

# 博士論文（要約）

乳腺腫瘍増殖におけるテネイシン C の役割

松本 香織

# 目次

序言 p. 1 - 9

第一章 マウス乳腺腫瘍移植組織におけるテネイシン C の発現  
p. 10 - 37

第二章 マウス乳腺腫瘍移植組織の網羅的遺伝子発現解析  
p. 38 - 64

第三章 テネイシン誘導因子によるテネイシン C の産生機序  
p. 65 - 90

総括 p. 91 - 97

謝辞 p. 98

参考文献 p. 99 - 108

## 序言

先進国におけるヒトの最大の死因はがんであり、1970年代後半から現在に至るまでわが国においても死因の第一位を占めている<sup>1)</sup>。中でも近年、罹患率が増加傾向にある腫瘍のひとつが乳癌であり、わが国では女性のがん全体の約20%を占めている。2015年には約13,500人が乳癌で亡くなっており、その人数は今後さらに増加すると予測されている<sup>1)</sup>。獣医療においても乳腺腫瘍の発生は未だ非常に多く、イヌの乳腺腫瘍は雌に発生する腫瘍で最も多く、発生する腫瘍の25%~56%が悪性腫瘍とされる<sup>2)</sup>。ネコでは発生する全ての腫瘍の中で3番目に多く、リンパ腫を除く腫瘍の約10%を占め<sup>2)</sup>、発生する腫瘍の約90%が悪性腫瘍と診断される<sup>2)</sup>。予後については、イヌはネコに比べ良好とされるものの悪性腫瘍のうち約40%~50%が予後不良であることが報告されている。ネコにおいてはより予後が悪く<sup>2)</sup>、ヒトと同様に臨床上問題となる腫瘍のひとつである。

乳腺腫瘍の治療は、医療・獣医療ともに局所療法としての外科療法と放射線療法、全身療法としての化学療法が主な選択肢となる。ヒトの乳癌においては2000年にPerouらによって、ヒト乳癌患者の腫瘍組織を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、エストロゲン受容体(ER)、プロジェステロン受容体(PgR)、ヒト上皮増殖因子2型受容体(HER2)の遺伝子発現プロファイルによりヒト乳癌を分類できることが明らかにされた<sup>3)</sup>。これらにKi-67などの腫瘍細胞の分子生物学的性状を加えたintrinsic subtype分類とそれに基づく標準治療の選択が、現在の乳癌治療のガイドラインとなっている<sup>3)</sup>。具体的な治療方法としては、腫瘍の進行度を示す臨床病期ステージ0~IVのうち、ステージIIIの一部やステージIVの症例を除いては外科的切除が第一選択となるが、その後は、摘出された乳癌組織に対する免疫組織化学染色やFISH法により症例のsubtype分類を行い、全身療法の手法を選択する。分類の結果、ERやPgR陽性乳癌の

場合はアロマターゼ阻害薬を用いた内分泌療法を、**HER2** タンパクの過剰発現及び **HER2** 遺伝子増幅の腫瘍の場合は **HER2** を標的とする抗体薬のトラスツズマブや低分子化合物のラパチニブなどの分子標的薬の適応を中心に治療を行い、これらの発現が弱いし陰性の場合は殺細胞性抗腫瘍薬による化学療法を中心に治療を行うとされている<sup>4)</sup>。Intrinsic subtype 分類による個別化医療の試みやマンモグラフィ導入などによる早期発見により乳癌の治療成績は向上し、ステージ 0 での 5 年生存率は 97.58%、ステージ I では 96.63%、ステージ II では 90.93%と良好な予後が得られている。一方で、腫瘍径が 5cm より大きく、かつリンパ節転移のある症例やリンパ節転移が 5 個以上のステージ III の症例や遠隔転移のあるステージ IV の症例では、5 年生存率はそれぞれ 72.48%、42.65%と大きく低下する<sup>5)</sup>。また、転移・再発乳癌では化学療法後の 10 年生存率は 5%程度であり、20 年を超えて完全奏効を継続する症例はわずか 2~3%でしかない<sup>6,7)</sup>。すなわち早期に外科的切除できる症例を除き、乳癌に対する現状の化学療法には限界があることがこれらの数字から示唆される。

イヌやネコの乳癌においても、ヒトと同様のホルモン受容体や **HER2** 受容体に基づく Intrinsic subtype 分類を治療指針や予後指標として外挿する試みがなされている<sup>8,9)</sup>が、腫瘍細胞の分子生物学的な評価やそれに基づく選択的治療法による標準治療の確立は未だなされていない。そのため、外科手術などの局所治療で制御できない全身性の進行癌に対しては主に殺細胞性抗腫瘍薬が用いられているが、その治療効果は限定的であり根治は困難な状況にある。

がん (Cancer) という言葉の歴史は古く、古代ギリシア語のカニを意味する **Karkinos** に由来しており、甲羅のような固い本体とその辺縁が正常組織に対して足を広げて食い込むように張り付き離れない様から名付けられたとされている<sup>10)</sup>。19 世紀後半、英国の病理学者 Sir Rupert Willis らにより、これら悪性の腫瘍は細胞が自律的

に過剰に増殖してできた細胞塊として「腫瘍 (Tumor あるいは Neoplasm)」と定義され<sup>11)</sup>、さらに研究が進む中で、これらの腫瘍組織が単一の腫瘍細胞の集塊ではなく様々な他の細胞も含むこと、そして腫瘍組織の中においても“カニの本体”である腫瘍中心部と“足”である腫瘍の辺縁部ではその性状に違いがある、すなわち、正常な組織とより接する辺縁部においては腫瘍細胞の増殖能や浸潤能がより活性化していることが明らかになってきた。これまで腫瘍細胞にのみ着目していたがん研究がその周囲組織との関係に目を向けるきっかけとなったのは、Paget が発表した「Seed and soil」説である。

「血流に乗った腫瘍細胞 (“Seed”) が特定の臓器において増殖し転移が成立するのはそこに腫瘍細胞が増殖できる微小環境 (“Soil”) があるためである」という、腫瘍細胞の増殖をその周囲の微小環境が制御するとしたこの発想を嚆矢として、腫瘍細胞を取り巻く微小環境、すなわち腫瘍微小環境の研究が広く行われ、腫瘍細胞と腫瘍微小環境の相互作用やそれによる増殖、浸潤、転移への影響が明らかになってきている。

つまり、腫瘍組織には腫瘍細胞だけでなく血管、リンパ管が含まれ、その周囲を取り囲む炎症細胞、免疫細胞、線維芽細胞、細胞外基質 (ECM) などを含め、これらの要素が相互作用しながら、動的で複雑な腫瘍微小環境を形成していると考えられる。これら腫瘍間質の構成要素は、腫瘍の種類や部位によっても様々に変化する<sup>12, 13)</sup>。分裂期の腫瘍細胞を主な標的とした殺細胞性抗腫瘍薬や、乳癌における HER2 遺伝子変異をはじめ腫瘍細胞の責任変異 (ドライバー変異) を標的とした抗体薬や分子標的薬のみでは根治に至らないのは、これらの治療が腫瘍細胞を対象とするものであり、腫瘍微小環境やそれらとの相互作用による腫瘍細胞の変化や多様性に対応できていないことが一因と考えられている。

腫瘍細胞と腫瘍微小環境の相互作用が明らかになる中で、近年、それを標的とする治療が臨床応用にまで進むようになってきた。その代表例のひとつが、抗 PD-1/PDL-1 抗体薬などによる免疫チェックポイント阻害薬による免疫療法である。腫瘍微

