

論文の内容の要旨

論文題目：遺伝子欠損マウスを用いた *CADM1* の肺腫瘍抑制における役割の解析

氏名：伊東 剛

CADM1 は非小細胞肺癌におけるがん抑制遺伝子として同定された、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子をコードする遺伝子である。*CADM1* は肺腺がんの約 60% で発現の低下または欠如が見られ、アレルの欠失あるいはプロモーターのメチル化による不活化を受ける。*CADM1* の不活化は特に進行がんにおいて著明であり、予後、臨床病期の進行度、リンパ管浸潤、脈管浸潤と相関することが報告されている。本研究ではがん抑制遺伝子 *CADM1* の肺腫瘍、特に肺腺がんの抑制における役割について明らかにするために、まず *Cadm1* 遺伝子欠損マウスと *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} 肺腺がんモデルマウスの交配により *K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスを作成し、発生した肺腫瘍に関して *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスとの間で比較検討を行った。以降簡単のため *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスを「K マウス」、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスを「KC マウス」と呼ぶ。

K-ras^{+/*LSL-G12D*} マウスは *K-ras*^{G12D} 遺伝子上流に *loxP*-STOP element-*loxP* 配列を組み込んだアレル (*LSL-G12D*) で野生型 *K-ras* 遺伝子を置換したヘテロノックインマウスである。このマウスの肺へ Cre 組換え酵素を発現するアデノウィルスベクター (Ad-Cre) を鼻腔から経気道的に投与することにより、感染した細胞において *loxP* 配列に挟まれた STOP element が取り除かれて *K-ras*^{G12D} が発現し、がん化を引き起こす。*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに発生する腫瘍性病変は 2 種類に大別される。一方は肺胞上皮の腫瘍性病変で、まず異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia; AAH) が発生し、腺腫を経て腺がんへ至る。他方は細気管支上皮の腫瘍性病変で、細気管支上皮過形成 (epithelial hyperplasia of bronchioles; EH) を生じるが、この過形成は浸潤がんへの進展を認めない。またこのマウスに発生する肺腺がんの遺伝子発現パターンはヒト肺腺がんとは非常によく相関することが示されている。

実験は 6 週齢の K マウスおよび KC マウスに Ad-Cre を投与し、25 週間後に予定解剖することにより行った。解析した個体数は K マウス、KC マウスそれぞれ 8 匹、6 匹であった。マウスの肺には多数の腫瘍を認めたが、鼻腔から気管支にかけての気道には腫瘍を認めず、また主要臓器への転移も認めなかった。まず肺表面に認められた腫瘍について解析を行ったところ、腫瘍の個数は 1 匹あたり K マウスが 6.1 ± 2.7 個、KC マウスが 8.5 ± 2.6 個で有意差を認めなかったが ($p = 0.12$)、腫瘍の大きさを腫瘍長径で比較すると K マウスが 1.5 ± 1.7 mm (中央値 1.0 mm)、KC マウスが 2.5 ± 2.5 mm (中央値 2.0 mm) となり、KC マウスの方が肺表面に有意に大きい腫瘍を生じた ($p = 0.002$)。次に肺の標本の顕微鏡観察を行った。*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに生じる腫瘍を肺胞の腫瘍 (腺腫、腺がん) と細気管支に生じる細気管支上皮過形成 (EH) に分類し、それぞれについて比較検討を行った。腺腫・腺がん と EH

を区別するために肺胞 II 型細胞のマーカー Surfactant Protein C (SPC) および気管支上皮のクララ細胞のマーカー Clara cell secretory protein (CCSP) を免疫組織化学にて検出し、腺腫・腺がんは SPC(+)/CCSP(-)、EH は SPC(-)/CCSP(+) の腫瘍性病変として区別された。まず腺腫・腺がんについて、腫瘍の個数は 1 標本あたり K マウスが 20.4 ± 12.2 個、KC マウスが 32.7 ± 15.6 個であり、有意差は認められなかったが ($p = 0.17$)、腫瘍の面積は K マウスが $0.261 \pm 0.558 \text{ mm}^2$ (中央値 0.098 mm^2)、KC マウスが $0.455 \pm 0.865 \text{ mm}^2$ (中央値 0.217 mm^2) となり、KC マウスの方が有意に大きい腺腫・腺がんを生じた ($p = 5.7 \times 10^{-10}$)。腺腫・腺がんの組織学的異型度を 1~4 の 4 段階のグレードで評価したところ、KC マウスの腫瘍の方が有意に高いグレードを示し、より悪性度の高い腫瘍であった ($p = 5.0 \times 10^{-3}$)。特筆すべきことに、腫瘍細胞の血管内浸潤および胸膜浸潤は KC マウスの方に認められた。次に EH について、個数は 1 標本あたり K マウスが 30.7 ± 5.9 個、KC マウスが 22.3 ± 17.3 個であり、有意差は認められなかった ($p = 0.29$)。EH の面積は K マウスが $0.123 \pm 0.141 \text{ mm}^2$ (中央値 0.071 mm^2)、KC マウスが $0.084 \pm 0.104 \text{ mm}^2$ (中央値 0.053 mm^2) となり、K マウスの方が有意に大きい EH を生じた ($p = 1.3 \times 10^{-3}$)。したがって、KC マウスに生じる腫瘍に関して、腺腫・腺がんは K マウスより大きい一方で EH は K マウスより小さいことが示唆された。

加えて、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスの肺腫瘍における CADM1 タンパク質の発現を評価するため CADM1 の免疫組織化学的解析を行った。CADM1 は正常な気管支上皮と肺胞上皮の両方に発現を認め、腫瘍では EH のほぼ全例において細胞膜に発現が見られたが、腺腫・腺がんでは一部に発現低下または欠如を認めた。そこで腺腫・腺がんに関し、周囲の非がん部と比較して CADM1 の発現が同等である群と低下している群の 2 群に分類した。CADM1 の発現低下は 37.3% (28/75) の腺腫・腺がんにおいて見られた。腫瘍の面積を 2 群間で比較したところ、CADM1 低発現群の腺腫・腺がんの方が有意に大きいことが示唆された ($p = 7.6 \times 10^{-4}$)。さらに組織学的異型度を 2 群間で比較したところ、CADM1 低発現群の腺腫・腺がんの方が有意に高いグレードを示した ($p = 4.2 \times 10^{-5}$)。したがって、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに発生する肺腺腫・腺がんにおいて CADM1 は高頻度に発現の低下を認め、その傾向は特にサイズが大きく組織学的異型度の高い腫瘍において顕著であることが示された。

以上の結果より、CADM1 は肺腺がんの発生よりもむしろ進展を抑制し、その欠如は肺腺がんの増大および悪性化を促進することが示された。さらに、本研究で作成した KC マウスは K マウスと比較して肺腫瘍全体に占める肺腺腫・肺腺がんの割合が高く、また腫瘍の容積が増大することからヒト肺腺がんのモデルとして優れており、肺腺がんに対する抗がん剤のスクリーニングや予防効果の検討を迅速かつ効果的に進めることができるものと期待される。