経路に注目した。MKN45に対してSOCS1を発現させ、24時間後にタンパク回収を行い、抗ATR抗体を用いた共タンパク免疫沈降法を用いてSOCS1がATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) に結合することを確認した。ATRをsiRNAによって発現抑制を行うと、SOCS1によるChk2のリン酸化は抑制された。さらにFACSを用いた細胞周期解析を行い、ATRの発現抑制下ではSOCS1の強制発現によるG2/M停止の誘導が抑制されることを確認した。</p> <p>③動物モデルを用いた胃癌腹膜播種に対するSOCS1遺伝子治療の効果を確かめた。</p> <p>ICR nu/nuマウス (4~6W, Femal) に対してルシフェラーゼ発現胃癌細胞株 (MKN45-Luc) 3.0×10^6 cellsを腹腔内注射し、腹膜播種モデルを作成した。腹膜播種病変について胃癌細胞移植よりday21にルシフェリンを腹腔内投与し、In vivo imaging system (IVIS) を用いて評価した。腹膜播種モデルに対してアデノウイルスベクター (1.0×10^8 pfu/500 μl) を週2回、計8回腹腔内投与を行い、治療効果についてIn Vivo Imaging System (IVIS) を用いてday35及びday49において光量を測定し経時的な腹腔内病変の評価を行った。Control群 (n=8) と比較し、SOCS1治療群 (n=7) はday49において光量で有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた (p=0.0281)。さらに摘出した腫瘍重量においてもSOCS1群は有意な腫瘍増大抑制効果を認めた (p=0.0106)。また、播種病変を用いたWestern BlottingによりSOCS1治療群ではSOCS1の発現、Chk2のリン酸化亢進を確認した。播種病変に対する病理組織学的検討において、SOCS1, Ki-67の免疫染色を行い、SOCS1治療群ではSOCS1の発現、Ki-67の低下を認めた。さらにTUNEL染色により、SOCS1治療群ではApoptosisの亢進を認めた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>胃癌細胞株5種類中4種類に対してSOCS1発現は抗腫瘍効果を示した。SOCS1はATRと結合し、Chk2をリン酸化することでG2/M停止を誘導し、抗腫瘍効果を示した。</p> <p>腹膜播種モデルに対するアデノウイルスベクターを用いたSOCS1遺伝子治療は腫瘍重量、光量ともに癌増殖抑制効果を示した。胃癌腹膜播種に対するSOCS1遺伝子治療は有用であり、今後の臨床応用が期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中塚 梨絵

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 土岐 祐一郎
	副 査	大阪大学教授 野々村 祝夫
	副 査	大阪大学教授 猪俣 勇貴

論文審査の結果の要旨

Suppressor of cytokine signaling 1(SOCS1)はサイトカインシグナルを制御する細胞内分子の一つであるが、様々の癌種においてサイトカインシグナルの異常が関与していることが報告され、癌に対する新規治療標的として注目されている一方、JAK-STAT3, p38MAPK以外の作用機序が存在することが示唆されていた。本研究は、*in vitro*実験で胃癌に対するSOCS1の抗腫瘍効果および新たな作用機序として細胞周期の制御に与える影響について検討した。さらに*in vivo*実験で胃癌腹膜播種モデルマウスを作成し、アデノウイルスベクター腹腔内投与の治療効果を明らかにすることを目的とした。SOCS1は細胞周期の制御においてATR-Chk2経路を介したG2/M arrestを誘導し、抗腫瘍効果を示すことを明らかとした。さらに、*in vivo*実験からSOCS1遺伝子が抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。胃癌に特徴的な再発形式である腹膜播種に対する抗腫瘍効果を示した本研究は、今後の治療応用に有益であり、学位の授与に値すると考えられる。