小環境においては、腫瘍細胞表面に発現した PD-L1 が CD8 陽性 T 細胞上に発現した PD-1 と結合することで、TCR シグナルなどが減弱し CD8 陽性 T 細胞の活性抑制や最終的には BIM や CD95 を介し T 細胞のアポトーシスが誘導され、腫瘍細胞を排除する免疫機構が機能しない「免疫寛容」が引き起こされる<sup>14)</sup>。この PD-1/PD-L1 結合を阻害する免疫チェックポイント分子阻害剤は腫瘍細胞を直接傷害するものではないにも関わらず、ヒト悪性黒色腫をはじめ様々な腫瘍において完全寛解を含む目覚ましい臨床効果を示している<sup>15)</sup>。また、同様に腫瘍微小環境を標的とした治療法として血管新生促進因子である VEGF を阻害する方法があるが、この治療法がマウス腫瘍に対して腫瘍増殖抑制効果を示すことが見出され<sup>16)</sup>、2004 年には抗ヒト VEGF 中和抗体ベバシズマブが、2011 年には VEGF を標的とする低分子化合物スニチニブが FDA で認可されている。また、肝細胞増殖因子 (HGF) をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼ c-MET<sup>17)</sup>や破骨細胞形成を調節する NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド (RANKL)<sup>18)</sup>などを標的とする選択的阻害薬が臨床応用されている。このように、これら腫瘍微小環境の解明とそれに基づく新規治療法は、従来の腫瘍細胞のみを標的とした治療法とは異なる機序によって臨床効果をもたらしている。一方で、近年のがん治療のブレイクスルーである免疫チェックポイント阻害薬であっても、臨床効果が得られる患者は単剤では 20%~30%、併用療法でも約 5 割にとどまることも明らかになってきており<sup>19)</sup>、腫瘍微小環境を構成する要素やその相互作用に関するさらなる解明とそれに基づく新しい治療戦略が求められている。

腫瘍微小環境には、腫瘍細胞の他に、がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast; CAF)、がん関連内皮細胞 (Cancer-associated endothelial cell; CAEC)、がん関連脂肪細胞 (Cancer-associated adipocyte; CAA)、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage; TAM) などの浸潤免疫細胞や炎症細胞、さらにはテ

ネイシン C やフィブロネクチンや各種コラーゲンなどの細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM) が存在する。これらの中でも CAF は腫瘍微小環境の大部分を構成しており、CAF によって ECM の多くは産生される。ECM は、化学構造上、コラーゲン、プロテオグリカン、糖タンパク、エラスチン、ヒアルロン酸などに分類され、生体組織構築の形成・維持のほかに、サイトカインや成長因子などと結合してこれらを活性化し、腫瘍化に大きく関わっていることが報告されている<sup>12)</sup>。しかしながら、様々な ECM に関する基礎的検討が進んでいるものの未だ臨床応用に繋がる研究は少ない。臨床応用された ECM のひとつとして 17 型コラーゲン (Collagen XVII) から産生されるエンドスタチンがあり、血管新生抑制作用・抗腫瘍作用を有することから抗癌剤としての開発が進められたが、その臨床的効果は限定的であり<sup>20)</sup>、ECM に関する研究はまだ途に就いたばかりと言える。他に、悪性腫瘍との関連が示唆されている ECM のひとつに糖タンパクであるテネイシン C (Tenascin-C; TNC) があり、その役割が注目されている。

TNC は 1975 年に Yamada らによって、ニワトリ胚線維芽細胞の表面に存在する赤血球凝集能を持つタンパクとして最初に発見された<sup>21)</sup>。この時期に様々な研究グループから、サイトタクチン<sup>22)</sup>、J1 glycoprotein<sup>23)</sup>、ヘキサブラキオン<sup>24)</sup>、myotendinous antigen<sup>25,26)</sup>、glioma mesenchymal extracellular matrix antigen (GMEM)<sup>27)</sup> という名で同物質が報告されているが、1986 年に Chiquet-Ehrismann らにより TNC と命名されて以降、呼称は統一されている<sup>28)</sup>。

TNC は脊索動物においてのみ発現しており、頭索動物、尾索動物、脊椎動物では分子構造に多少の差異が存在する。哺乳類における TNC の分子構造は、N 末端から順に、ヘプタット構造、EGF 様反復構造、ファイブロネクチンタイプ III 型 (FN-III) 様反復配列、フィブリノーゲン (Fbg) 様ドメインで構成される<sup>29)</sup>。EGF 様及び FN-III

ドメインは動物種によって反復数が異なり、さらに FN-III 反復の中に様々な組み合わせや数の選択的スプライシング部位が挿入されるため、多数のバリエーションが形成される。FN-III 様反復構造の違いは、細胞外の pH によって TNC mRNA のスプライシングが影響される結果とする報告もある<sup>30)</sup>。これら分子量 190~250kDa のサブユニットがヘプタット構造で結合することで、TNC は 6 量体を形成する。TNC は、一つの分子内に複数の生物活性ドメインを持ち、何種類ものスプライシングバリエーションが存在し、細胞接着分子であるインテグリン  $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 7\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 6$  など複数の細胞表面レセプターや、ファイブロネクチンなどの分子と結合するため様々な作用を担っていると考えられている<sup>29)</sup>が、それらの作用はスプライシングの型でそれぞれ決まる傾向があるとの報告もあるが詳細はいまだ不明である<sup>31)</sup>。

TNC の発現時期には特徴があり、胚形成時における TNC は、ラットの正常な組織では、乳腺、毛包、歯などの器官の原基周囲間葉に強くその存在が認められ、間葉系細胞の凝集と上皮細胞の増殖に深く関与していることが示唆されている<sup>28)</sup>。また、マウス胚の正常な腎臓形成過程においても、管形成初期から後期にかけて一時的に周囲間葉に TNC が存在することが知られており、胚形成期における上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用と TNC 発現との関連性が示唆されている<sup>32)</sup>。そして、個体成長に伴い TNC は消失し、成人組織では脳、腎臓、軟骨、皮膚、大腸、小腸、子宮などの間質にわずかにその存在を認めるのみとなり<sup>33)</sup>、正常な組織における TNC の機能は、形態形成以外に、細胞接着及び離脱、細胞増殖刺激及び抑制、細胞移動能促進及び阻害、赤血球凝集活性など多岐にわたって報告されている<sup>34,35)</sup>。そして、創傷治癒過程や炎症反応においては再び TNC の存在が認められ<sup>36)</sup>、マウス背部皮膚における創傷治癒過程と TNC を観察した報告では、受傷後 24 時間以内の凝固止血期には創傷周囲の評皮下基底膜や平滑筋などに TNC が認められ、肉芽形成時には肉芽組織周囲と創傷断端部の皮筋層に認

められるが、受傷後 7 日目を発現ピークとし、受傷後 10～14 日目には消失する<sup>37)</sup>。こうした過程の中で 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<sup>38,39)</sup>。

