

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 齋藤友睦

指導教員名 西村亮平

論文題目 **Effects of inflammatory stimulations on epithelial-mesenchymal transition of tumor cells and tumor malignancy in canine mammary gland tumor**
(犬乳腺腫瘍において炎症性刺激が上皮間葉転換と腫瘍の悪性化に及ぼす影響)

乳腺腫瘍(cMGT)は雌犬で最も発生の多い腫瘍であり、ある調査では10,000頭中111頭が罹患すると報告されている。cMGTの約半数は悪性と診断されるが、その中でも炎症性乳癌(cIMC)は極めて進行が早く、早期に肺、心臓、脾臓、肝臓、膀胱、リンパ節、脳へと転移する。このためcIMCは予後は不良で、平均生存期間は約53日と報告されている。cIMCの病態は人炎症性乳癌(hIBC)と類似しており、炎症様の臨床徴候、即ち発赤、熱感、浮腫、疼痛などを示すことが特徴である。病理組織学的には腫瘍細胞による真皮リンパ管塞栓がみられる。hIBCにおいては全身性の化学療法、外科的切除、放射線療法を複合した治療法が推奨されているが、cIMCにおいては、これらの治療を行っても効果は限定的であると報告されている。

上皮間葉転換(EMT)は上皮細胞がその細胞極性を喪失し、線維芽様の細胞へと性質及び形態の変化を起こす現象である。EMTは元来、発生期の原腸陥入や心臓形成、また組織の線維化などに関与する現象として知られていたが、近年、癌の悪性化、特に浸潤、転移に関与する現象として注目されている。EMTではE-cadherin、ZO-1、Cytokeratinなどの上皮系マーカーの減少や喪失、Vimentin、N-cadherin、Fibronectinなどの間葉系マーカー発現の亢進がみられる。EMTを誘導する因子として、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β)などが知られていたが、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)、インターロイキン6

(IL-6)、インターロイキン8 (IL-8)などの炎症性サイトカインによっても EMT が誘導され得ることが示されてきた。

一方、炎症性サイトカインは腫瘍微小環境において腫瘍の悪性化に関与すると報告されている。その中でも炎症性サイトカインが腫瘍細胞に働きかけ、その性質を悪性化する可能性が注目されている。実際 hIBC 患者では、腫瘍随伴性マクロファージから TNF- α や IL-8 などの炎症性サイトカインが分泌されており、それらが hIBC 由来の培養細胞に対して EMT 誘導を起こすことが示されている。しかし、cIMC においてはその悪性度と炎症性サイトカイン及び炎症性サイトカイン誘導性 EMT との関連についてはほとんど分かっていない。

そこで本研究は、cIMC と EMT との関連を犬の非炎症性乳癌(non-cIMC)と比較することにより評価すること(第1章)、及び炎症性刺激によるがんの悪性化と EMT の関係性の評価を行うこと(第2~4章)を目的とし検討を行った。

第1章では、cIMC(n=17, cIMC 群)及び non-cIMC (n=25, non-cIMC 群)の摘出組織標本に対し免疫組織化学染色を行い、EMT の有無、進行状態及び臨床データとの比較検討を行った。組織学的に、真皮リンパ管への腫瘍細胞の浸潤、塞栓が認められた例を cIMC とし、免疫組織化学染色による EMT の評価には、上皮系マーカー3 種(E-cadherin、ZO-1、Cytokeratin18)及び間葉系マーカー2 種(Vimentin、Fibronectin)を用いた。両群間において、患者の平均年齢及び犬種に差異は認められなかった。また、両群とも各 EMT マーカーの発現に相関は認められなかった。群間の比較では、cIMC 群において Fibronectin の発現が有意に上昇、non-cIMC 群で Cytokeratin18 の発現が有意に低下していた。また、EMT の進行状態を評価する指標として上皮系マーカーでは5%以上の発現減少、間葉系マーカーでは5%以上の発現を EMT 陽性として、各標本における陽性マーカー数を比較したところ、EMT 陽性項目数は cIMC 群で有意に多かった。さらに細胞毎の EMT 進行状態の評価を行うため、E-cadherin 及び Vimentin による免疫蛍光二重染色を行ったところ、E-cadherin 陰性/Vimentin 陽性細胞が cIMC 群において non-cIMC 群よりも有意に増加しており、Vimentin 発現の増加傾向も認められた。今回の検討では患者の予後データが得られず、対象症例数も少なかったが、上皮系マーカーの喪失の増加、間葉系マーカーの発現増加傾向がみられ、cIMC の病態に EMT が関与していることが示唆された。

次章では cIMC における炎症性サイトカインと EMT の関連について検討するために、cMGT 細胞株に対し TGF- β 及び炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 が与える影響を in vitro、in vivo の両面から評価、検討を行った。まず第2章では、実験に使用する犬由来組換えタンパク質として canineTGF- β (cTGF- β)、canineTNF- α (cTNF- α)、canineIL-6 (cIL-6)を大腸菌発現系を用いて作製した。作製したサイトカインの有用性を評価する為、humanTGF- β により EMT 誘導を示す犬腎由来細胞 MDCK 細胞に作用させた。刺激方法は cTGF- β 、cTNF- α 、cIL-6 単独及び cTGF- β /cTNF- α 混合、cTGF- β /cIL-6 混合で、濃度を 10ng/mL、刺激時間を 6、12、24 時間とした。タンパク質サンプルは可溶、不溶の分画に

