

氏 名	峯 岸 健太郎
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 642 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	<b>TFF-1 (Torefoil factor) による肺癌の悪性化に関与する形質の抑制</b>
論 文 審 査 委 員	(委員長) 仁 木 利 郎 教 授 (委 員) 鈴 木 拓 児 教 授    鈴 木 浩 一 准教授

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

肺癌は世界的に癌死亡の原因の第一位で、遠隔転移と再発が高頻度であるため 5 年生存率は約 63%である。TFF はその塩基配列の類似性に基き、3 種のアイソフォーム (TFF-1, 2, 3) が同定された蛋白質のファミリーである。TFF は消化管の粘膜に分泌されるが、癌における TFF-1 の発現異常は大腸、膵臓、乳房、前立腺、甲状腺、肺および卵巣でも認められている。TFF-1 の機能は多様で、細胞増殖、生存、遊走および浸潤能を促進させ、化学療法抵抗性、転移と相関し腫瘍促進機能を有すると考えられている。一方で、TFF-1 が細胞増殖を抑制し、TFF-1 欠損マウスに胃癌が発生することから、TFF-1 が腫瘍抑制機能を有する可能性も示唆されている。TFF-1 の発現と癌患者の予後との相関についても統一見解は無く、その機能は細胞種ごとに異なると理解されている。

肺癌において TFF-1 の過剰発現は報告されているが詳細は未だ不明であり、TFF-1 の正確かつ詳細な機能を明らかにすることは重要な課題となり得る。本研究では、全組織型のヒト肺癌培養細胞株を用いて、その発現プロファイル、細胞の増殖、遊走、浸潤に対する影響を cDNA、siRNA 導入を用いた発現の変化から評価することにより、TFF-1 の機能解析を行い、治療への応用を検討した。

### 2 研究方法

#### 細胞培養

12 種のヒト肺癌培養細胞株 H1650、H1975、A549、PC-3 (腺癌)、SQ5、LK2、EBC-1、LC-AI (扁平上皮癌)、H1299、Lu-99 (大細胞癌)、SBC-3、SBC-5 (小細胞癌) を使用した。

#### 発現プラスミド作成と遺伝子導入

FLAG タグを付した全長 TFF-1 遺伝子を pBApo-CMV Neo vector (pBA-neo) に挿入し、新たな発現ベクター pBA-TFF1 を作製した。SBC-5 および LC-AI 細胞に pBA-TFF1 または pBA-neo を導入し免疫ブロッティングと免疫蛍光染色により発現を評価した。以後、TFF-1 過剰発現株を TFF-1 導入株、空ベクター導入株をコントロール株、元々の細胞を親株と呼ぶ。

#### 免疫ブロッティングと免疫蛍光染色

培養細胞の蛋白質を抽出し、電気泳動後にニトロセルロース膜に転写した。抗 TFF-1 抗体、抗

FLAG 抗体を用い、NBT/BCIP で着色した。蛍光抗体染色(IF)は、抗 TFF-1 あるいは抗 FLAG 抗体を用い、DAPI で染色した。

#### 定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)

Taqman Gene Expression Cells-to CTTM Kit を使用し RNA を抽出し、TFF-1 と  $\beta$ -actin のプローブ、PCR プライマーを含む Taqman Gene Expression Master Mix、TaqMan Gene Expression Assays を用いて qRT-PCR を行った。

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

TFF-1 細胞内発現量、細胞培養液への分泌量は東京大学・消化管グループが以前に確立した ELISA の実験系を用いて定量した。

#### 細胞増殖能

親株、コントロール株、TFF-1 導入株の増殖能を血球計算板を用いて計測した。付着、浮遊細胞ともに回収し、生細胞、死細胞の両方を計測した。また、生細胞、死細胞は比色分析でも計測した。

#### 細胞死の種類の同定

caspase 3/7 (cas3/7)の活性を観察した。DAPI 染色も行い、5 視野で 500 の DAPI 陽性細胞中の cas3/7 活性陽性細胞数を計測し、その比率で検討した。

#### 発現抑制実験

TFF-1 の発現抑制による影響を観察するために TFF-1 の small interfering RNA (siRNA)と非特異的(コントロール)siRNA を導入した。TFF-1 の発現抑制は ELISA で確認した。

#### 細胞周期

各細胞の細胞周期における細胞分布をフローサイトメトリーで解析した。

#### 細胞遊走能

SBC-5, LC-AI 細胞の親株、コントロール株、TFF-1 株をコンフルエントに培養し、P200 ピペットチップで培養皿を擦過し、細胞を除去した。18 時間培養後、開始時と 18 時間後に同一部位の写真を撮影し創傷面積の開始時における面積の比を閉鎖率として計算した。.

