The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Overexpression of glypican-1 implicates poor prognosis and their chemoresistance in oesophageal squamous cell carcinoma
Author(s)	原, 尚志
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69268
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、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

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　原　　尚志

論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主　査	大阪大学教授	土岐 祐一郎
	副　査	大阪大学教授	猪子 寿之
	副　査	大阪大学教授	野村 祐夫

論文審査の結果の要旨

本研究では、難治性癌である食道癌を対象としたプロテオーム解析の結果より、食道癌細胞で高発現である膜タンパクとしてGlypican-1（GPC1）を同定した。臨床病理学的検討より、食道癌患者においてGPC1高発現は、低発現に比べ全生存期間は短く、多変量解析の結果から独立した予後不良因子であった。また、術前化学療法施行症例の検討により、GPC1が化学療法耐性と関係している可能性が考えられた。
更に、細胞実験によりGPC1発現株はシスプラチン（CDDP）投与下において、非発現株に比べて薬剤耐性が強いことが示された。そして、その機序について検討した結果、CDDP耐性のメカニズムとして既知のMAPKシグナル及びその下流のBcl-2ファミリーのリン酸化亢進を介したapoptosis回避機構が、GPC1の抑制により働かなくなることが明らかとなりその一因と考えられた。
本研究により、食道癌におけるGPC1高発現が予後不良因子であることが明らかになった。更に、その機序の一つとしてGPC1発現細胞ではMAPKシグナル及びBcl-2シグナルにおけるリン酸化亢進を介してapoptosis回避機構を形成し、化学療法耐性に繋がる可能性が示された。以上の新知見において学位に値すると考える。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	原　尚志
論文題名 Title	Overexpression of glypican-1 implicates poor prognosis and their chemoresistance in oesophageal squamous cell carcinoma （食道扁平上皮癌におけるGlypican-1高発現は、予後不良及び化学療法耐性を示唆する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

我が国における食道扁平上皮癌（oesophageal squamous cell carcinoma; ESCC）の治療成績は様々な集学的治療により改善傾向にあるが、薬物治療については依然従来の殺細胞性抗癌剤が中心であり、特異的分子機構に着目した治療薬の開発は遅れている。我々はESCC特異的に発現している分子を探索する目的で、ESCC細胞株を用いて、膜型タンパクに絞りiTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification）法を用いた網羅的タンパク解析を実施し、ESCCに特異的に発現する分子として"Glypican-1"（GPC1）を同定した。GPC1はGPIアンカーを通じて細胞膜上に発現するheparan sulfate proteoglycanの一種で、細胞周期制御、血管新生促進、 増殖因子の活性制御などに関与する事が報告されている。また、Heparin binding growth factorの共役受容体として成長因子の受容体への結合を促進することが知られている。本研究では今後の臨床応用を念頭に、ESCC切除検体におけるGPC1の発現状況及びその臨床的意義を検討した。更に、上記の検討により示唆されたGPC1の化学療法耐性への関与について、細胞株を用いてその機序を明らかにすることを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

I.　臨床検体を用いた検討

方法　2001年から2013年に当科で根治切除を施行したESCC175例の切除検体を用いて、抗GPC1抗体による免疫組織染色（IHC）を施行した。染色結果は、発色強度・染色割合よりスコアリングし、高発現群・低発現群の2群に分類し臨床病理学的検討を行った。

結果　IHCによる染色では、細胞膜を中心として175例中174例（99.4%）で発現を認めた。全症例を低発現群:99例、高発現群:76例の2群に分けて検討したところ、GPC1の発現と患者背景因子及び腫瘍学的因子に相関を認めなかった。全生存期間についての検討（Kaplan-Meier法）では、GPC1高発現群は低発現群に比べて有意に生存期間が短く($p<0.0001$)、多変量解析(Cox proportional hazard model)の結果、GPC1高発現は予後不良因子となることが明らかになった。さらに、術前化学療法を施行した97例について組織学的効果とGPC1発現の関係を検討したところ、GPC1高発現群で組織学的効果が不良であり、化学療法耐性に関与する可能性が示唆された。そこで、検討2においてGPC1発現と化学療法耐性の関連性について、*in vitro*の実験系を用いて検証した。

II.　細胞株を用いた検討

方法　GPC1発現株であるTE-14(ESCC細胞株)よりCrisper-Cas9システムを用いたGPC1ノックアウト株を、またGPC1弱発現株であるLK-2(肺扁平上皮癌細胞株)よりプラスミドDNAトランスフェクションを用いて、GPC1強制発現株を樹立した。これらの細胞株を用いてDocetaxel(DTX)、Cisplatin(CDDP)、5-FUの3剤に対するproliferation assayを行った。また、抗癌剤によるapoptosis誘導をCaspase-3活性によって測定するLuminescent assayを用いて検討し、GPC1発現状況によるapoptosis制御シグナルの変化をWestern blotを用いて検討した。

結果　proliferation assayの結果、DTX及び5-FUに対する薬剤感受性にGPC1発現による差は認めなかった。一方、CDDP投与におけるIC_{50}値は、GPC1高発現株で低発現株の約2倍に上昇し、薬剤耐性が示された。GPC1高発現株においてCDDP投与によるapoptosisの誘導が抑制された。細胞内シグナルの検討では、GPC1高発現株でCDDP投与によりMAPKシグナルを構成するMEK及びERKのリン酸化亢進を認めた。更に、MAPKシグナルの下流シグナルであるBad及びBcl-2のリン酸化亢進を認め、apoptosis抑制の一因になっていることが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

ESCC特異的分子として同定したGPC1の高発現は食道癌の予後不良因子の1つであり、GPC1はMAPKシグナル及びBcl-2の活性化を介してapoptosisを抑制し、化学療法耐性を惹起する可能性が示唆された。