

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

長宗我部 基弘

専攻分野：病理病態学

コース：

指導教授：小池 淳樹

主論文の題目：

**SIRT1 Expression is Associated with Cell Proliferation
in Angiosarcoma**

(SIRT1 の発現は血管肉腫の細胞増殖に関連する)

共著者：

Akira Noguchi, Masahiro Hoshikawa, Mikio Masuzawa,
Masayuki Takagi

緒言

軟部腫瘍では、良性腫瘍の頻度が高く、悪性腫瘍の頻度は比較的低い。血管肉腫は、成人の悪性軟部腫瘍の1%程度を占める腫瘍で、血管あるいはリンパ管由来の腫瘍と考えられており、極めて悪性度が高いことが知られている。病理組織学的に血管肉腫は、正常組織や良性疾患との類似性を有することがあり、時としてその診断に難渋することがある。

Sirtuin 1 (SIRT1) 蛋白はヒストン脱アセチル化酵素で、細胞周期に影響を与えることが知られている。また、癌抑制遺伝子として知られている p53 遺伝子を脱アセチル化することが報告されており、腫瘍増殖活性に関与することが知られている。これまで種々の腫瘍で検討がされてき

ており、胃癌では SIRT1 の発現とその進行度の相関、頭頸部扁平上皮癌では SIRT1 の発現と生命予後が相関するなどの報告がなされている。軟部腫瘍においては、血管肉腫を含む肉腫の多くでは SIRT1 の発現がみられるが、分化型脂肪肉腫や良性疾患である血管腫ではその発現がみられないとする報告もあり、現状では一定の見解は得られていない。また、肉腫における SIRT1 の発現がその予後と相関するとの報告もみられる。そこで今回、血管肉腫の培養細胞において、SIRT1 の発現をノックダウンした際の増殖活性の変化について検討を行うとともに、血管肉腫と血管腫の臨床検体での SIRT1 の発現を併せて検索し、SIRT1 の血管肉腫における役割を検討した。

方法・対象

検討に用いた血管肉腫培養細胞 (ISO-HAS-B) は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクから分与された。まず、培養細胞での SIRT1 蛋白の発現をウエスタンブロット法により確認した。次に、SIRT1 蛋白の発現を短鎖干渉 RNA (siRNA) を用いた RNA 干渉法によりノックダウンし、ウエスタンブロット法により蛋白レベルでの発現の変化を評価した。さらに、この SIRT1 ノックダウンの条件下で、細胞増殖能の変化を、創傷治癒アッセイ (wound healing assay)、細胞増殖アッセイ (cell growth assay)、細胞遊走・浸潤アッセイ (cell migration and invasion assay) によって評価し、ノックダウンを行わないコントロール群と比較した。臨床検体を用いた検討では、血管肉腫と血管腫の臨床検体それぞれ 10 症例について抗 SIRT1 抗体による免疫組織化学染色を施行し、その染色強度を Allred score によって評価した。統計学的検討には、Student-*t* 検定または Wilcoxon 検定を用いた。なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (承認 4069 号) の承認を得たものである。

結果

まず、血管肉腫培養細胞(ISO-HAS-B)では、SIRT1 蛋白の発現がみられることがウエスタンブロット法にて確認された。これに対して、RNA 干渉法により SIRT1 のノックダウンを行うことで、24 時間後に SIRT1 蛋白の発現が抑制されることが確認された。創傷治癒アッセイでは、治癒(削り取った部位の細胞による被覆)の程度は、ノックダウン細胞では 12 時間後および 24 時間後においていずれもコントロールと比較し、有意に抑制された ($p < 0.05$)。細胞増殖アッセイでは、ノックダウン細胞では、増殖能の低下が 24 時間後および 48 時間後に認められた ($p < 0.05$)。細胞遊走能および浸潤能は、SIRT1 ノックダウン条件下では、コントロール群と比較してそれぞれ 24.3%および 12.9%と優位に低下していた ($p < 0.05$)。臨床検体における SIRT1 の免疫組織化学染色では、血管肉腫と血管腫のいずれにもびまん性に陽性像がみられたが、その染色強度は血管肉腫でより強い傾向がみられた。Allred score による染色強度の定量化検討では、血管肉腫では平均 6.8、血管腫では平均 5.1 となり血管肉腫で有意に強い染色性が認められた ($p < 0.05$)。

考察

今回の研究では、血管肉腫で SIRT1 の強発現がみられた一方で、良性疾患である血管腫では発現が弱く、過去の報告の傾向とも一致していた。このことから、SIRT1 が血管系腫瘍の悪性化と関係する可能性が示唆される。

これまで、骨肉腫の培養細胞においては、SIRT1 のノックダウンを行うと細胞増殖活性が低下することが報告されているが、血管肉腫は培養細胞系列が少なく、SIRT1 に関連した *in vitro* での検討はなされてこなかった。血管肉腫培養細胞において SIRT1 のノックダウンにより、その増殖、遊走、浸潤活性の低下が今回初めて明らかになり、他の肉腫での知見と併せ、肉腫においてもその腫瘍形成に SIRT1 が関与しているこ

とが示唆された。これらのことから、SIRT1 が血管肉腫におけるバイオマーカー、あるいは治療のターゲットになり得る可能性も示唆される。

結論

血管肉腫において SIRT1 は強い発現がみられ、腫瘍細胞の増殖、遊走、浸潤を促進する可能性がある。また、SIRT1 は血管肉腫における治療のターゲットにもなり得ると考えられる。