#### 細胞浸潤能

トランスウェルアッセイを行った。ギムザ染色後にランダムに選んだ 5 視野で細胞数を計測し、マトリゲルのコート無しのフィルター上の細胞数に対するマトリゲルのコート有りのフィルター上の細胞数の比を浸潤率とした。

### **3 研究成果**

#### 内因性 TFF-1 の細胞内発現と分泌

12 種の細胞株で内因性 TFF-1 の発現を免疫ブロッティングで解析し、腺癌由来の PC-3 でのみバンドが観察された。ELISA、qRT-PCR でも腺癌細胞株でのみ TFF-1 の発現を認めた。従って、内因性 TFF-1 は腺癌のみ細胞内で発現し、細胞外に分泌されるという結果であった。

#### TFF-1 過剰発現株の樹立

内因性 TFF-1 を発現しないことが確認された SBC-5、LC-AI に pBA-TFF1 または pBA-neo を導入した。免疫ブロッティングで親株またはコントロール株に発現は認められなかったが、TFF-1 導入株で発現が認められた。ELISA での TFF-1 発現量は TFF1 導入群でのみ検出でき、コントロ

ール株では検出できなかった。従って、遺伝子の導入により TFF1-FLAG 過剰発現細胞株を樹立できたと判断した。

#### TFF-1 の過剰発現は増殖能を低下させ、細胞死を促進する

TFF-1 導入株では、親株およびコントロール株に比べ生細胞の増殖能が低下した。一方、TFF-1 株の死細胞数は親株およびコントロール株に比べ著増した。生細胞と死細胞を合計すると親株やコントロール株よりも、TFF-1 導入株の方が多かった。

#### 細胞死の種類の同定

cas3/7 活性陽性細胞の数は TFF-1 導入株で親株およびコントロール株に比べ時間経過に伴い増加した。死細胞増加の主な原因がアポトーシスであったことを示した。

#### 細胞増殖および死細胞に対する TFF-1 siRNA の効果

TFF-1 siRNA による TFF-1 の発現抑制は、TFF-1 の過剰発現によりもたらされる増殖抑制と細胞死の促進を著しく低下させたが、親株またはコントロール株において、細胞増殖のさらなる促進および細胞死の抑制は引き起こさなかった。つまり、TFF-1 の過剰発現が細胞増殖の抑制に関与しているという仮説をさらに支持するものである。

#### 細胞周期分析

TFF-1 導入株では、G1 期の細胞の割合は低下したが、S 期および G2/M 期の割合は増加した。つまり、TFF-1 導入株は細胞周期の進行がより速まったことを示している。

#### 細胞遊走能

TFF-1 導入株では、親株およびコントロール株と比較して創傷閉鎖率は低く、遊走能が低下した。TFF-1 導入株に TFF-1siRNA を導入した場合、創傷閉鎖率は親株およびコントロール株と近い値まで遊走能を回復した。これは癌細胞の遊走に対する阻害効果が主に TFF-1 の亢進によるものであることを示している。

#### 細胞浸潤能

遊走能の結果と同様に、TFF-1 の過剰発現によって浸潤能も著しく低下した。

## **4 考察**

今回の研究結果は、第一に、TFF-1 の発現は腺癌細胞株でのみ検出可能であった。TFF-1 の発現、分泌両方に関する組織型による特異性の報告は肺癌のみならず他の癌腫でもこれまでにない。TFF-1 はヒト肺癌細胞株では腺癌のみ認められたが、臨床検体において腺癌以外の組織型でも免疫染色では TFF-1 が陽性であった報告もある。仮説として TFF-1 が癌細胞の培養細胞株化、更には不死化を妨げる機能を有しており、肺腺癌はこの TFF-1 による培養細胞株の樹立阻害を回避する細胞内の machinery を有するという解釈を推定している。