一方で、腫瘍における TNC については、1986 年に Chiquet-Ehrismann らによって、正常なラット乳腺組織では存在しない TNC が、N-methyl-N-Nitrosourea により誘発された乳腺腫瘍ではその存在が認められたとはじめて報告されている<sup>28)</sup>。Chiquet-Ehrismann らの報告は化学発癌モデルによるものであったが、自然発症の腫瘍組織においても、乳腺をはじめ、脳、結腸、肝臓、肺、子宮、皮膚、前立腺などの間質組織で TNC の存在が報告されており<sup>40)</sup>、さらに乳癌、神経膠腫、結腸癌、肺癌では、TNC の発現の強さと予後の間に相関性が認められている<sup>40)</sup>。その中でも乳腺腫瘍は、間質組織の TNC 発現と腫瘍悪性度との相関性が検討された初めての腫瘍であり<sup>28)</sup>、ヒト乳癌組織内の間質組織における TNC 発現量は病期・リンパ節転移・皮膚転移と相関性が認められている<sup>41)</sup>。腫瘍浸潤境界部の間質組織において TNC 発現が陽性の症例は、TNC 発現陰性の症例よりも 5 年無転移生存期間が短かったとの報告<sup>42)</sup>や、化学療法に抵抗性がある症例は、間質組織における TNC 発現が増加していたとの報告<sup>43)</sup>もある。獣医療においても、悪性度の高いイヌ乳腺腫瘍では筋線維芽細胞周囲に TNC が認められたという報告<sup>44)</sup>がなされ、ラット、マウスなどのげっ歯類の自然発症乳腺腫瘍においても、TNC 発現が良性腫瘍では認められないが、悪性腫瘍の間質組織では認められたと報告されている<sup>45)</sup>。こうした臨床的な背景から、乳腺腫瘍において ECM 中の TNC は新しい治療標的として重要なものの 1 つになると考えられる。

TNC と腫瘍悪性度との関連について、*in vitro* でのいくつかの研究では、腫瘍細胞の増殖・上皮間葉転換・血管新生・転移巣形成などとの関連が示唆されている<sup>31)</sup>。しかしながら、実験系によってその結果は大きく異なり<sup>46)</sup>、腫瘍組織内において TNC

が腫瘍進展に与える影響は依然として不明な点が多い。また、*in vitro*の実験系では腫瘍微小環境内の動的な変化を再現することは現状では困難であるため、その評価にはマウスなどを用いた実験動物モデルが適していると考えられる。がん研究においてもっとも広く用いられているマウス移植モデルのひとつは、ヒト腫瘍細胞株をはじめ他種の腫瘍細胞をマウスへと移植するモデルであるが、免疫不全マウスを用いるためホスト側の完全な腫瘍微小環境の再現が難しい。一方、マウス由来の腫瘍細胞を野生型マウスと TNC ノックアウトマウスへと移植するモデルでは、ホスト側の腫瘍微小環境中の TNC を実験的に制御することが可能になる。TNC に関する研究において大きな問題のひとつは、TNC が腫瘍微小環境の中で腫瘍細胞と間質細胞の両者によって産生されうるといふ点であるため、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が、TNC ノックアウトマウスを用いた移植モデルではその補填を防ぐことができる。また、これらのマウスを用いる発癌モデルも有用と考えられるが、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困難である<sup>47, 48)</sup>。

腫瘍微小環境における TNC の産生調節機構についても、不明な点が多い。正常な胚発生や創傷治癒過程、炎症反応における TNC 産生誘導については、様々な炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカイン、トランスフォーミング成長因子 β (TGFβ)、血小板由来成長因子 (PDGF) などの成長因子、低酸素や活性酸素、機械的ストレスなどによる JAK/STAT 経路、MAPK 経路、NF-κB 経路、RhoA/Rock 経路の活性の関与が報告されている<sup>49)</sup>。一方、腫瘍細胞と間質細胞における TNC 発現調節因子については、報告が非常に限られており、ニワトリ胚線維芽細胞がヒト乳癌細胞株 MCF7 細胞との共培養やその培養上清の添加によって TNC が産生される場合に、その産生調節に

TGF $\beta$  の関与が示唆される報告<sup>50)</sup>や、MCF7 細胞やヒト扁平上皮癌由来細胞株 A431 細胞がマウス胎仔線維芽細胞やニワトリ胚線維芽細胞との共培養やその培養上清の添加によって TNC 産生が誘導される可能性を示唆する報告<sup>51)</sup>があるのみである。

腫瘍微小環境における TNC と悪性化に関わる意義に関して明らかにすべき点は数多く残されているが、本研究では、腫瘍微小環境における腫瘍細胞増殖への影響に焦点を当て研究を進めることとした。第一章では、原発腫瘍の成長に間質細胞由来の TNC が与える影響を評価するために、通常の培養状態では TNC を産生しないマウス乳癌細胞株 GLMT1 細胞を、同系の GRS/A マウスの野生型マウス及び TNC-KO マウスへと移植するシンジェニックマウスモデルを用いた。第二章では、第一章で作出したマウスモデルとその結果をもとに、TNC が原発巣の成長を促進する機序について、移植モデルから採取した腫瘍組織を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、TNC 発現により変動する遺伝子群の検索を行った。また第三章では、TNC 産生を誘導する候補分子に対する抗体を用いて、その TNC 産生誘導能を評価した。

## 第一章

マウス乳腺腫瘍移植組織におけるテネイシン C の発現

TNC と腫瘍悪性度の相関性が示唆されている一方で、TNC が腫瘍の悪性化過程のどの段階で作用するのかについては、実験系によってその結果は大きく異なり、不明な点も多い。ヒト腫瘍細胞移植モデルにおいて、乳癌細胞からの TNC 産生を shRNA で阻害した研究<sup>52)</sup>や、悪性黒色腫細胞を TNC ノックアウトマウスに移植した研究<sup>53)</sup>では、腫瘍組織内の TNC 発現が減弱し原発巣での腫瘍成長は抑制されたと報告されている。一方で、TNC 産生を抑制しても原発巣の腫瘍成長には影響がなく、浸潤や転移のみが抑制された<sup>54-56)</sup>とする報告もある。

また、TNC に関する研究を進める上で大きな問題のひとつは、TNC が間質細胞と腫瘍細胞の両者によって産生されうるという点である。臨床例の腫瘍組織における TNC は、腫瘍細胞と接する間質組織に認められることが非常に多く、ヒト浸潤性乳管癌<sup>57)</sup>、ヒト口腔咽頭扁平上皮癌<sup>58)</sup>、ヒト管内胆管癌<sup>59)</sup>、ヒト子宮頸部上皮癌<sup>60)</sup>などでは、腫瘍細胞が間質組織に浸潤する境界部の間質組織側に TNC が認められたと報告されている。一方で、ヒト乳癌では、間質組織に加えて腫瘍細胞の細胞質内にも TNC が認められたとの報告<sup>61)</sup>や、結腸癌症例では、*in situ* ハイブリダイゼーションによって TNC タンパクと TNC mRNA が腫瘍細胞、筋線維芽細胞の両方に存在していたとの報告がある<sup>62)</sup>。

マウスを用いて TNC がどの細胞から産生されるか調べた研究では、胎児期・成熟期・泌乳期・老齢期それぞれの乳腺組織と、自然発生乳腺腫瘍について、*in situ* ハイブリダイゼーションと、抗 TNC 抗体を用いた免疫組織学的染色を行った。結果は、TNC タンパクは間質組織に認められたが、TNC mRNA は上皮細胞と間質細胞のどちらか、もしくは、両方に認められ、時期によってばらつきがあった。老齢期では、TNC タンパクは認められたが、TNC mRNA は認められなかった<sup>63)</sup>。

またある報告では、ヒト乳がん細胞 (MCF7)、ヒト扁平上皮がん細胞 (A431、HEp-2)、ヒト結腸がん細胞 (SW620)、ヒト肝臓がん細胞 (HLE、HLF) などの上皮

系腫瘍細胞を移植したマウス移植腫瘍内において、ヒト TNC の存在を認めたが、MCF7、A431、HEp-2 は、*in vitro* では TNC を産生しない細胞である<sup>64)</sup>。つまり、周囲の環境で TNC 産生能が異なる可能性がある。

