

論文の内容の要旨

論文題目 肺腺がん細胞の実験的転移系を用いた転移関連分子の同定と機能解析

熊谷友紀

がん転移はがんの悪性の最終段階であり、がん治療を困難にしている大きな原因の1つである。主ながん転移の経路として、がん細胞が血管を通して他の場所や臓器に移動する血行性転移がある。これは、浸潤、血管内侵入、血中移動、血管内皮への接着、血管外遊出、転移巣形成といった多段階機構から成っており、これら全てのステップを乗り越えることが、がん転移には必須であると考えられている。また、近年では上皮間葉転換 (EMT) やがん幹細胞、さらにはがん組織を取り囲む微小環境の転移への関与が報告されてきており、がん転移の分子機構に関して明らかにすべき点が、未だ多く残されている。転移に関わる新規遺伝子の網羅的探索方法の一つとして、動物を用いた転移系により、がん細胞株から高転移性の亜株を作成し、親株と遺伝子発現パターンを比較するという手法がある。代表的な例では、1973年に Isaiah J. Fidler がマウスメラノーマ細胞株 B16 をマウス尾静脈に注射し、肺に形成された転移巣から細胞株を作成するという実験的肺転移過程を繰り返し、高転移性細胞株 B16F10 を作成した。

本研究では転移に関わる新規遺伝子を網羅的に探索するため、独自に樹立した細胞株 IMSMP1 から高転移性の細胞株を作成した。IMSMP1 は、がん抑制遺伝子 *Cadm1* (*Cell Adhesion Molecule 1*) のノックアウトマウスに自然発生した肺腺がんより樹立した細胞株であり、ヌードマウスへの尾静脈注射により肺に転移巣を形成する。そこで、肺に形成された独立した2つの転移巣からそれぞれ細胞株を作成し、IMSMP1-1PA (Pulmonary A) および IMSMP1-1PB (Pulmonary B) とした。さらに、両細胞株を用いてそれぞれ独立に同様の方法で実験的肺転移を繰り返すことにより、8回転移株 IMSMP1-8PA および IMSMP1-8PB までの2系列の細胞株を作成した。親株、4回転移株 (IMSMP1-4PA、IMSMP1-4PB) および8回転移株について、実験的肺転移により転移能を比較したところ、肺表面に形成された転移巣の数は、4PA (n=6、肺転移数 156、107、99、44、23、3 個)、4PB (n=6、肺

転移数 109、60、53、41、36、25 個) および 8PA (n=6、肺転移数 356、313、179、174、13、6 個) であり、親株 (n=6、肺転移数 37、23、8、6、2、0 個) と比較して有意に上昇していた (それぞれ $p=0.045$ 、 0.010 、 0.045)。8PB (n=6、肺転移数 337、103、39、15、5、1 個) においては有意差を認めなかったが、転移巣数が上昇しているという傾向が見られた ($p=0.262$)。このことから、IMSMP1 細胞の実験的肺転移の繰り返しによって高転移性の細胞株が作成できたと考えられる。

そこで、繰り返し転移株の転移能亢進にどのような細胞特性が寄与しているのか検討するため、*in vitro* の実験を行った。まず、足場非依存的な増殖能を検討するため、軟寒天コロニーフォメーションアッセイを行ったところ、形成されたコロニー数は親株が 57 ± 15 個であるのに対し、4PA が 168 ± 97 個、4PB が 141 ± 113 個、8PA が 100 ± 34 個、8PB が 389 ± 154 個であり、繰り返し転移株で多く、足場非依存的な増殖能が転移能亢進の原因の 1 つである可能性が示唆された。以上の結果より、IMSMP1 の繰り返し転移株は、実験的肺転移により悪性度が増し、転移能が亢進していることが示された。また繰り返し転移株の転移能亢進に寄与する細胞特性の 1 つとして、足場非依存的増殖の増加が関わる可能性が示唆された。

