

審査の結果の要旨

氏名 松本 香織

テネイシン-C (Tenascin-C; TNC) は細胞外マトリックス (ECM) の一つであり、胎生期には様々な部位にみられ、健常な成体では小腸や脳など限られた臓器にわずかに認められるのみである。生体で創傷治癒や炎症反応が起きると様々な組織で TNC 産生誘導がみられ、その中で 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 は様々な腫瘍の臨床的な悪性度との関連が示唆されており、乳癌では TNC の発現と組織学的悪性度や予後との間に関連が報告されている。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ことが示唆されているが、腫瘍組織内で TNC が腫瘍進展に与える影響については不明な点が多い。

TNC は多くの場合間質細胞から産生されるが、腫瘍細胞からも産生されうる。TNC の腫瘍進展に与える影響を評価するモデルの一つとして、通常培養下では TNC を産生しないマウス由来腫瘍細胞株とその同系野生型および TNC ノックアウトマウスを用いたシンジェニックマウス移植モデルが有用と考えられる。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、こうしたシンジェニックマウスモデルを作出し評価することとした。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、第三章では腫瘍細胞からの 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、通常培養下では TNC を産生しないマウス乳腺腫瘍細胞株 GLMT1 を同系の野生型 (WT) および 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。GLMT1 細胞を皮下移植し、経時的な腫瘍体積の計測および安楽死して得られた腫瘍組織の病理組織学的評価と免疫組織化学的染色 (IHC) を行った。腫瘍体積は WT マウスに比べ TNC-KO マウスにおいて 2 週目以降は有意に小さく、IHC にて評価した腫瘍組織内の TNC 発現は、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発現が認められ経時的に発現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。またいずれのマウスにおいても移植 3 週間後には腫瘍中心部に形成された壊死巣に TNC が認められ、腫瘍周囲間質の TNC が腫瘍の増殖に関与している可能性と、通常培養下は TNC 非産生性の腫瘍細胞が腫瘍組織内の何らかの刺激に

よって TNC を産生した可能性が示唆された。

第二章では TNC による腫瘍増殖の機序を探るために、網羅的遺伝子発現解析と定量的 PCR による検証を行った。第一章と同じモデルの移植 2 週後の WT および TNC-KO の腫瘍組織を採取し、得られた遺伝子発現プロファイルにて群間の比較およびパスウェイ解析を行った。TNC-KO の腫瘍では WT と比較し 232 遺伝子で発現上昇、214 遺伝子で発現低下しており、パスウェイ解析からケモカイン産生関連遺伝子に有意な違いが認められた。定量的 PCR での検証では、TNC-KO 腫瘍では ERG 陽性 CXCL 遺伝子群が発現低下し、ERG 陰性 CXCL 遺伝子群が発現増加する傾向にあり、これらによる血管新生や抗腫瘍免疫の抑制が誘導されていることが示唆された。

第一章において GLMT1 細胞が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、第三章では間質細胞からの液性因子により同細胞株が TNC を産生するか、そして液性因子のうち TNC を誘導する可能性を持つテネイシン誘導因子 (TIF) についてさらなる検討を行った。WT および TNC-KO マウスの胎仔線維芽細胞の培養上清 (それぞれ Wildtype Mouse Conditioned medium; WMC、KnockOut Mouse Conditioned medium; KOMC) を添加し GLMT1 細胞を培養すると、WMC でのみ TNC 産生が誘導され、WMC に含まれる何らかの液性因子がこれに関与していると考えられた。その候補である TIF に対する抗体を作成し、Biacore 試験にて評価したところ WMC にのみ TIF 含まれており、また WMC に TIF 抗体を添加することで TNC 産生は減少したため、本抗体が認識する TIF が TNC 産生に関与しており、本抗体がそれに対する中和活性を有することが分かった。TNC 産生誘導能が示唆される物質は他にもあり今後さらなる検討が必要ではあるが、本章で作製した TIF 抗体は今後の TNC の生物学的な機能の解析において有用なツールとなりうると考えられた。

本論文では、TNC の存在が腫瘍増殖を促していること、網羅的遺伝子発現解析からその機序の一つが CXCL ケモカインである可能性を見出した。また TIF による TNC 産生誘導能を示し、その中和活性を持つ抗体作製に成功した。

以上、本研究で得られたこれらの知見やツールは今後の悪性腫瘍における TNC の意義を解明する上で有用となることが期待された。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。