これらより、TNC の産生細胞は、腫瘍種、腫瘍の進行、腫瘍細胞と間質細胞間との相互作用によっても変化する可能性が考えられる。

前述の、腫瘍細胞からの TNC 産生を shRNA で阻害した研究<sup>52)</sup>や、TNC ノックアウトマウス移植研究<sup>53)</sup>のように、これまでに多く行われてきたヒト腫瘍細胞移植マウスモデルでは、腫瘍組織内の TNC をある程度抑制できたが、完全に抑制することはできていなかった。また、TNC ノックアウトマウスに発癌させる実験系は、腫瘍細胞側も間質細胞側も TNC 産生しない腫瘍組織環境を構築できる可能性があるが、化学発癌では形成される腫瘍のドライバー変異が腫瘍ごとに異なる可能性があるなど、腫瘍の質や発癌までの時間にばらつきが生じるため、原発巣成長、転移巣形成等といった腫瘍の進展における各段階への 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困難である<sup>47,48)</sup>。

そこで、TNC 発現を制御できる移植マウスモデルとして、遺伝的に TNC をノックアウトしたマウスと無刺激下では TNC を産生しない腫瘍細胞を用いた実験系が有用なモデルになると考え、予備的検討を行った。通常の培養状態では TNC を産生しないマウス乳癌細胞株 CMT315 細胞を、同細胞株を分離した同系マウスである C3H/HeN-CSAD (野生型) マウスに皮下移植した。CMT315 細胞は、C3H/HeN<sup>+</sup>マウスに自然発症した乳腺癌から樹立した株で、C3H/HeN マウス、もしくは、BALB/c ノードマウスに移植すると必ず生着し、髄様癌を形成する<sup>65)</sup>。腫瘍が生着し増殖を示した移植後 2 週目の時点で、腫瘍細胞と間質細胞が一部混在する腫瘍組織が形成され、抗 CSA (C3H-specific antigen) 抗体により染色された CMT315 細胞と抗 vimentin 抗体

により染色された間質細胞の境界に TNC が認められた (Supplemental Fig. 1.1)。また、野生型マウスと TNC ノックアウトマウス (C3H/HeN-TgH(TnC)マウス) の比較においては、野生型マウスでは腫瘍細胞と間質細胞の境界に認められた TNC が、TNC ノックアウトマウスでは認められなかった (Supplemental Fig. 1.2)。この予備的検討から、野生型マウスにおいては、正常の皮膚や皮下組織に発現していない TNC が腫瘍細胞の移植によって発現し、一方で、TNC ノックアウトマウスにおいては、移植後も TNC が認められないことから、TNC はホスト側である間質細胞から産生されている可能性が示唆された。以上より、通常培養下で TNC を産生しない腫瘍細胞とその細胞株を分離した同系マウス及びその TNC ノックアウトマウスを用いた腫瘍移植シンジェニックマウスモデルは、TNC 発現を制御することが可能であり、TNC 発現の意義を検討する上で有用であると考えられた。しかしながら、C3H/HeN-TgH(TnC)マウスの繁殖・維持は非常に困難で、頭数が確保できなかったため、この予備的検討は移植後 2 週間の時点のみの評価にとどまった。

こうした予備的検討の結果をふまえ、本章では、別のシンジェニックマウスモデルでの検討を試みた。通常培養下では TNC を産生しないマウス由来乳癌細胞株 GLMT1 細胞 (Supplemental Fig. 1.3) を、GLMT1 細胞株を分離した同系の GRS/A マウスの野生型マウス及び TNC ノックアウトマウスへと移植し、腫瘍組織内における TNC 発現及び腫瘍の変化について経時的に評価を行った。腫瘍微小環境における TNC と悪性化に関わる意義に関して明らかにすべき点は数多く残されているが、本章では腫瘍細胞の増殖に焦点を当て検討を行った。

本章の以降の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。

5 年以内に公表予定。

## 第二章

マウス乳腺腫瘍移植組織の網羅的遺伝子発現解析

第一章では、無刺激状態ではTNCを産生しないマウス乳癌細胞株GLMT1を、同系のTNCノックアウトマウスに移植し、TNCが存在しない腫瘍を作出した。その結果、腫瘍細胞と間質細胞の境界にTNCが存在するWTマウスとの比較によりTNCと原発巣成長に関連がある可能性を示した。このモデルは、腫瘍細胞を樹立した同系のマウスを用いたシンジェニックモデルであり、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）が同一であるため拒絶されることなく腫瘍細胞が生着でき、宿主の免疫細胞も欠損することなく存在しているため、より生体を反映した条件で腫瘍微小環境を比較評価できるものと考えられる。また、同モデルは移植後2週目からWTマウスにおいて腫瘍体積が有意に増加しており、この時期のWTマウスとTNC-KOマウスの腫瘍微小環境を比較することで、腫瘍辺縁部に存在するTNCが腫瘍増殖に与える影響について明らかにできると考えられた。

腫瘍微小環境は無数の多様な細胞から構成されており、腫瘍細胞だけでなく間質細胞、炎症細胞、免疫細胞、TNCをはじめとする細胞外マトリックス（ECM）などからなり、これらの要素が相互にクロストークを行う動的で複雑な環境である<sup>12,13</sup>。単一の細胞でさえ、無数の遺伝的変化やシグナル伝達の変化が起きているため、腫瘍微小環境下のように複数の細胞種が存在する状態の変化を捉えることは、個別の遺伝子発現評価などでは困難であり、包括的で網羅的解析が必要である。

細胞が持つ無数の遺伝子発現の変化を評価する方法には、古くは、Differential Display法、Subtraction法などがあり、遺伝子発現の差分を見出し、変化する遺伝子をひとつずつ増幅し、同定が行われていたが、その感度や解析可能な遺伝子数には限界があった。2000年代になり、cDNA microarray法が開発され、一度のアッセイでその差分を同時に比較評価できる遺伝子数は、数万個へと飛躍的に増加した。検出評価できる遺伝子の種類が増加するだけでなく、こうした遺伝子群についての情報や知見の集積

に伴い、各遺伝子の役割や意義づけ、すなわち、生物学的概念である生物学的ターム (Gene Ontology term; GO term) が紐づけられ、それら遺伝子を繋ぐ経路を含めたデータベース (ClueGO、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)、Reactome、Wikipathway など) が構築されている。こうした解析技術や解析情報の蓄積により、遺伝子発現値から生物学的現象を捉えることが可能となっており、こうした網羅的解析結果に基づいて、実際の遺伝子発現を検証することで生体内での無数の相互作用を明らかにすることが可能である。

そこで、本章では、GLMT1 細胞移植腫瘍組織内に TNC が認められない TNC-KO マウスと、腫瘍細胞と間質細胞の境界に TNC がみられ、TNC-KO マウスと比較して有意な腫瘍増殖がみられる WT マウスの、それぞれ GLMT1 細胞移植後 2 週目の腫瘍組織を対象とし、腫瘍細胞だけでなく間質細胞をはじめ局所の腫瘍微小環境全体を網羅的遺伝子発現解析することで、腫瘍増殖と腫瘍微小環境における TNC 発現の意義について包括的に検討することとした。また、得られた遺伝的プロファイルの比較において有意に変化がみられる遺伝子群については、定量的 PCR を用いて検証を行った。

本章の以降の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。

5 年以内に公表予定。

## 第三章

テネイシン誘導因子によるテネイシン C の産生機序

腫瘍組織では、TNC は腫瘍細胞と接する間質組織に認められることが多い。これまでにヒト浸潤性乳管癌<sup>57)</sup>、ヒト口腔咽頭扁平上皮癌<sup>58)</sup>、ヒト管内胆管癌<sup>59)</sup>、ヒト子宮頸部上皮癌<sup>60)</sup>などの担癌患者から摘出された腫瘍組織において、腫瘍細胞が間質組織に浸潤する境界部の間質組織側に TNC が認められている。TNC は一般的には間質細胞から産生されると考えられているが、ある報告<sup>61)</sup>では、210 症例の乳腺腫瘍患者のうち、77 症例では間質組織のみに TNC が認められ、12 症例では、間質組織だけでなく腫瘍細胞内にも TNC が認められたとの報告がある。この報告ではさらに、細胞質内に TNC mRNA が認められた 4 症例のうち、2 症例は間質組織に加えて細胞質内にも TNC タンパクが認められた。このように、TNC は腫瘍細胞からも産生される可能性があり、産生された TNC は細胞外に分泌されるか、もしくは細胞内に留まることが認められたとされている。第一章においても、間質細胞から TNC が産生される一方で、通常培養下では TNC を産生しない GLMT1 細胞から TNC が産生された可能性が示唆され、TNC は間質細胞、腫瘍細胞の両方から産生されると考えられる。

