

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 22 年度博士課程入学

氏名 松本 香織
指導教員名 西村 亮平

論文題目 乳腺腫瘍増殖におけるテネイシン C の役割

腫瘍組織は均質な腫瘍細胞の集塊ではなく、そこに浸潤する免疫細胞や間質細胞、さらに細胞外マトリックス (ECM) が加わって構成されている。これらの要素は相互にクロストークを行いながら、動的で複雑な腫瘍微小環境を形成し腫瘍の進展に関与している。

テネイシン-C (Tenascin-C; TNC) は 6 量体糖タンパクの ECM 分子であり、胎生期には生体の様々な部位に TNC が存在しているが、健全な成体では小腸や脳など限られた臓器にのみ発現が認められる。しかし成体においても創傷治癒や炎症反応が生じると様々な組織で TNC の産生誘導が認められるようになる。このようなプロセスの中で TNC は線維芽細胞に足場を提供し、炎症性サイトカイン産生や炎症細胞誘導を促すと考えられている。

TNC は悪性腫瘍間質における重要な ECM 分子の一つである。TNC は乳癌、前立腺癌、膵臓癌などの多様な癌腫で発現が確認されており、乳癌を含むいくつかの悪性腫瘍では TNC の発現と組織学的悪性度や予後の悪さとの間に関連が報告されている。そのため TNC は腫瘍の悪性化にも重要な役割を持つと考えられる。これまでに、TNC は腫瘍細胞の増殖促進、血管新生、転移巣の形成などに関わると報告されているが、実験系によってその結果は大きく異なり、TNC が腫瘍組織内で腫瘍進展に与える影響については不明な点が多い。

TNC に関する研究において一番の問題は、TNC が腫瘍細胞と間質細胞の両者によって産生されうるという点である。そのため、一般的な移植モデルでは腫瘍細胞からの TNC 産生を抑制しても間質細胞からの TNC 産生により補填されてしまい表現型の評価が難しい。また TNC 欠損マウスでの発癌モデルでは TNC を完全に排除できるが、形成される腫瘍の質や発癌までの時間にばらつきを生じるため、原発巣成長、転移巣形成等といった腫瘍の進展における TNC の影響を複数の均質なマウスで同時に評価することは難しい。

しかし、TNC は前述のように成体では腫瘍特異性の強い ECM 分子であり、腫瘍組織内での役割を明らかにすることは、腫瘍の診断や治療への応用につながるものと期待できる。

そこで本論文では第一章において、原発腫瘍の成長に TNC が与える影響を、無刺激状態

では TNC 産生の認められないマウス乳癌細胞株 GLMT1 を TNC ノックアウトマウスに移植するモデルを用いて評価した。第一章で得られたモデルと結果をもとに第二章では TNC が原発巣の成長を促進する機序を網羅的な遺伝子解析を用いて評価した。さらに第三章では第一章において観察期間の後期にみられた GLMT1 細胞からの TNC 産生誘導について、候補分子に関する抗体を作成し評価することで、腫瘍組織中の TNC 産生に関する腫瘍細胞と間質細胞の相互作用を検討した。

第一章では、通常培養では TNC 産生能を持たないマウス乳腺腫瘍細胞株 GLMT1 を野生型 (WT) 及び TNC ノックアウト (TNC-KO) マウスへと移植し、原発巣の腫瘍成長や腫瘍組織内における TNC 産生について評価を行った。WT 及び TNC-KO マウスには GLMT1 細胞株が分離された GRS/A マウス及び同マウスから TNC をノックアウトしたコンジュニクマウスを用いた。これらマウスに対し GLMT1 細胞 (1×10^7 cells/mL, 100 μ L/head) を皮下移植し、移植前ならびに移植 1、2、3 週後のそれぞれの時点において腫瘍体積の計測及び安楽死して得られた腫瘍組織標本に対するヘマトキシリン・エオジン染色及び免疫組織化学的染色 (IHC) を行った。経時的な腫瘍体積の比較では、WT マウスに比べ TNC-KO マウスに形成された原発巣の腫瘍成長は有意に遅い結果となった ($p < 0.05$)。IHC により腫瘍組織内における TNC 産生を評価したところ、GLMT1 細胞移植前にはどちらのマウスにおいても組織中に TNC は認められなかったが、WT マウスでは移植 1 週間後から原発巣辺縁の間質組織に TNC の発現が認められ経時的にその発現量の増加がみられた。一方で TNC-KO マウスではいずれの観察期間においても同部位に TNC 発現はみられなかった。また WT 及び TNC-KO マウスともに移植 3 週間後には原発巣の中心部に壊死巣を形成しその部位の腫瘍細胞の周囲には TNC の発現が認められた。これらの結果から、TNC は腫瘍原発巣の成長を促進する効果を担っていること、また通常培養では TNC 非産生性の腫瘍細胞であっても、腫瘍組織内の何らかの刺激によって TNC を産生することが示唆された。