分けて回収しウェスタンブロット法にて評価した。その結果、各サイトカインにより E-cadherin 局在の移行及び発現の減少が認められ、免疫蛍光染色においても混合刺激時に刺激後 6、24 時間の双方で E-cadherin 発現の現象が認められたこと、さらに TNF- α 単独刺激、cTGF- β /cTNF- α 混合刺激により、刺激後 6 日で細胞形態の変化が生じることが示されたことから、これらのサイトカインは犬由来細胞株に対して EMT 様の変化を誘導し得ることが明らかになった。そこでこれ以降の検討にはこれらのサイトカインを使用し cMGT における炎症性サイトカインと EMT について検討を行った。

第 3 章のセクション 1 では、犬乳腺腫瘍由来細胞株 6 種（原発巣由来 3 株、対応する転移巣由来 3 株）に対し、第 2 章で精製したサイトカインによる EMT 誘導を評価した。上皮系マーカーとして E-cadherin、ZO-1 を、間葉系マーカーとして Vimentin、N-cadherin、Fibronectin をそれぞれ用い、ウェスタンブロット法により第 2 章と同様に評価した。細胞株毎に各サイトカイン刺激への反応性は多様であったが、原発巣とこれと対応する転移巣から得られた細胞株間では、発現変化に一定の傾向が見られた。それ以外の細胞株間での反応性の差異は、これらの細胞株がクローン化されておらず、多様な性質を持った細胞が様々な比率で含まれていることが一因であると考えられた。そこで各サイトカインの作用を詳細に評価するためにセクション 2 では 6 細胞株の中で炎症性刺激に対して最も強い反応を示した CIPp 株をクローン化し、評価した。限界希釈法により CIPp 株から 11 種のクローン細胞株を単離し、その性状を上皮系、間葉系の各マーカーの発現から評価した。これらの株の中で最も上皮様の性質を有する CIPp-4b 株に対しサイトカイン刺激を行い EMT 誘導の有無を評価したところ、cTNF- α 単独刺激及び cTGF- β /cTNF- α 混合刺激により E-cadherin の発現減少及び N-cadherin、Fibronectin の発現増加が認められた。また、cTGF- β /cIL-6 混合刺激により Vimentin の発現上昇も認められた。これらの発現変化は親株である CIPp 株よりも顕著であった。クローン化された細胞株での結果ではあるが、犬乳腺腫瘍細胞においても炎症性刺激により EMT 様の変化が誘導されることが示唆された。

第 4 章では、生体内での炎症性刺激が犬乳腺腫瘍細胞に与える影響について検討した。雌 5 週齢の Balb/c ノードマウスの左腋窩に 5×10^5 個の CIPp-4b 細胞を皮下移植して定着させた後、腫瘍内及びその周囲に各サイトカインの単独及び組み合わせを 50 ng/head で投与した。刺激後 2 週間での腫瘍サイズは cTGF- β /cTNF- α 混合刺激マウス群において cTNF- α 単独刺激マウス群を除く他群と比較して有意に増大した。また、cTGF- β /cIL-6 混合刺激マウスでは肺へ、cTNF- α 単独刺激マウスではリンパ節への転移がそれぞれ確認された。E-cadherin と Vimentin の免疫蛍光二重染色では、原発巣において、E-cadherin と Vimentin の発現が共局在している細胞は少なかった。また腫瘍の辺縁では E-cadherin 発現の低下及び Vimentin 発現の亢進が観察された。リンパ節転移巣では両者の発現は原発巣と類似している一方で、肺転移巣では Vimentin の高発現が認められた。以上の結果より、炎症性刺激により腫瘍の増大及び悪性化が引き起こされたことが示唆された。また、腫瘍の浸潤、転移には EMT が関与しており、中でも Vimentin 発現が何らかの役

割を果たしている可能性があることも示された。しかしながら、実験の過程において移植マウスが cIMC の臨床徴候を示すことはなかった。cIMC と EMT の関連の精査のためには、より理想的なマウスモデルの作成が望まれる。

本研究により、cIMC では non-cIMC と比較して EMT が進行していることが示唆された。また、炎症性サイトカインは *in vitro* において cMGT 由来細胞において EMT 様の現象を誘導すること、*in vivo* において腫瘍の悪性度を増強することが示された。更に、炎症反応による腫瘍の悪性化には E-cadherin の発現減少と Vimentin の発現亢進が関与している可能性が示唆された。一方、cIMC の病態やその悪性度に炎症性サイトカイン誘導性 EMT がどのようなシグナルを介し影響を与えているかは不明なままである。cIMC 治療のターゲットとなり得る分子を探るためにも、それを解き明かす更なる研究が必要である。