TNC 産生に関して、腫瘍細胞と間質細胞との間にどのような相互作用があるのかについて、いくつか研究がなされている。その報告では、単独培養下で TNC を産生するニワトリ胚線維芽細胞において、添加するウシ胎仔血清 (FCS) を 10% から 0.3% に減らした場合、TNC 産生量が低下したが、0.3% FCS 添加培地に、単独培養下では TNC を産生しないヒト乳腫瘍細胞 (MCF7) の培養上清を添加した場合は、10% FCS 添加培地と同等の TNC 産生が認められた<sup>50)</sup>。また、単独培養下で TNC を産生しないヒト扁平上皮腫瘍細胞 (A431) や MCF7 細胞において、マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) と共培養、もしくは、MEF の培養上清を添加して培養した場合に TNC 産生が確認されている<sup>51)</sup>。これらの研究結果から、腫瘍細胞から間質細胞へ、または、間質細胞から腫瘍細胞へ、直接、もしくは、液性因子を介した相互作用

によって、TNC 産生が誘導される可能性が示唆されている。

TNC 産生を誘導する因子についての詳細は、いまだ明らかになっていないが、その候補についてはいくつか報告がなされている。ヒト表皮角化細胞に対する腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、ヒト皮膚線維芽細胞に対するインターロイキン 13 (IL-13)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF $\beta$ )、血小板由来成長因子 (PDGF) などが、TNC 発現を調節する転写因子として作用したことが報告されている<sup>30)</sup>。翻訳に関しては、ヒト乳癌やヒト卵巣癌やヒト子宮内膜腺癌に対する TGF $\beta$ 、マウス側脳室やマウス胎仔皮膚細胞 (NIH3T3) に対する線維芽細胞増殖因子 (FGF)、ヒト角化細胞に対するインターロイキン 4 (IL-4)、インターフェロン  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )、TNF $\alpha$  などが TNC のスプライシングを調節する因子として挙げられている<sup>30)</sup>。また、MEF の培養上清から分離・解析された液性因子である TNC タンパク産生誘導因子 (Tenascin inducing factor; TIF) は A431 細胞からの TNC 産生を誘導している<sup>86)</sup>。その報告では、物質の特定には至っていないが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による推定分子量では約 12,000 ~16,000、ゲル濾過クロマトグラフィー法では約 4,500 程度と考えられており、TNC 誘導因子として有名な TGF $\beta$  よりも TNC の誘導活性は強いことが示されている。

本章では、間質細胞と腫瘍細胞の相互作用による TNC 産生誘導及びその誘導因子について検討するために、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、作製した TIF に対する抗体を用いて、TIF の働きを阻害することで TIF による TNC 誘導メカニズムを探索した。本章の細胞株は、通常条件培養下では TNC を産生せず、第一章で、何らかの刺激によって TNC を産生したと考えられる GLMT1 細胞株を用いた。

本章の以降の内容は、学術論文として出版する計画があるため公表できない。

5年以内に公表予定。

## 総括

先進国においてヒトの最大の死因はがんであり、その中でも乳癌は、近年、わが国で罹患率が増加傾向にある腫瘍のひとつである。診断・治療に関しては、乳癌細胞の分子生物学的性状で分類し、それに応じた方法で一定の効果を上げているが、限定的であり根治は困難な状況にある。獣医療においてもそれらを外挿し診断・治療に結び付ける試みがなされているが、現状では明確な効果をあげていない。医療も、獣医療も、腫瘍細胞自体に着目した方法には限界がでてきている。

腫瘍組織内には腫瘍細胞だけでなく血管、リンパ管が含まれ、その周囲を取り囲む炎症細胞、免疫細胞、線維芽細胞、細胞外基質 (ECM) などが相互作用しながら、動的で複雑な腫瘍微小環境を形成していると近年では考えられている。腫瘍微小環境は腫瘍の成長に重要であり、これを標的とした治療が臨床応用まで進むようになってきた。しかしながら、ECM に関しては基礎的検討が進んでいるものの未だ臨床応用まで繋がる研究は少ない。ECM は化学構造上、コラーゲン、プロテオグリカン、糖タンパク、エラスチン、ヒアルロン酸などに分類され、生体組織構築の形成・維持のほかに、サイトカインや成長因子などと結合してこれらを活性化し、腫瘍化に大きく関わっていると報告がある。中でも悪性腫瘍との関連が示唆されている ECM のひとつに糖タンパクであるテネイシン C (Tenascin-C; TNC) があり、その役割が注目されている。

TNC は正常組織の発生初期段階に発現し、個体成長に伴い大部分の組織において消失するが、創傷治癒過程や炎症反応においては再び産生誘導が認められる。腫瘍における TNC については、ヒトの様々な腫瘍組織で認められるが、中でも乳腺腫瘍は、間質組織の TNC と腫瘍悪性度との相関性が検討された初めての腫瘍であり、ヒト乳癌組織内の間質組織における TNC 発現量は、病期・リンパ節転移・皮膚転移と相関性が認められている。獣医療においても、悪性度の高いイヌ乳腺腫瘍で TNC が認められた

という報告がなされている。こうした臨床的な背景から、乳腺腫瘍において ECM 中の TNC は治療標的として重要なものの1つと考えられる。

腫瘍における TNC と悪性度との関連について *in vitro* での研究もなされており、TNC と腫瘍細胞の増殖、上皮間葉転換、血管新生、転移巣形成などとの関連がいくつかの報告で示唆されているが、実験系によってその結果は大きく異なり、腫瘍組織内において TNC が腫瘍進展に与える影響は依然として不明な点が多い。TNC に関する研究において大きな問題のひとつは、TNC が腫瘍微小環境の中で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。腫瘍微小環境における TNC の産生調節機構についても不明な点が多い。

腫瘍微小環境における TNC の発現と悪性化に関わる意義に関して、明らかにすべき点は数多く残されているが、本研究では腫瘍微小環境における TNC と腫瘍細胞の増殖への影響に焦点をあて研究を進めた。

第一章では、腫瘍の増殖過程における TNC の意義を評価するために、通常の培養状態では TNC を産生しないマウス乳癌細胞株 GLMT1 細胞を、同系の GRS/A マウスの野生型 (WT) マウスおよび TNC ノックアウト (TNC-KO) マウスへと移植するシンジェニックマウスモデルを用い、TNC の発現を制御した場合の腫瘍増殖との関連を評価した。間質細胞が TNC を発現できる状況下での腫瘍組織は、組織辺縁部を中心に TNC が誘導され、時間の経過と共に発現強度は増加し、腫瘍体積に関しても TNC が発現できない状況下の腫瘍組織と比べて有意に増加したことから、腫瘍細胞の増殖と腫瘍辺縁部に認められた TNC との間に何らかの関連があることが示唆された。

移植後3週目には、間質細胞が TNC を発現できるかどうかの状況に関わらず、腫瘍中心部の壊死巣に TNC が観察されたことから、局所での炎症性刺激や低酸素環境により、通常培養下では TNC を産生しない GLMT1 細胞からも TNC が産生されるこ