第二章では、原発腫瘍の成長を促進する TNC の機序を探るために、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析と定量的 PCR による評価を行った。第一章で作出した GLMT1 細胞株と WT 及び TNC-KO マウスによるシンジュニクモデルを用い、それぞれ移植 2 週後の腫瘍組織を採取した。cDNA マイクロアレイ解析には Mouse Genome 430 2.0 Array を用い、得られた遺伝子発現プロファイルに対し群間の比較及び 1.5 倍以上の発現変動が認められた遺伝子リストを用いてパスウェイ解析を行った。その結果、TNC-KO マウスに形成された腫瘍では WT マウスと比較して 232 の遺伝子が発現上昇し、214 の遺伝子が発現低下していた。これらの発現変動遺伝子に対してパスウェイ解析を実施したところ、2 群間でケモカイン産生関連遺伝子に有意な違いが認められた。そこで腫瘍組織中の CXCL ケモカイン (CXCL1-3 及び 9-11) に関して定量的 PCR を実施したところ、TNC-KO マウスの腫瘍では 2 週目に ERG 陽性 CXCL (CXCL1-3) の発現が低下し、反対に ERG 陰性

CXCL(CXCL9-11)の遺伝子発現は増加する傾向にあった。ERG 陽性 CXCL は血管新生を促進し ERG 陰性 CXCL は血管新生を阻害するとされ、また ERG 陰性 CXCL は Th1 タイプのケモカインを誘導することが知られている。このため TNC は ERG 陽性 CXCL の産生増加を、または ERG 陰性 CXCL の産生減少を介して腫瘍の血管新生や抗腫瘍免疫の抑制を誘導している可能性が示唆された。TNC が CXCL を介して病態に影響する機序はこれまで報告されておらず、TNC の生物学的な意義の新たな一端を明らかにしている可能性があると考えられた。

第三章では、第一章において TNC-KO マウスにおいても後期では腫瘍中心部に TNC の発現が認められ、*in vitro* の通常培養下では TNC を産生しない GLMT1 が腫瘍組織内の微小環境下で何らかの刺激により TNC を産生したことが示唆されことから、腫瘍組織中で TNC の発現誘導が起こるメカニズムを探索した。まず、WT 及び TNC-KO マウスの胎仔線維芽細胞 (MEF) の培養上清が腫瘍細胞に与える影響を評価し、さらに過去に同定されているテネイシン誘導因子 (Tenascin inducing factor; TIF) に対する抗体を作成し、TIF による TNC 誘導メカニズムの検討を行った。その結果、WT マウス由来の MEF 培養上清 (WMC) を GLMT1 に添加したところ GLMT1 細胞に対する TNC 産生誘導が確認された。この反応は TNC-KO マウス由来 MEF 培養上清 (KOMC) では確認されなかった。TIF に対する抗体作成により得られた抗体 (クローン名: 27-4A) を用い、Biacore にて WMC 及び KOMC との結合能を解析したところ、WMC には TIF が存在するが KOMC には含まれていないことが明らかとなった。また WMC に TIF 抗体を添加することで、培養後の培養液中の TNC の合計量は非添加と比較して有意に低下し、その中和活性が確認された。TNC を誘導する因子として MEF 培養上清に含まれる TIF の存在が示唆されていたが、本章では TIF に対する抗体を作成し、それによる TNC 誘導能低下を確認することで TIF の存在を明らかにした。GLMT1 細胞に TNC 産生をもたらす一部は TIF であったと考えられるが、本検討では上清自体にも TNC が含まれており、TIF が TNC 誘導のどの程度担っているかを正確に評価することはできず、TGF- β や PDGF など他の TNC 誘導因子を含めた検討が今後必要である。TNC は誘導因子との間に正のフィードバックループを形成することも知られており、WT の MEF において TIF と TNC の間にもフィードバックループが存在した可能性もある。そのため第一章に見られた TNC-KO マウスにおける GLMT 細胞の TNC 産生は必ずしも TIF を介したものとはいえないが、本章で作製した TIF 抗体は今後の TNC の biology 解析において有用なツールとなると考えられる。

以上本論文では、腫瘍形成早期に TNC が完全に排除された腫瘍微小環境を用いることで、TNC が原発巣腫瘍の成長を促進することを明らかにした。さらに網羅的遺伝子発現解析により、TNC が CXCL ケモカインを介して腫瘍成長に影響を与える可能性を見出した。これに加え TNC 発現が誘導されるメカニズムの一端として腫瘍間質から産生される TIF の存在

が示唆された。今後は本論文で構築したモデルから各種ケモカインの存在を排除することで TNC が液性因子を介して腫瘍成長に与える影響を証明し、また新規 TIF 抗体を利用して悪性腫瘍や他の病態における TNC の時空間的な制御を解明していく必要がある。