

氏 名	中 野 智 之
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 521 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 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	長期 3 次元低接着培養による高転移性の肺腺癌細胞株の作製と解析
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 西 村 智 (委 員) 教 授 坂 東 政 司 准教授 土 橋 洋

論文内容の要旨

1 研究目的

原発性肺癌の予後は一般的に不良であり、早期の肺癌であっても遠隔転移が起こることが少なくない上に、新規に診断された時点で半数以上の患者に遠隔転移を認めるため、新しい治療の開発には腫瘍転移モデルの作製が重要である。癌の転移のステップとして細胞・基質間の接着低下が重要であると考えられており、組織形態学的に遊離した浮遊集塊を形成する肺癌は、転移しやすく予後不良であることも判明している。また、肺腺癌には多様な変異がん遺伝子が確認されており、実臨床で治療の標的となっているものがある一方で、有効な治療方法が開発されていないものもある。本研究では、ドライバー変異毎に性質が異なる肺腺癌細胞株を長期間にわたり低接着培養プレート上で浮遊 3 次元培養することによりで高転移能を獲得した亜株を作製すると共に、転移の根底となるメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

2 研究方法

KRAS 遺伝子変異肺腺癌株 A549、H441 ならびに EGFR 遺伝子変異肺腺癌株 HCC4006 を長期間（3-4 か月）、親水性・非荷電性の共有結合性ハイドロゲルで表面を特殊加工した超低接着培養皿で浮遊 3 次元培養を行い、低接着状態でも増殖する亜株（以下 FL 亜株）を作製した。各々の細胞株（親株、FL 亜株）にルシフェラーゼを導入後、培養した細胞株を NOD/SCID マウスの左心室内にエコーガイド下で接種し、IVIS による腫瘍からの発光の観察と病理組織学的な評価による検討を行った。

FL 亜株の作製によって転移能が亢進した細胞株については、転移形成の分子機構を探るため、通常培養及び低接着培養での *in vitro* での細胞増殖、遊走能、浸潤能、アポトーシス活性を分析した。また、FL 亜株の特性を現わす上で根幹となる分子を同定するために、親株と FL 亜株を対照的に並べて包括的な遺伝子発現とコピー数の解析を行い、発現変動のある遺伝子あるいは増幅を示す遺伝子領域について解析を行った。

3 研究成果

長期浮遊培養により得られた FL 亜株は、浮遊培養条件下では親株に比し小型で結合の緩いスフェロイドを形成、通常の培養条件下では再接着し親株に比して紡錘形～円形への形態変化を示

した。動物モデルを用いた実験では、左心室への接種により全ての細胞株は複数臓器に転移を形成し、A549、H441 では、FL 亜株において IVIS による発光強度あるいは転移臓器数の増加が認められ、転移能が亢進したと判断したが、HCC4006 では転移能に差が認められなかった。

転移能に差が認められた KRAS 変異の 2 株 (A549、H441) において、in vitro での解析を行った。in vitro の実験では遊走能、浸潤能については親株と FL 亜株で有意差がなかったが、FL 亜株には低接着状態で亢進したアポトーシスを凌駕する程の細胞増殖能の亢進があり、p27 などの細胞周期調節因子が関与していることが示された。遺伝子発現解析の結果では、A549 及び H441 は FL 亜株において、上皮間葉転換 (EMT) 形質の誘導が示唆された。ウェスタンブロット解析、ノックダウン実験の結果から A549-FL には EMT の master regulator である ZEB1 を介して EMT が関与していることが示唆された。H441-FL おいては、ウェスタンブロット解析では EMT の関与は示せなかったが、遺伝子コピー数解析の結果、転写因子である c-Myc の増幅が増殖能と転移能に関与している可能性が考えられ、in vitro におけるノックダウン実験や薬理的阻害実験の結果によっても裏付けされた。

4 考察

A549、H441 は長期の 3 次元低接着培養によって形態学的変化を示し、低接着培養での増殖能を獲得し、通常の培養皿に移すことで速やかに接着して広がるという可塑性も有していることを示した。細胞間接着が低い状態に暴露されると低接着培養の環境に順応するようになり、in vivo での高転移能を獲得することも示した。低接着培養下において高い増殖能を示す特性は FL 亜株が間質組織液体内や血管内、リンパ管内で生存、増殖できることを示唆しており、原発巣とは異なる新しい環境で基質支持に固定することなく生存、増殖できるということは転移形成の初期の段階に好都合であるといえる。

