

## 論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍進展に関わるがん転移制御分子の同定と解析

氏名 宮田 憲一

がん微小環境には、腫瘍細胞以外にも線維芽細胞や骨髄由来細胞といった宿主正常細胞も含まれており、がんの悪性を助長している。止血や血管の恒常性維持に不可欠な血小板もがん微小環境の構成因子の1つであり、脆弱な腫瘍内新生血管から腫瘍内部へ漏出している。腫瘍内部でがん細胞と相互作用し誘発される血小板凝集は、血小板に内包されている増殖因子やサイトカインの放出を促し、がんの悪性に寄与している。

肺扁平上皮がん (LSCC ; lung squamous cell carcinoma) や神経膠芽腫などの高悪性度な腫瘍に発現が認められる膜貫通型糖タンパク質 Podoplanin (PDPN) は、血小板上の CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2) と直接結合することで、血小板を活性化し、血小板凝集を惹起する。所属研究室では血小板凝集のトリガーとしての PDPN によるがんの悪性化機構に着目しており、過去に PDPN 陽性 LSCC 由来 PC-10 細胞のマウス皮下移植 (Xenograft) モデルにおいて、PDPN 陰性肺腺がん由来 A549 細胞よりも腫瘍内部に漏出している血小板数が多いこと、さらに PDPN を介した血小板凝集により放出される液性因子が腫瘍増大に関与している可能性を示唆してきた。しかし、この詳細なメカニズムは分かっていなかった。そこで、PDPN を介した血小板凝集が腫瘍増大に与えるメカニズムの解明を目的とした。

LSCC 細胞に発現している PDPN を CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトすると、*in vitro* における細胞増殖能には影響を与えないにも関わらず、マウス皮下へ移植すると腫瘍体積は著しく抑制された。逆に、PDPN 陰性細胞に PDPN を強制発現させると、その腫瘍体積の増大が促進されたが、細胞増殖能には影響を与えなかった。さらに、

PDPN 強制発現株の腫瘍内には活性化血小板が多く検出されたため、PDPN による血小板凝集の惹起が腫瘍増大の原因である可能性が推察された。*In vitro* 解析において、LSCC 細胞は PDPN 依存的に血小板凝集を惹起し、それによって血小板から放出された液性因子が、細胞増殖を促進した。また、この反応上清は LSCC 細胞のシグナル X を介して増殖を促進していることを Phospho-RTK Array 解析によって明らかにした。次に、LSCC 細胞 Xenograft モデルにおいて、抗血小板薬及び抗 PDPN 中和抗体を用いて血小板凝集を抑制すると、腫瘍増大とシグナル X の活性化が抑制された。これらの結果から、PDPN 陽性 LSCC 細胞における PDPN は、脆弱な腫瘍血管から漏出した血小板を活性化し、シグナル X のリガンドの放出を促すことで、腫瘍増大に寄与していることが明らかとなった。

また、先行研究によると、PDPN の強制発現は EMT (epithelial-mesenchymal transition) や Rho/ROCK シグナルを制御することで運動・浸潤能を高めること、さらに皮下移植時における肺転移 (自然転移) を促進することも報告されている。一方で、PDPN を内在的に発現している MBT-2 (膀胱がん) や B16 (悪性黒色腫) 細胞は同系マウス皮下へ移植すると、腫瘍を形成するにも関わらず肺転移が生じない。これらの報告から、PDPN 以外の転移制御機構も自然転移の過程において必須であることが推察されるため、PDPN 以外の転移制御機構の解明を研究目的とし、転移制御分子の探索を行った。

まず、B16BL6 細胞由来の cDNA もしくは Mouse transcript を標的として設計された shRNA ライブラリー感染させた細胞株を同系マウスの皮下へ移植した。そして、皮下腫瘍から肺転移した細胞株をソーティング (*in vivo* スクリーニング) することで、新規自然転移制御分子の同定を試みた。このサイクルを 2 回繰り返した結果、自然転移抑制遺伝子として既に報告されている Damage specific DNA binding protein 2 (Ddb2) と未知の遺伝子 Y を標的とした shRNA が導入された MBT-2 細胞のみが肺転移していることが分かった。そのため、遺伝子 Y を Metastasis-suppressing factor 1 (MSF1) とし、以後の解析へと進めた。

自然転移の初期段階は、細胞運動・浸潤能によって制御されている報告があるため、MSF1 をノックダウンした MBT-2 細胞 (MBT-2/shMSF1) において、Boyden チャンバーを用いて運動能を評価した。その結果、MBT-2/shMSF1 細胞は、コントロール細胞 (MBT-2/shMock) と比較して運動能が増加し、逆に MSF1 を過剰発現させると運動能は抑制された。以上の結果から、MSF1 は運動能を負に制御することで、自然転移を抑

制していることが示唆された。次に、ヒト細胞においても解析を行った。まず公共データベースを用いて臨床との発現相関を解析した結果、膀胱がん患者においてその Grade と MSF1 の発現量が逆相関していた。そこで、MSF1 の発現が確認されたヒト膀胱がん細胞株 UM-UC-5 細胞において、MSF1 のノックダウンによる影響を評価した。その結果、MSF1 のノックダウンによって UM-UC-5 細胞の運動能が顕著に亢進した。さらに、RhoA/ROCK 阻害剤で処理すると、その運動能の亢進は抑制された。これらの結果から、MSF1 はヒト細胞において、Rho/ROCK シグナル依存的に運動能を抑制している可能性が示唆された。