

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 清水 浩紀

### 論文題目

## The expression and role of Aquaporin 5 in esophageal squamous cell carcinoma.

### 論文内容の要旨

アクアポリン（以下、AQP）は水を特異的に通過させるチャネルとして1992年に初めて報告された。AQPは哺乳類において現在13種のアイソフォームが報告されている膜6回貫通蛋白である。AQPは様々な臓器組織に発現しており、代表例として腎臓での尿濃縮、腺組織での分泌、血液脳関門での水輸送などといった生理学的役割を担っていることが知られている。さらに近年、いくつかの臓器の腫瘍進展に関与していることが明らかにされてきた。しかしながら、食道扁平上皮癌におけるAQP5の関連性を示した報告は存在しない。今回、申請者らは食道扁平上皮癌におけるAQP5の発現と細胞増殖、細胞死、他遺伝子発現との関連を細胞株で、また組織におけるAQP5の発現と病理組織学的因子、予後との関連を食道扁平上皮癌の手術標本を用いて検討した。

低分化型ヒト食道癌細胞株であるTE2, TE5, TE9, TE13, KYSE70、中分化型ヒト食道扁平上皮癌細胞株であるKYSE170より抽出したタンパクを用い、AQP5タンパク発現量をウェスタンブロット法により解析したところ、TE2ならびにTE5がAQP5高発現株であった。両細胞株に対し、AQP5 siRNAを用いてトランスフェクションを行い（AQP5 siRNA群）、細胞周期、細胞増殖や細胞死を解析、比較した。同時にcontrol siRNAにてトランスフェクションを行い、コントロールとして使用した（Control siRNA群）。Control siRNA群と比較してAQP5 siRNA群では、G1期の割合の有意増加、S期ならびにG2/M期の割合の有意減少を認めた。さらに、AQP5 siRNA群において細胞増殖数の有意減少、ならびに細胞死解析により細胞死（特に後期相）の有意増加を認めた。これらの結果より、AQP5発現低下は結果として腫瘍増殖に対して抑制的に作用することが示唆された。

次にTE5細胞株のAQP5 siRNA群、Control siRNA群それぞれより抽出したtotal RNAを用いて、mRNA発現マイクロアレイ解析を行った。両サンプル間での2倍以上の発現変化を有意な変化と定義し、それらのデータを基にIngenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いてネットワーク解析を行った。マイクロアレイ解析により両群間でmRNA発現が2倍以上の有意変化を示した遺伝子数は2132であり、AQP siRNA群においてうち1472遺伝子は上昇、660遺伝子は低下していた。

ネットワーク解析により、“Cellular Growth and Proliferation”がトップネットワークの一つとして抽出され、2132遺伝子のうち398遺伝子は細胞増殖・細胞死と関連するものであった。この結果の確認として、有意上昇を認めたCCND1、TP53INP1、CXCR7、SERPINB9、有意低下を認めたCDKN1A、CELF2の遺伝子発現量をリアルタイムqRT-PCR法にて解析したところ、それぞれマイクロアレイ解析結果と同様の結果を得た。これらの結果より、AQP5遺伝子の発現量が腫瘍増殖・細胞死に関わる多数の遺伝子発現に関与していることが示唆された。

さらに、当院における1998年から2009年までの術前放射線治療を施行していない食道扁平上皮癌根治切除68例を対象とし、AQP5の免疫染色を行った。各サンプルに対してAQP5染色の強度を陰性(0)、弱陽性(1)、中等度陽性(2)、強陽性(3)の4段階に、陽性範囲を0-10%(0)、11-30%(1)、31-50%(1.5)、51%以上(2)の4段階に分類し、それぞれ掛け合せた値の最大値をサンプルのスコア値とした。スコアが3以上をAQP5高発現、3未満をAQP5低発現と定義し、病理組織学的因子や予後との関連について検索した。その結果、AQP5高発現群は41例、低発現群は27例であった。AQP5の発現は正常食道上皮では認めず、上皮内癌には認められた。また同標本にp21ならびにcyclin D1の免疫染色も施行したところ、興味深いことにAQP5とp21は逆、AQP5とcyclin D1は同様の染色傾向を示し、これらの結果はマイクロアレイ解析の結果と一致するものであった。病理組織学的因子との関連性について、AQP5高発現群では有意に腫瘍径が大きく、分化型が多い傾向を認めた。3年無再発生存率はAQP5高発現群で53.7%、低発現群で77.8%と有意に前者で予後不良であった。3年全生存率はAQP5高発現群で65.9%、低発現群で81.5%と有意差はなかったものの前者で予後不良の傾向が見られた。再発リスク因子としてAQP5高発現群はリンパ管侵襲陽性、血管侵襲陽性、リンパ節転移陽性と共に単変量解析により抽出されたが、多変量解析では独立した再発リスク因子としてリンパ節転移陽性のみが抽出され、AQP5高発現群は抽出されなかった(p値=0.159)。

申請者らの本研究は、世界で初めて食道扁平上皮癌の腫瘍進展におけるAQP5の役割・意義をヒト細胞株・組織を用いて解析したものであり、これらの結果より将来的にAQP5は食道扁平上皮癌の腫瘍進展のバイオマーカー、治療対象となり得る可能性を秘めていることを考慮すると申請者らの研究は大変意義深いものであると考えられる。