第二に、TFF-1 は細胞分裂を促進したが、アポトーシスも促進し、結果として実際の細胞増殖率を低下させた。つまり、TFF-1 の過剰発現により無効な細胞周期の進行がもたらされたことを意味する。これは TFF-1 の過剰発現が細胞周期における S 期および G2/M 期の増加と、同時にアポトーシス分画の増加という新たなメカニズムである。これは、TFF-1 が細胞周期に対しても、細胞や組織や環境依存性に異なった機能をした結果であったとも解釈できる。

第三に、TFF-1 は遊走能と浸潤能を抑制する。これらの結果は TFF-1 が一部の細胞で過剰発現しているが、その過剰発現は腫瘍に対して抑制性に機能するという従来の報告と基本的には矛盾

しない。しかし、TFF-1 が肺癌における癌遺伝子または癌抑制抑制遺伝子ではないことも示唆しており、細胞内の機構によりその機能が多様に決定されるという、TFF-1 の複雑性が反映されていると考えられる。こうした矛盾する結果は、実験戦略による違いもあると考えられるが、細胞内の TFF-1 を制御する上流因子の機能によるものと推測しており、今後様々な側面から検討する必要がある。

## 5 結論

今回我々は TFF-1 は肺癌細胞において細胞増殖、遊走、浸潤を抑制することを明らかにした。肺癌細胞で TFF-1 の構成的過剰発現株を用いて解析した新規の報告であり、他分子や他の細胞内シグナル経路ともクロストークが多いこの分子は、その活性化により癌細胞の悪性形質を抑制できる可能性が示唆されたと考えている。そのため、肺癌治療の臨床現場においても抗癌剤との相乗効果をもたらす創薬のターゲットとなり得ると期待している。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、肺癌細胞株における TFF-1 (trefoil factor-1) の発現を遺伝子ならびにタンパクレベルで解析するとともに、TFF-1 発現のみられなかった非腺癌細胞株において、TFF-1 の強制発現によって起きる影響を細胞生物学的に解析した研究である。その結果、非腺癌細胞株において TFF-1 の発現により細胞増殖、遊走、浸潤が抑制されることを明らかにしている。

TFF-1 の発現とその意義については、これまで消化器癌、乳癌、肺癌、などさまざまな癌腫で報告されているが、癌腫や組織型により結果の違いがみられ、一定の見解は得られていない。本研究では、1) 肺癌のさまざまな組織型に由来する細胞株を研究対象としている、2) mRNA レベルの発現解析に加えて、ELISA による定量的なタンパクレベルでの発現解析も行っている点が、新規性として評価される。

論文審査では、中間報告の時点に比べ、より研究目的が明確になり全般的な改善がみられた点は評価されたが、以下のような問題が指摘された。1) 肺癌の組織型のなかで、なぜ TFF-1 の発現のみられる腺癌についても強制発現や発現抑制の効果を調べなかったのか、2) 研究方法についての記載の不備、3) データの表記方法についての不備、4) 考察の内容、5) 文献の記載方法の不備。

以上のようにさまざまな問題点は指摘されたが、質疑応答の中で一定の対応はみられたこと、改訂版を審査員全員で再審査し、内容の改善が確認されたことから、合格基準に達していると最終的に判断した。

## 最終試験の結果の要旨

本論文は、まず肺癌細胞株における TFF-1 (trefoil factor-1) の発現を遺伝子ならびにタンパクレベルで解析し、次いで TFF-1 発現のみられなかった非腺癌細胞株において、TFF-1 の強制発現によって起きる影響を細胞生物学的に解析した研究である。

研究手法として、免疫ブロッティング、蛍光染色、ELISA、フローサイトメーター、細胞遊走

ならびに浸潤アッセイなどを用いている。研究手法についての質疑応答において、やや不十分な返答もみられたが、後日提出された書面での回答、学位論文の改訂版では審査員がおおむね納得する内容となった。今回検討に含まれていなかった腺癌についての検討も、現在解析中とのことであり、今後の進捗によりあらたな論文として投稿したいとのことである。書面での回答、学位論文の最終版においては、審査員からの疑問に対しおおむね適切に対応されていた。

以上により、最終試験に合格とすることに、審査員全員、意見の一致をみた。