とが示唆された。

以上より、移植後 2 週目の腫瘍は、TNC-KO マウス腫瘍では、腫瘍細胞からも間質細胞からも TNC 産生が認められないが、WT マウス腫瘍では、間質細胞からの TNC 産生は間違いなく存在し、TNC-KO マウス腫瘍とくらべても有意に腫瘍体積が大きいことから、TNC 存在下および非存在下での腫瘍成長を評価するのに適していると考えられた。

第二章では、原発腫瘍の成長に関連する TNC の作用機序を探るために、上記のモデルを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、得られた遺伝的プロファイルを比較して有意に変化がみられる遺伝子群については、定量的 PCR を用いて検証を行った。解析結果から、TNC 存在下の腫瘍組織では、サイトカインをはじめ様々な遺伝子発現に変化がみられた。特に、サイトカインのうち、一部の ELR 陽性ケモカイン (CXCL-1、2、3) と ELR 陰性ケモカイン (CXCL-9、10、11) は TNC の存在によって変化を示し、腫瘍成長に関与している可能性が示唆された。“ELR”は、分子の N 末端に付く 3 つのアミノ酸 (Glu-Leu-Arg) を指し、ELR 陽性ケモカインは、血管新生を促進するのに対して、ELR 陰性ケモカインは、血管新生抑制因子として作用すると報告されている。腫瘍体積が大きく TNC 発現が強い WT マウス移植腫瘍では、TNC-KO マウス移植腫瘍に比べて血管新生を促す ELR 陽性ケモカインが高発現で、血管新生阻害を示す ELR 陰性ケモカインが低発現であったことから、TNC はケモカインの発現を介して腫瘍血管の新生を促進し、原発腫瘍の成長に関与している可能性が示された。

また、ELR 陽性ケモカインは、好中球を強力に集めるのに対し、ELR 陰性ケモカインは、Type1 サイトカイン誘導の免疫を調整する細胞、すなわち、CD4 陽性 T 細胞、Th1 細胞、NK 細胞、単球、樹状細胞などを集めると報告されている。TNC-KO マウス腫瘍において高発現していた ELR 陰性ケモカインは、前述の機序から、血管新生

を抑制していた可能性もある一方で、宿主の抗腫瘍免疫作用の増強を誘導し、その結果、腫瘍成長が乏しかったのかもしれない。

TNC とケモカイン発現、腫瘍血管新生、腫瘍免疫との関係性を調べた研究は未だ存在しないため、これらの新しい仮説は、*in vitro* と *in vivo* の両方において研究を進める必要があり、本章で得られたケモカインを含む網羅的な遺伝子発現プロファイルは、TNC 研究において基盤的なデータとしても有用であると考えられた。

第三章では、第一章において通常培養下では TNC を産生しない GLMT1 細胞からも TNC が産生されることが示唆されたことから、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。WT および TNC-KO マウスの胎仔線維芽細胞 (MEF) の培養上清が GLMT1 細胞に与える影響を評価し、TNC 産生を誘導する候補分子に対する抗体を用いて、その TNC 産生誘導能を評価した。

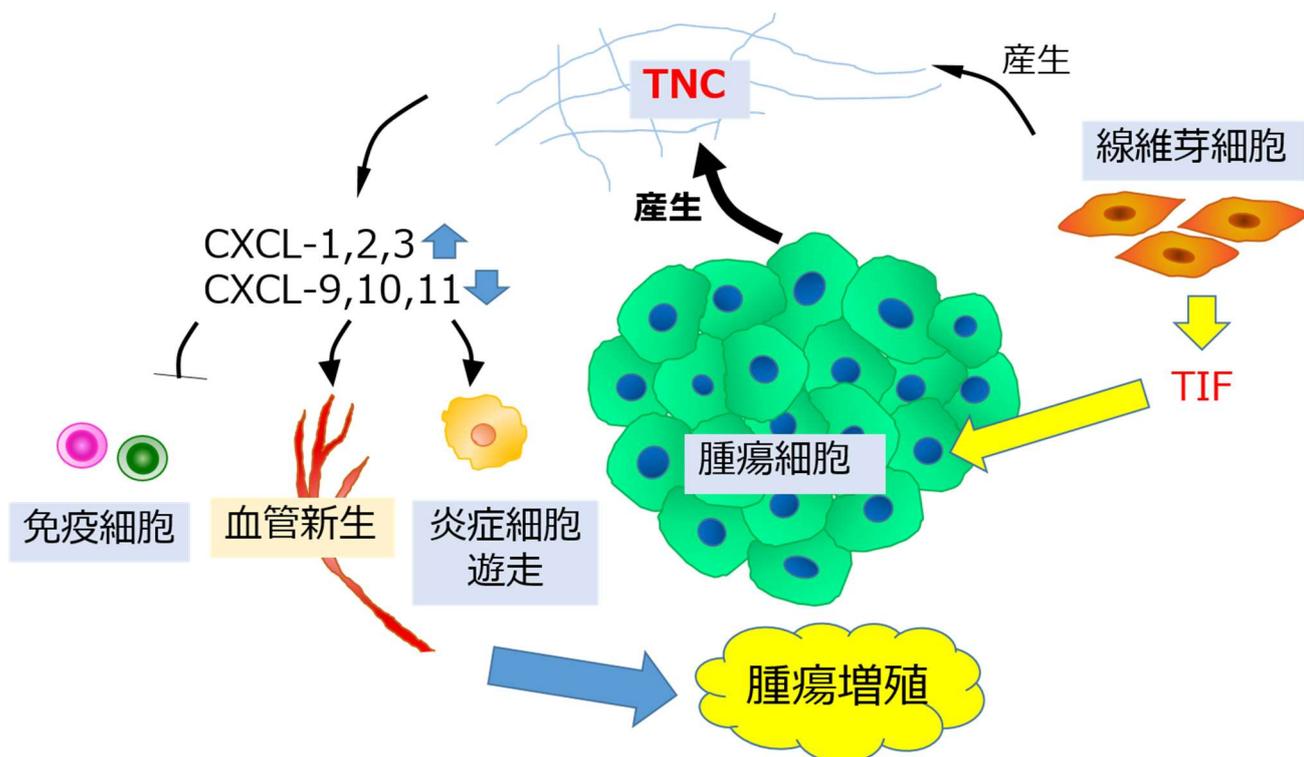
WT マウス由来の MEF 培養上清 (WMC) を GLMT1 細胞に添加したところ TNC タンパク産生、細胞の増殖、形態変化を誘導することが確認された。この反応は TNC-KO マウス由来 MEF 培養上清 (KOMC) では確認されなかったことから、WT マウス由来の MEF 培養上清に TNC 産生を誘導する能力があったと考えられた。過去に、WT マウス由来の MEF 培養上清を分離・解析し、TNC 産生誘導因子 (Tenascin inducing factor; TIF) の候補として分離精製した研究がある。その因子に対して本章では、抗体を作製し、Biacore にて TNC-KO マウス由来 MEF 培養上清には TIF が含まれないことを明らかにした。また、WT マウス由来の MEF 培養上清に抗 TIF 抗体を添加し、GLMT1 細胞を培養すると、培養上清中に産生される TNC タンパク量が減少し、同時に、細胞増殖が抑制された。これらより、WT マウス由来の MEF 培養上清に含まれる TIF は GLMT1 細胞の TNC タンパク産生を誘導することが示された。しかしながら、TNC タンパク全量を抑制したわけではないことから、TNC タンパク産生には他の因子