GSEA (gene set enrichment analysis) 解析の結果から、EMT の master regulator である ZEB1 が A549-FL の高転移能に関与する可能性を考えて、ZEB1 のノックダウン実験を行うと、アポトーシスの亢進、コロニー形成の抑制、細胞増殖の抑制が見られた。EMT は、細胞遊走、細胞浸潤、転移といった癌細胞の特性、幹細胞の特性、治療抵抗性ということにも関与しており、実験結果からは、転移の促進においては ZEB1 が非常に重要な役割を担っている可能性が示された。

遺伝子コピー数解析の結果からは、H441-FL の高転移能の要因として、c-Myc の増幅が示唆された。c-Myc は腫瘍新生の一般的な特性を調節すると同時に、細胞周期活性を促進し、cdk inhibitor である p27 を抑制するが、c-Myc のノックダウンと bromodomain inhibitor である JQ1 を用いた薬理的阻害実験の結果からも H441-FL における c-Myc の関与が示唆された。c-Myc ノックダウンがアポトーシスを誘導せずに細胞増殖を抑制したのに対し、JQ1 は H441-FL に対してアポトーシスを誘導したことは、JQ1 が c-Myc 以外の標的を阻害するという報告もあり、別の機序が働いた可能性がある。p27 は c-Myc の直接的な標的であり、c-Myc-p27 パスウェイは H441-FL が低接着培養下で著明に増殖し、マウス転移モデルで高転移能を示すという機序に関与している可能性がある。過去の病理学的な研究では c-Myc の発現と組織内の浮遊細胞塊を特徴とする micropapillary adenocarcinoma との間に相関があることも報告されており、低接着状態下での細胞増殖における c-Myc の役割について、さらなる研究が望まれる。

EMT の特性である遊走能、浸潤能、アノキス耐性は、予想に反して FL 亜株と親株の間で有

意な差がなく、EMTに関連する全ての現象が必ずしも並行して起こるわけではないという報告に一致する方で、今回提唱された A549-FL における ZEB1 を介した EMT の関与や H441-FL における c-Myc 遺伝子増幅の関与は、GSEA 解析や遺伝子コピー数解析の結果を元に推測された因子の一部であり、今後は他の因子の関与も検証する必要があると考えた。また、本研究では安定的に c-Myc ノックダウンの状態にある H441-FL を作製することが困難であり、in vivo での c-Myc ノックダウンの効果についての検証には至らなかった。加えて、HCC4006 において、FL 亜株の作製によっても転移能が亢進しなかった理由について今回は十分な検証をしておらず、今後の課題である。腫瘍転移モデルを安定的に作製可能とする FL 亜株の作製は多臓器転移の制御がポイントとなる肺癌の新しい治療薬の試験の為には有用であり、FL 亜株細胞や腫瘍転移モデルの解析による転移のメカニズムの解明は新しい治療薬の開発に繋がることが期待された。

5 結論

長期 3 次元低接着培養が低接着状態での高い細胞増殖能と、動物モデルでの高い転移能を有する細胞亜株を作製するのに効果的な方法であることが示された。この方法は低下した細胞間接着によりもたらされた転移の根底にある分子メカニズムを解明する際に有用な方法である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本論文では肺がんの血行性転移という臨床的にきわめておおきな問題に対し、付着性を中心に検討を行っている。デザインも適切であり、データの質や記載事項も十分学位としての必要要素を目指している。なお、下記のような細かい修正点の修正を、委員長と申請者で行っている。本提出論文（修正点の提示リストも含む）を上記より合格と判定する。

以下に、修正点指摘の内容をあげる。下記について修正したうえで、論文として合格と判定している。

「本材料への個々の細胞の付着性、および、低付着に伴う形質変化については一部情報が不足しているのではないかと。予備検討を重ねたところ、再現性の高い浮遊培養系構築に有効であることが確認されたのであれば、そのように記載すべき。

20%以上の体重減少による実験計画変更について。検査週齢を一致させることも検討したが、実施困難であり、対照群をとり対応したことを明記してはどうか。グラフ解析で「縦縞数」を、別の科学的な数値に修正し、ピーク部分を強調してはどうか。

「再確認」といった科学的表現ではない表現は行わない。確認は論文にはならないため、どこかで新しさをだすとか、全体的に結果を含んだ表現にするとか、いいかえたほうがよい。

「理解する」という主観的表現ではなく、「示す、明らかにする、示唆する」といった客観的に。

「差を認めなかった理由についても今後検討する」のであれば、いくつか例示をすべき。また、検討による臨床的なインパクトや可能性はなにか。

最終試験の結果の要旨

最終試験では、明確な質疑応答がされており、博士としてふさわしいと考えられた。