

氏名	西沢 隆		
学位の種類	博 士（生物科学）		
学位記番号	博 甲 第 9 4 6 3 号		
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	In Vitro and In Vivo Analysis of DGC-specific RHOA Mutations on Tumor Development (Diffuse型胃癌に特異的な変異型RHOAの造腫瘍性に関するin vitro及びin vivo解析)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	原田 隆平
副査	筑波大学助教	博士（工学）	鶴田 文憲

論 文 の 要 旨

胃癌は日本人男性の中で肺癌に次ぐ第2位、女性でも第4位であり、5年生存率はわずか19%と、非常に予後の悪い癌である。胃癌はintestinal型 (intestinal gastric cancer; IGC) と diffuse 型 (diffuse gastric cancer; DGC) に大別されるが、DGCはIGCと比べて隆起性に乏しく早期発見が難しいうえ、胃壁に沿って浸潤増殖し腹膜にも播種するため予後が悪く、一刻も早い新たな治療薬の開発が求められている。

著者はDGCの網羅的ゲノム解析を行い、IGCと比較検討を行った結果、*RHOA* 遺伝子がDGC特異的に変異していることを発見した。また *RHOA* 機能を負に調整する *ARHGAP* と細胞間接着に関与する *CLDN* の融合遺伝子 *CLDN18-ARHGAP* (*CLG*) が、DGC特異的に存在していることが報告されたため、著者は *RHOA* のシグナル伝達がどのようなメカニズムでDGCの造腫瘍性に寄与しているのかを *in vitro* および *in vivo* の両面から解析した。

第1章で著者は、変異型 *RHOA* が細胞の生存や移動能に及ぼす影響を *in vitro* で解析した。野生型 *RHOA* および様々な部位に *RHOA* 変異を有する癌細胞株を用い、*RHOA* の必須性を評価した結果、特定の変異をもつ細胞において *RHOA* は生存に必須であることが明らかになった。さらに、*RHOA* が生存に必須であった癌細胞において、*RHOA* 発現を抑制すると *RHOB* と *RHOC* の発現量が増加し、その下流分子である *MLC2* のリン酸化、そしてエフェクター分子である Rho-associated protein kinase (*ROCK*) の活性化、アクチンストレスファイバーが顕著に増生する事を明らかにした。また *ROCK* を阻害すると、細胞死は抑制されたため、*ROCK* の活性化が細胞の生存に重要であることが判明した。

次に *CLDN18-ARHGAP* (*CLG*) 融合遺伝子について、細胞の生存と移動能への影響を解析した。その結果、*CLG* 融合遺伝子は、変異型 *RHOA* のノックダウンによる細胞死をレスキューし、*ROCK* 活性も抑制した。*CLG* 融合遺伝子の *GAP* ドメインに変異を導入すると、上記の効果が失われたことから、*GAP* ドメインが発がん性と移動能に重要である事が判明した。以上の結果より、DGCの造腫瘍性における *RHOA* および *CLG* の機能の一端が解明され、その治療法として *ROCK* を活性化させることが重要であることが示唆された。

第2章で著者は、*RHOA* 変異の造腫瘍性を評価するための *in vivo* モデルを構築した。まず、変異型 *RHOA* をもつ胃噴門部癌細胞株 OE19 を *SCID* マウスの皮下または胃壁漿膜化組織に移植し、皮下移植モデルと同所移植モデルを構築した。両移植方法で形成された腫瘍について、病理組織学的手法ならび

に、癌細胞と間質細胞との相互作用を解析する CASTIN (CAncer-STromal Interactome) 解析を実施した。CASTIN 解析とは、ヒトの遺伝子発現変化から癌細胞の挙動を、マウスの遺伝子発現変化から間質細胞の挙動を評価し、さらにはリガンドと受容体の関係性から細胞間相互作用によるシグナルの方向性を明らかにするものである。

両移植モデルの腫瘍を組織学的に比較検討したところ、皮下移植腫瘍は間質組織に乏しく、大きな腺腔構造を形成しており、近接組織からはっきり区別されていた。一方で、同所移植腫瘍は近接組織との境界面があいまいで、間質組織が豊富に浸潤した小さな腺腔構造を形成していた。これらの腫瘍から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的 RNA 発現解析を行い、ヒト由来の癌細胞の発現プロファイルとマウス由来の間質細胞の発現プロファイルを CASTIN 解析した。結果、同所移植モデル選択的に増加しているリガンドと受容体の相互作用が複数同定された。これらの結果より、OE19 の皮下移植モデルではなく同所移植モデルが、より浸潤性が高く、DGC に特徴的な癌と間質の相互作用を示すことが明らかになった。

第3章で著者は、第2章で構築した同所移植モデルを用いて、RHOA 変異群と野生型 RHOA 群を移植した場合の CASTIN 解析を実施した。Gene set enrichment 解析の結果、野生型 RHOA 群では炎症や hypoxia に関連する経路が enrich していたのに対し、RHOA 変異群では代謝制御、細胞周期に関連する経路が enrich していた。また RHOA 変異群では ROCK シグナルに関連する遺伝子群が抑制されており、一連の結果は変異型 RHOA による ROCK 阻害に関連している可能性を示唆した。一方、間質組織の発現変化は RHOA 変異群と野生型 RHOA 群では顕著な差は認められず、腫瘍側の貢献の大きいことが示唆された。

組織病理学的解析の結果、RHOA 変異群では野生型 RHOA 群に比べ、小さな癌包巣がより多く観察された。加えて、RHOA 変異群では血管形成の増生や腫瘍組織内へのマクロファージの浸潤亢進が認められ、そして腫瘍の浸潤先端部において宿主による抗腫瘍性の反応が野生型 RHOA 群に比べて弱い傾向であった。これらの病理像は、臨床における RHOA 変異型 DGC の粘膜下浸潤様式と類似しており、変異型 RHOA が DGC の形質獲得に機能的に貢献していることが明らかになった。

審 査 の 要 旨

本研究で著者は、DGC に特徴的な変異である RHOA の機能的な造腫瘍性への貢献を、*in vitro* と *in vivo* の両面から解析した。その *in vitro* の解析によって、変異型 RHOA および RHOA の抑制遺伝子 CLG が細胞の生存や運動を制御する分子メカニズムを明らかにした点は高く評価できる。また *in vivo* モデルでは、間質細胞との相互作用など高次の機能解析を展開しており、臨床 DGC に近い高次の実験モデル系を構築した点は高く評価できる。本研究によって構築された DGC 実験モデルは、解析が困難であった DGC の詳細な分子解析を可能にし、予後の悪い DGC の新たな治療法開発に貢献するものとして高く評価できる。

令和2年1月29日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。