も関与していると考えられる。

以上より、GLMT1 細胞に TNC 産生をもたらす作用の一部は TIF が関係していると考えられるが、本検討では WT マウス由来の MEF 培養上清自体にも TNC が含まれており、TIF が TNC 誘導をどの程度担っているかを正確に評価することはできず、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との報告もあることから、WT マウス由来の MEF 培養上清において、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 マウス腫瘍での 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、本研究で作製抗 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。

本研究の結果から、乳腺腫瘍増殖における TNC の役割は次のように想定された (Fig)。腫瘍微小環境では、間質細胞と腫瘍細胞が相互作用し、それぞれの細胞から TNC が産生される。腫瘍細胞からの TNC 産生には、間質細胞から産生した TIF が関与する可能性がある。さらに、産生された TNC はケモカインを介して、血管新生の増強や宿主の抗腫瘍免疫作用の減弱を誘導し、腫瘍増殖を促進している可能性がある。しかしながら、本研究で明らかになっていない点も多く、第一章においては、乳腺腫瘍内で間質細胞由来の TNC と腫瘍細胞由来の TNC を明確に区別することができなかった点、第二章においては、網羅的解析により抽出された遺伝子の全てを評価できていない点、第三章においては、がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast; CAF) をマウスの胎仔線維芽細胞 (MEF) の培養上清で代用したために、CAF と腫瘍細胞の正確な相互作用を検討できなかった点、および、TIF の化学的・生物学的性状を明らかにできていない点、TNC タンパク量と TNC mRNA 量の関係など、今後 TNC 発現の機序やその役割に関するさらなる研究が必要であると考えられる。

これまでの臨床研究において、腫瘍の種類によっては担癌患者の血清に TNC がみとめられる<sup>95)</sup>との報告もあり、TNC が腫瘍の早期診断や、低侵襲性のリキッドバイオプシーに利用できる可能性がある。また、TNC を利用した腫瘍の治療法について考えてみると、TNC は成人の正常組織にはほとんど発現しておらず、また、乳腺腫瘍組織では CAF だけでなく、乳腺腫瘍細胞からも産生される可能性があることから、例えば、抗 TNC 抗体に殺細胞性のある薬剤や物質を結合させたものが新たな治療法となる可能性がある。さらに、TNC 自体が腫瘍の増殖に関与していることから、抗 TNC 抗体単体でも、抗体薬として利用することができるかもしれない。ホルモン受容体・HER2 受容体ともに陰性で、生物学的悪性度が高く従来の薬物治療が反応しないトリプルネガティブと呼ばれる乳腺腫瘍で、TNC が高発現している<sup>96)</sup>ことが最近明らかになってきており、そうした難治性癌の治療においても、将来、TNC がその診断治療に重要な役割を果たす可能性もある。TNC 産生を早期診断に用いたり、TNC 産生制御による抗がん治療法を確立するためには、本研究で明らかになった TNC の生物学的意義を新たな一端とし、今後さらなる解明が必要であると考えられる。



**Fig.** 乳腺腫瘍増殖におけるテネイシン C (TNC) の役割

TNC は一般的には間質細胞 (線維芽細胞) から産生されますが、第一章では、通常培養下では TNC を産生しない乳腺腫瘍細胞 (GLMT1) からも産生した可能性が示唆された。第二章では、TNC は ELR 陽性ケモカイン産生増加・ELR 陰性ケモカイン産生減少を介して、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。第三章では、は間質細胞から産生された TIF が、GLMT1 細胞に作用して TNC 産生を誘導した可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。本研究の実施と論文作成にあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医外科学研究室 西村亮平教授に懇切なるご指導ご鞭撻を賜った。また、先端技術開発研究室教授 日下部守昭先生には、本研究を遂行するにあたって全面的にご指導を頂いた。ここに深謝の意を表す。獣医外科学研究室 中川貴之准教授、佐伯亘平特任助教にはご助言を頂くとともに本論文の細部にわたりご指導を頂いた。ここに深謝の意を表す。動物実験では、東京医薬専門学校の河邊友範先生に場所をはじめ様々な協力をしていただいた。ここに感謝の意を表す。cDNA マイクロアレイ解析、qRT-PCR 解析では、弘前大学食料科学研究所教授 中井雄治先生にご指導、ご助言を頂いた。ここに感謝の意を表す。また、先端技術開発研究室の皆様には、qRT-PCR 解析を手伝っていただいた。ここに感謝の意を表す。本専攻同研究室の皆様には研究遂行にあたり日頃より有益なご助言を頂いた。ここに感謝の意を表す。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費（課題番号 25221205）によった。

## 参考文献

1. がん情報サービス 国立がん研究センター ganjoho.jp
2. Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH. Tumors of the mammary gland. In: Withrow & MacEwens Small animal Clinical Oncology, (withrow SJ, Vali DM, Page RL. Eds), 5<sup>th</sup> ed. 2013; 538-56.
3. 日本乳癌学会 乳癌診療ガイドライン <http://jbcs.gr.jp/guidline/>
4. Goldhirsch A, Winter EP, Coates AS, et al. : Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Cancer. Ann Oncol. 2013;24:2206-23.
5. 公益財団法人がん研究振興財団 . がんの統計 '16. [http://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/brochure/backnumber/2016\\_jp.html](http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/brochure/backnumber/2016_jp.html).
6. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, et al. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 1996;14:2197-205.
7. Rahman ZU, Frye DK, Smith TL, et al. Results and long term follow-up for 1581 patients with metastatic breast carcinoma treated with standard dose doxorubicin-containing chemotherapy : a reference. Cancer. 1999 ; 85 (1) : 104-11.
8. Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. Breast Cancer Res Treat. 2018;167:459-468.
9. Soares M, Correia J, Peleteiro M.C, et al. St Gallen molecular subtypes in feline

- mammary carcinoma and paired metastases-disease progression and clinical implications from a 3-year follow-up study. *Tumour Biol.* 2016;37:4053–4064.
10. Papavramidou N, Paparamidis T, Demetriou T. Ancient greek and Greco-roman methods in modern surgical treatment of cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:665-7.
  11. Willis RA. *The spread of tumours in the human body.* Butterworth and Co. 1952.
  12. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016; 18:84.
  13. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19:1423-37.
  14. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:227-42.
  15. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372:320-30.
  16. Mordenti J, Thomsen K, Licko V, et al. Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans. *Toxicol Pathol.* 1999;27:14-21.
  17. Mo HN, Liu P. Targeting MET in cancer therapy. *Chronic Dis Transl Med.* 2017;19:148-53.
  18. de Groot AF, Appelman-Dijkstra NM, van der Burg SH, et al. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors- A systematic reviews. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:18-28.
  19. Kato D, Yaguchi T, Iwata T, et al. Prospects for personalized combination immunotherapy for solid tumors based on adoptive cell therapies and immune

- checkpoint blockade therapies. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2017;40:68-77.
20. Karamouzis MV, Moschos SJ. The use of endostatin in the treatment of solid tumors. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9:641-8.
  21. Yamada KM, Yamada SS, Pastan I. The major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts is an agglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72:3158-62.
  22. Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, et al. Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Dec;82:8075-9.
  23. Kruse J, Keilhauer G, Faissner A, et al. The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature*. 1985 Jul 11-17;316:146-8.
  24. Erickson HP, Inglesias JL. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature*. 1984 Sep 20-26;311:267-9.
  25. Chiquet M, Fambrough DM. Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol*. 1984 Jun;98:1926-36.
  26. Chiquet M, Fambrough DM. Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J Cell Biol*. 1984 Jun;98:1937-46.
  27. Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, et al. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1983 Jun;43:2796-805.
  28. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Person CA, et al. Tenascin: an extracellular

matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*. 1986; 47:131-9.

29. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3.
30. Giblin S, Midwood KS. Tenascin-C: form versus function. *Cell Adh Migr*. 2015;9:48-82.
31. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*, 2009;3:287-310.
32. Aufderheide E, Chiquet-Ehrismann R, Ekblom P. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J Cell Biol*. 1987;105:599-608.
33. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, et al. Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *Int J Cancer*. 1991; 47:811-6.
34. Erickson HP, Bourdon MA. Tenascin: An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:71-92.
35. Sakakura T. Role of tenascin in cancer development. In *Tumor Matrix Biology*, (ed. Adany R.) CRC Press. 1995:101-29.
36. Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, et al. Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci*. 2001;68:3175-99.
37. 坂倉照好, 日下部守昭. 炎症におけるテネイシン発現の多様な調節機構. *炎症*. 1995;15:377-81.
38. Murakami R, Yamaoka I, Sakakura T. Appearance of tenascin in healing skin of the wounded tissues. *Int J Dev Biol*. 1989;33:439-44.

39. Mackie E, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol.* 1988;107:2757-67.
40. Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* 2006;244:143-63.
41. Yang Z, Ni W, Fang L, et al. Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2017;102:262-7.
42. Jahkola T, Toivonen T, von Smitten K, et al. Expression of tenascin in invasion border of early breast cancer correlates with higher risk of distant metastasis. *Int J Cancer.* 1996;69:445-7.
43. Tokes AM, Szasz AM, Farkas A, et al. Stromal matrix protein expression following preoperative systemic therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:731-9.
44. Yoshimura H, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, et al. Cellular sources of tenascin-C in canine mammary carcinomas. *Vet Pathol.* 2015;52:92-6.
45. Mackie EJ, Chiquet-Ehrismann R, Pearson CA, et al. Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4621-5.
46. Brellier F, Chiquet-Ehrismann R. How do tenascins influence the birth and life of a malignant cell? *J Cell Mol Med.* 2012;16:32-40.
47. Saupe F, Schwenzer A, Jia Y, et al. Tenascin-C Downregulates Wnt Inhibitor Dickkopf-1, Promoting Tumorigenesis in a Neuroendocrine Tumor Model. *Cell Rep.* 2013;5: 482-492.
48. Talts JF, Wirl G, Dictor M, et al. Tenascin-C modulates tumor stroma and

- monocyte/macrophage recruitment but not tumor growth or metastasis in a mouse strain with spontaneous mammary cancer. *J Cell Sci.* 1999;112:1855-1864.
49. Chiovaro F, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Transcriptional regulation of tenascin genes. *Cell Adh Migr.* 2015;9:34-47.
  50. Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA. Participation of tenascin and transforming growth factor-beta in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 1989;49:4322-5.
  51. Hiraiwa N, Kida H, Sakakura T, et al. Induction of tenascin in cancer cells by interactions with embryonic mesenchyme mediated by a diffusible factor. *J Cell Sci.* 1993;104:289-96.
  52. Calvo A, Catena R, Noble MS, et al. Identification of VEGF-regulated genes associated with increased lung metastatic potential: functional involvement of tenascin-C in tumor growth and lung metastasis. *Oncogene.* 2008;27:5373-84.
  53. Tanaka K, Hiraiwa N, Hashimoto H, et al. Tenascin-C regulates angiogenesis in tumor through the regulation of vascular endothelial growth factor expression. 2004;108:31-40.
  54. Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, et al. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci.* 2009;100:1451-9.
  55. O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:16002-7.
  56. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med.* 2011;17: 867-

- 74.
57. Tsunoda T, Inada H, Kalemeyi I, et al. Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *Am J Pathol.* 2003; 162(6):1857-67.
58. Atula T, Hedstrom J, Finne P, et al. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23:3051-6.
59. Aishima S, Taguchi K, Terashi T, et al. Tenascin expression at the invasive front is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol.* 2003;16:1019-27.
60. Iskaros BF, Koss LG. Tenascin expression in intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1282-6.
61. Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, et al. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 1995;1:1035-41.
62. Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E, et al. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer.* 1997;73:10-5.
63. Kalemey I, Yoshida T, Iriyama K, et al. Analysis of tenascin mRNA expression in the murine mammary gland from embryogenesis to carcinogenesis: an in situ hybridization study. *Int J Dev Biol.* 1997;41:569-73.
64. Sakai T, Kawakatsu H, Ohta M, et al. Tenascin induction in tenascin nonproducing carcinoma cell lines in vivo and by TGF-beta1 in vitro. *J Cell Physiol.* 1994;159:561-72.

65. Inaguma Y, Kusakabe M, Mackie EJ, et al. Epithelial induction of stromal tenascin in the mouse mammary gland: from embryogenesis to carcinogenesis. *Dev Biol.* 1988;128:245-55.
66. Proskuryakov SY, Gabai VL. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des.* 2010;16:56-68.
67. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2005.
68. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, et al. affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20:307-15.
69. McCall MN, Bolstad BM, Irizarry RA. Frozen robust multiarray analysis (fRMA). *Biostatistics.* 2010;11:242-53.
70. Davis S, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics.* 2007;23:1846-7.
71. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:207-10.
72. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27-30.
73. Kutmon M, Riutta A, Nunes N, et al. WikiPathways: capturing the full diversity of pathway knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2015;gkv1024.
74. Milacic M, Haw R, Rothfels K, et al. Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome. *Cancers.* 2012;4:1180-1211.
75. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinforma.* 2011;27:431-2.

76. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25:1091-3.
77. Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, et al. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. 2015.
78. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:540-50.
79. Zhu Q, Han X, Peng J, et al. The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. *J Mol Histol*. 2012;43:699-713.
80. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995;270:27348-57.
81. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res*. 2011;317:685-90.
82. Keane MP, Belperio JA, Xue YY, et al. Depletion of CXCR2 Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in a Murine Model of Lung Cancer. *J Immunol*. 2004;172:2853-60.
83. Lowy CM, Oskarsson T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adhes Migr*. 2015;9:112-24.
84. Strieter RM, Belperio JA, Burdick MD, et al. CXC Chemokines: Angiogenesis, Immunoangiostasis, and Metastases in Lung Cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1028:351-60.
85. Pan J, Burdick MD, Belperio JA, et al. CXCR3/CXCR3 ligand biological axis impairs RENCA tumor growth by a mechanism of immunoangiostasis. *J Immunol*. 2006;176: 1456-64.

86. 特許第 3850492 号『テネイシン誘導因子』日下部守昭
87. Beiter K, Hiendlmeyer E, Braletz T, et al. beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene*. 2005;24:8200-4.
88. Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol*. 2000;19:581-96.
89. Imai K, Kusakabe M, Sakakura T, et al. Susceptibility of tenascin to degradation by matrix metalloproteinases and serine proteinases. *FEBS Lett*. 1994;352:216-8.
90. Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z. The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 1994;54:439-53.
91. Siri A, Knauper V, Veirana N, et al. Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1995;270:8650-4.
92. Jinnin M, Ihn H, Asano Y, et al. Platelet derived growth factor induced tenascin-C transcription is phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and mediated by Ets family transcription factors. *J Cell Physiol*. 2006;206:718-27.
93. Chiquet M, Sarasa-Renedo A, Tunc-Civelek V. Induction of tenascin-C by cyclic tensile strain versus growth factors: distinct contributions by Rho/ROCK and MAPK signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1693:193-204.
94. Zhang B, Wang J, Wang X, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2014;518:382-7.
95. Susanne S, Jurgen M, Gunter V, et al. Tenascin-C in serum: a questionable tumor marker. *Int J Cancer*. 1995;61:443-9.

96. Popova OP, Bogomazova SY, Ivanov AA. Role of tenascin C in triple-negative breast cancer. *Arkh pathol.* 2017;79:10-15.