




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 661 号	氏名	黒木秀作
審査委員会委員	主査氏名	瀧田文彦	①
	副査氏名	森晋二郎	①
	副査氏名	河野康志	①
<p>論文題目 Downregulation of ZNF395 drives progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through enhancement of growth potential (ZNF395 の発現低下により膵管癌は増殖能が亢進して進展する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Pathobiology</p> <p>論文要旨 【緒言】 膵上皮内癌から浸潤癌への進展の分子メカニズムは十分に解明されていないが、進展の過程において 8 番染色体短腕が欠失すること (8p loss) が明らかになっている。本研究では、8p loss に伴って発現が低下する ZNF395 遺伝子に注目し、膵癌の進展過程におけるその役割を検討した。 【研究対象および方法】 8p loss によって ZNF395 の発現が低下しているヒト膵癌細胞株 PANC-1 を用いて、ドキシサイクリン (Dox) 存在下に ZNF395 の発現が誘導される細胞株 (PANC/ZNF) を樹立した。この細胞株を用いて、ZNF395 の強制発現が細胞増殖、アポトーシス、細胞周期へ与える影響を解析した。また、ZNF395 抗体を用いて 90 例の膵管癌組織の免疫染色を行い、その発現レベルと臨床病理学的因子、予後との関連性について検討した。 【結果】 PANC/ZNF では Dox 誘導性に ZNF395 が発現されることを確認した。PANC/ZNF ではコントロール細胞株に比べ、細胞増殖の抑制が認められた。両者間でカスパーゼ活性の違いは認めなかったが、PANC/ZNF では G1 期から S 期への進行遅延が認められ、その機序として c-Jun N-terminal Kinase (JNK) の活性化の関与が示唆された。膵癌の前癌病変と考えられている膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) では多くの症例で ZNF395 の発現レベルが正常組織と同等であったのに対して、浸潤癌部では半分以上の症例で発現レベルが低下していた。また、高・中分化癌に比べて、低分化癌では発現レベルの低下を示す症例数が有意に多いことが確認された。 【結論】 ZNF395 の発現低下により膵管癌は増殖能が亢進して進展する。</p> <p>学位申請者は、本研究において膵癌の進展過程における ZNF395 の役割を明確に示した。このため、審査員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第661号	氏名	黒木秀作
審査委員会委員	主査氏名	濱田文彦	
	副査氏名	森晋二郎	
	副査氏名	河野康志	

学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

- ① ZNF395 に注目した理由は？
- ② 膵癌の進展における 8p loss は両方の染色体で起こるのか？あるいは片方のみで起こるのか？
- ③ Panc-1 では 8p loss が片方の染色体のみに起こっているにもかかわらず ZNF395 の発現が Western blotting で確認できないのはなぜか？正常細胞における発現量はどうか？
- ④ ZNF395 は上皮細胞、間葉系細胞のどちらに発現するのか？
- ⑤ ZNF395 の細胞内での局在部位は細胞膜、細胞質、核内のうちどこなのか？
- ⑥ ZNF395 の DNA 結合ドメインは同定されているのか？
- ⑦ Panc-1 の倍加時間はどのくらいか？
- ⑧ ZNF395 の発現によって JNK がリン酸化されているが、その活性化に関する上流からのカスケードはどのようなになっているのか？
- ⑨ JNK を不活化すると細胞の増殖機能が回復するとのことだが、Fig.3e では完全回復にはなっていない。この理由は？
- ⑩ JNK と比較して p38 の方がより発現量が多い様に見えるが、それでも JNK に着目した理由は？
- ⑪ Table 1 の Stage 表記に誤りはないか？ (IA/IIA と IIA/IV の部分)
- ⑫ 細胞周期の進行を抑制する蛋白質は検討されているが、促進的に働くサイクリン等の蛋白質の発現は検討しているか？
- ⑬ 膵癌組織では 8p loss がある細胞系列、ない細胞系列が存在するということが、これら 2 種の細胞系列が同時に存在するモザイク状態が確認されているのか？悪性腫瘍として発生、進展していく過程で両方が存在する可能性はあり得るのではないか？
- ⑭ ZNF395 の発現レベルと膵癌の組織型や予後との関連性に触れているが、浸潤癌ではサンプルの主体が未分化癌となり、予後も不良になると思うのだが、そのバイアスは？
- ⑮ 膵癌組織染色において、ZNF395 と細胞増殖マーカーあるいは抗 p-JNK 抗体と二重染色を行えば論文の前半のデータからの結論がより強固になると思われるが、実験は行ったか？
- ⑯ ZNF395 が癌抑制遺伝子ということをお願いするのであれば、その遺伝子を過剰発現した場合の表現型を見るよりも、完全に欠失させた表現型を見る方が直接的ではないか？

