

氏 名（国籍）	ミラ ゴーシュ（インド）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 3780 号		
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 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	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	MOLECULAR AND BIOLOGICAL STUDIES IN GALLBLADDER CANCER (胆嚢がんに関する分子生物学的研究)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	田 中 直 見
副 査	筑波大学助教授	医学博士	内 田 和 彦
副 査	筑波大学助教授	博士（医学）	堤 明 人
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	金 岡 恒 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

分子生物学的手法を用いて、胆嚢癌の成因、特徴を 4 つの検討で解明することを目的とする。

実験 1 胆嚢癌における cyclooxygenase (COX) の発現

(目的)

prostaglandin 生成に関係している COX が、胆嚢癌の発癌や進展にどのように関与しているかを明らかにする。

(対象と方法)

- 1) 胆嚢癌, 慢性胆嚢炎, Xanthogranulomatous 胆嚢炎, 正常胆嚢組織はインドと日本での切除標本より得た。
- 2) 組織標本を作成して COX1, COX2 の発現を免疫染色法にて確認した。

(結果)

COX1 は全ての組織において均一に染まり、COX2 は組織型に関係なく不均一に染色された。COX2 の発現は胆嚢癌のうち、分化型癌と同様に正常組織でも見られたが、未分化型癌では発現が弱かった。

(考察)

胆嚢癌では COX2 の発現には多くの因子が関与しているため、他の消化器癌で言われている COX2 は進行癌での発現が強いとの説を示唆する所見は見られなかった。

(結論)

COX2 の発癌には多くの因子が関与しており、COX2 は胆嚢癌の発癌過程には直接的には関係しない。

実験 2 胆嚢組織における MUC1 核蛋白の発現

(目的)

糖蛋白の 1 つである MUC1 の発現を胆嚢癌, 慢性胆嚢炎, 正常胆嚢組織で検討する。

(対象と方法)

胆嚢癌 88 例，慢性胆嚢炎 45 例，正常胆嚢 5 例の手術標本からホルマリン固定後，組織標本を作製した。MUC1 核蛋白に対する抗体で免疫染色し，鏡検に供した。

(結果)

- 1) MUC1 の発現は正常胆嚢上皮や慢性炎症胆嚢上皮に比べて胆嚢がんで有意に高かった。
- 2) MUC1 の免疫組織染色性から観た発現性には偏在 (polarized) 性と非偏在 (depolarized) 性の二様式が観察された。非がん病変 (正常と慢性炎症) と早期がん (T1) 病変では偏在性発現が有意に多く，進行がんの上皮層では (T2 ~ T4) 非偏在性が有意であった。
- 3) 胆嚢の粘膜下層に浸潤した胆嚢がん細胞では MUC1 の染色 (発現) 性は非偏在性が有意であった。
- 4) 胆嚢がんの分化度や腫瘍内微小静脈浸潤と MUC1 の発現頻度や発現様式との間には有意な相関は無かった。
- 5) これに対して，腫瘍内の微小リンパ管浸潤の有無と発現様式とは有意に相関し，リンパ管浸潤陽性では非偏在性発現が有意であった。しかし，MUC1 の発現頻度と微小リンパ管浸潤の有無は相関していなかった。

(結論)

MUC1 の偏在性の発現は

- 1) 胆嚢がんの進展と
- 2) 腫瘍内微小リンパ管浸潤能

に関与していることが示された。

実験 3 胆嚢癌細胞株の確立と特徴

(目的)

胆嚢癌細胞株を確立し，その特徴を明らかにする。

(対象と方法)

細胞株は病理学的に確認された日本人胆嚢癌組織から作製した。

細胞株の成長能，コロニー形成能，腫瘍マーカー及び発癌遺伝子の発現，染色体分析，細胞サイクルパラメータ解析，腫瘍マーカーの測定，comparative genomic hybridization (CGH) 解析を行った。

(結果)

5 種類の細胞株 (TGBC-1, TGBC-2, TGBC-14, TGBC-44, TGBC-24) を確立した。

すべての細胞株は順調に成長をとげ，細胞機能を有していた。

すべての細胞株は DNA index では aneuploid であった。

細胞株はコロニー形成能があり，未検の TGBC-14 を除いてヌードマウスに腫瘍を形成した。

FACS を用いた flow cytometry で 5 種類すべての細胞株で CEA と CA19-9 を発現していた。

同じく，flow cytometry 解析で 5 種類すべての細胞株細胞表面に MUC1 は強発現し，cerbB2 は弱発現していたが，c-kit は測定できなかった。

染色体分析で腫瘍 DNA のコピー数の増加や減少，転座，誘導，その他の異常などがみられたが，典型的マーカー染色体は見られなかった。

しかしながら，5 種類の細胞株のうち 4 種類で 5p で DNA コピー数が増加していた。

(考察)

本研究では 5 種類の胆嚢癌細胞株で 3 種類以上で異常が見られた箇所について検討した。

とくに 5 種類中 4 種類で異常がみられた 5P14-qtr の増加は，HTERT (catalytic component of human telomerase) と関係している可能性が示唆され，TGBC 胆嚢癌株において重要な役割を果たしている。

(結論)

本研究で確立した5種類の細胞株は胆嚢癌の機能を十分に有しており、研究に効果的な手段である。胆嚢癌の発癌に重要な役割をはたす遺伝子の特定には更なる探求が必要である。

実験4 胆嚢癌細胞株におけるモータリンの発現

(目的)

モータリンは heat shock protein70 の1つであり、細胞の増殖、分化をはじめいろいろな機能を有している。

胆嚢癌細胞株におけるモータリンの発現を検討する。

(対象と方法)

7種類の胆嚢癌細胞株 (TGBC1, TGBC2, TGBC14, TGBC24, TGBC44, Mz-Cha-1, Mz-Cha-2) におけるモータリンの発現を免疫染色で測定した。

モータリンの発現を Laser scans cytometry で測定し、細胞周期との関係を検討した。

(結果)

モータリンは7種類の細胞株すべてにおいて核周囲パターンとして発現していた。正常細胞ではモータリンは細胞質パターンとして発現した。

モータリンの発現は原発腫瘍由来と転移腫瘍に関係なく発現した。

各細胞株の細胞周期の各相でモータリンは存在したが、ある細胞では陽性である細胞では発現が見られなかったことから、モータリンの発現は細胞周期と関係しない。

(考察)

上皮癌におけるモータリンの発現をみた最初の検討である。

(結論)

胆嚢癌細胞株におけるモータリンの発現を検討したが、癌との関係は明らかにできなかった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はこれまで研究が遅れていた胆嚢癌の特徴をインドと日本の手術標本及び著者らが確立した細胞株を用いて4種類の実験、すなわち、1. 胆嚢癌における cyclooxygenase の発現、2. 胆嚢組織における MUC1 核蛋白の発現、3. 胆嚢癌細胞株の確立と特徴、4. 胆嚢癌細胞株におけるモータリンの発現、で検討したものである。

多大な時間を要した研究であるが、胆嚢癌の発現、進展に直接関係する所見は得られなかった。しかしながら、確立した胆嚢癌細胞株を用いた更なる研究の基礎を築いた点で評価できる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。