次に、これらの細胞株から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。転移と発現が正に相関する遺伝子の探索のため、4PA、4PB、8PA、8PB の発現量が IMSMP1 よりも大きく、8PA と 8PB の平均発現量が IMSMP1 の 10 倍以上で、しかも 8PA と 8PB の平均シグナル強度が 1000 以上という条件により、遺伝子の絞り込みを行ったところ、228 遺伝子が得られた。その中には、既に転移促進因子として機能が知られている因子 (Cldn2、Tnf) に加え、幹細胞マーカー (Nes、Cd44、Cd133) や細胞分裂を進行する因子 (Ccn2、Ccnb1、Cdc6、Ccnb2) をコードする遺伝子が含まれており、本アッセイ系が新規転移関連遺伝子の探索に適切であるということが示唆された。さらに、抽出した遺伝子群の中から 4PA < 8PA かつ 4PB < 8PB で段階的な発現増加が見られ、まだ転移促進遺伝子としての報告のない遺伝子で、かつ膜タンパク質や転写因子、キナーゼなどの抗体医薬や各種阻害剤で介入が可能だと考えられる遺伝子を選出し、RT-PCR により発現解析を行った。その結果、親株と比較して繰り返し転移株において有意に発現の高い 2 遺伝子 (*Podnl1*、*Chrna1*) が新規転移促進候補遺伝子として選出された。これらの 2 候補遺伝子のヒトのホモログを過剰発現する安定発現株 IMSMP1/PODNL1-HA、IMSMP1/CHRNA1-HA、を作成し、実験的肺転移を行い肺に形成された転移巣の数を数えたところ、IMSMP1/PODNL1-HA においてコントロール細胞と比較して有

意に転移巣数が高いという結果が得られた。以上の結果から、*PODNL1* が転移の促進に関与することが示された。

次に、転移と発現が負に相関する遺伝子探索のため、4PA、4PB、8PA、8PB の発現量がそれぞれ *IMSMP1* よりも小さく、*IMSMP1* に対する 8PA の値が下位 5% かつ *IMSMP1* に対する 8PB の値が下位 5% で、しかも *IMSMP1* のシグナル強度が 1000 以上という条件により絞り込みを行ったところ、311 遺伝子が得られた。さらに、抽出した遺伝子群の中から 4PA > 8PA かつ 4PB > 8PB で段階的な発現低下が見られ、まだ転移抑制遺伝子としての報告のない遺伝子を選出し、RT-PCR により発現解析を行ったところ、親株と比較して繰り返し転移細胞株で有意に発現の低い遺伝子として 4 遺伝子 (*Vldlr*、*Stc2*、*Chchd10*、*Pvrl3*) が転移抑制候補遺伝子として選出された。これらの 4 候補遺伝子のヒトのホモログを過剰発現する安定発現株 4PB/STC2-HA および 8PA/VLDLR-HA、8PA/CHCHD10-HA、8PA/PVRL3-HA を作成し、尾静脈注射により肺に形成された転移巣の数を数えたところ、8PA/VLDLR-HA、8PA/CHCHD10-HA、8PA/PVRL3-HA では、コントロール細胞と比較して有意な差は認められなかった。しかし、4PB/STC2-HA 細胞では、コントロール細胞と比較して有意に肺転移巣の数が抑制された。さらに、軟寒天コロニーフォーメーションアッセイを行ったところ、4PB/vector では形成されたコロニー数が 117 ± 76 個であったのに対し、4PB/STC2-HA では 36 ± 30 個であり、有意にコロニー形成能が低下した。これらの結果から、STC2 は肺がん細胞の転移抑制に機能するということが、またそのメカニズムの 1 つとして足場非依存的増殖の抑制が関与する可能性が示唆された。

STC2 は 4PB の足場非依存的増殖を抑制したことから、多段階転移における転移巣形成の段階に関与していると考えられる。そこで、STC2 が 4PB の生体内での増殖を抑制するかどうか検討するため、4PB/STC2-HA 細胞またはコントロール細胞をヌードマウスの皮下に移植し、形成される腫瘍の体積を計測した。その結果、移植後 6 日目以降、4PB/STC2-HA ではコントロールと比較して腫瘍体積が有意に小さかった。したがって、STC2 が生体内で細胞増殖を抑え、腫瘍形成抑制に働くことが示唆された。一方で、プレート上での培養条件においては 4PB/STC2-HA とコントロール細胞との間の増殖速度に差は認められておらず、STC2 の増殖抑性能は足場非依存的条件下において働くと考えられる。

本研究で、繰り返し実験的肺転移により作成した高転移株の遺伝子発現プロファイルを親株と比較することにより、新規転移促進遺伝子として *PODNL1*、新規

転移抑制遺伝子として *STC2* を同定した。これらの因子は、がん細胞における機能の解析および臨床検体における解析により、がん転移の新規バイオマーカーもしくは治療薬の開発に寄与するものと期待される。