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 黒木 秀作

論 文 題 目

Downregulation of ZNF395 drives progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through enhancement of growth potential

(ZNF395 の発現低下により膵管癌は増殖能が亢進して進展する)

要 旨

【緒言】

膵上皮内癌から浸潤癌への進展は、膵癌患者の予後を増悪させる重要な要因である。しかしながら、その分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。我々はこれまでに、浸潤癌への進展過程において 8 番染色体短腕 (8p) の欠失が関与しており、それに伴う DUSP4 の発現低下が癌細胞の浸潤能獲得に寄与することを報告してきた。本研究では、8p 欠失に伴い DUSP4 と同様に発現が低下する ZNF395 に注目し、膵癌細胞における機能的意義について検討したので報告する。

【研究対象および方法】

8p 欠失により ZNF395 の発現が低下しているヒト膵癌細胞株 PANC-1 を用いて、ドキシサイクリン添加により誘導的に ZNF395 を発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いて ZNF395 の誘導性発現が細胞増殖能やアポトーシス活性、細胞周期制御へ及ぼす影響を解析した。また、当大学附属病院で切除された 90 例の膵管癌組織ブロックを用いて ZNF395 の免疫組織化学を行い、発現レベルと臨床病理学的因子や予後との関連性について検討した。

【結果】

PANC-1 にベクターのみを導入したコントロール株 (PANC/vec) と、ZNF395 を誘導性に発現する細胞株 (PANC/ZNF) について、ウエスタンブロットと免疫細胞染色を行い、PANC/ZNF でドキシサイクリン誘導性に ZNF395 が発現していることを確認した。次に、これらの細胞株を用いて細胞増殖能を比較したところ、PANC/ZNF では細胞増殖の抑制が認められた。そこで細胞増殖抑制のメカニズムを明らかにするために、カスパーゼ活性と細胞周期制御について比較検討した。その結果、PANC/ZNF と PANC/vec にカスパーゼ活性の違いは認めなかった。しかし、細胞周期解析により PANC/ZNF における G1 期から S 期への進行遅延を確認した。

臨床検体を用いた免疫組織化学では、正常膵管上皮の発現レベルを基準として、癌組織における ZNF395 発現を、亢進、同等、低下の 3 段階で評価した。膵癌の前癌病変と考えられている膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) では多くの症例で発現レベルが同等であったのに対して、浸潤癌部では半分以上の症例で発現レベルが低下していた。また、高・中分化癌に比べて低分化癌では発現レベルが低下している症例が有意に多かった。さらに、ZNF395 の発現が低下している患者群は低下していない患者群に比べて予後不良となる傾向を示した。

【考察】

本研究で、ZNF395 の誘導性発現が膵癌細胞の増殖能を抑制すること、そのメカニズムとして ZNF395 が細胞周期の進行を G1 期で停止させることを明らかにした。また、臨床検体を用いた免疫組織化学により、浸潤癌部では ZNF395 の発現が低下すること、低分化癌でより高頻度に低下することを確認した。これらの結果より、ZNF395 は膵管癌の進展過程において、新規のがん抑制遺伝子として機能することが示唆された。

【結語】

膵管癌における ZNF395 の発現低下は、細胞増殖能を亢進させ、膵管癌の進行に寄与する。