

称号及び氏名	博士（獣医学）土屋 成一朗
学位授与の日付	平成19年3月31日
論文名	「 The role of gicerin, a cell adhesion molecule, in tumor cells(腫瘍細胞における細胞接着分子ギセリンの役割) 」
論文審査委員	主査 小川 和重 副査 小谷 猛夫 副査 岡田 利也 副査 塚本 康浩

論文要旨

緒言

腫瘍細胞の浸潤や転移には細胞間および細胞と細胞外基質間の接着が重要とされており、様々な細胞接着分子が腫瘍細胞の動態に関与していると考えられている。ギセリンは鶏の筋胃平滑筋より見出された細胞接着分子であり、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーに属する糖タンパク質である。ギセリンはギセリン同士の間種分子間結合能を有し細胞間接着を促進する。さらに、Neurite Outgrowth Factor（NOF）との異種分子間結合により細胞と基底膜等の接着にも寄与する。ギセリンには細胞質内領域の長さの異なる2種のアイソフォーム（長いものをL-ギセリン、短い方をS-ギセリン）が存在する。L-ギセリンは細胞質内領域にリン酸化部位を多く持ち、微絨毛伸展促進作用やアクチンなどの細胞骨格との関連性も報告されている。一方で、S-ギセリンと比べ細胞接着活性が弱いことも判明している。

ギセリンは発生時に発現し神経突起伸展や細胞移動さらには上皮形成を促進するが、腫瘍細胞やその転移巣においても過剰発現することが判明している。興味あることに、腫瘍の自然発症例の殆どがL-ギセリンのみを発現しており、細胞質内領域が腫瘍細胞の動態に関与することが予想されている。本研究では、癌研究に重点をおき、腫瘍細胞の浸潤や転移におけるギセリンの役割解明を試みた。さらに、腫瘍細胞におけるギセリンの発現調節を検討した。

第1章：腫瘍細胞の浸潤・転移におけるギセリンの役割

鶏マレック病性リンパ腫におけるギセリンの発現意義を検討した。この腫瘍は食鳥処理場において入手が容易であり、さらに株化細胞株も樹立されているため自然発症例および *in vitro* でのギセリンの役割を検討するための優れた実験モデルと考えた。

自然発症例を用いてギセリンの発現を検討したところ、強陽性である症例が認められた。さらに陽性症例では L-ギセリンのみを発現することが判明した。そこで、可移植性細胞株を用いることにより腫瘍進行におけるギセリンの役割を検討した。内因性ギセリン陰性である MDCC-MSB1 細胞に L-ギセリン遺伝子をリポフェクション法により導入し、L-ギセリン強発現細胞株を樹立することに成功した。通常培養下における細胞の倍加時間を検討した結果、L-ギセリンの発現による MDCC-MSB1 細胞の増殖能の変化は認められなかった。浮遊培養後、顕微鏡下で細胞の自己凝集塊数を計測したところ、ギセリン発現細胞では細胞凝集能が有意に促進されていた。次に、ギセリンおよび NOF 蛋白をそれぞれコートしたトランスウェルフィルター上で細胞を培養し、下部チャンバーに移動してきた細胞数を計測したところ、両蛋白ともにギセリン発現細胞の移動能が促進していることが判明した。また、この移動能は抗ギセリン抗体の添加により阻害されることも示された。

次に、鶏体内での L-ギセリン発現 MDCC-MSB1 細胞の動態解析を試みた。同数のギセリン発現細胞と親株を鶏雛（7日齢）の翼下静脈内に接種し、5日後の肺、腎臓、肝臓での転移巣を病理組織学的に観察した。単位面積当たりの転移巣数を計測したところ、すべての臓器においてギセリン発現細胞の方が転移能が高いことが見出された。

以上の結果より、L-ギセリンの発現により腫瘍細胞の浸潤性・転移性が促進することが判明した。特に、血管内皮はギセリンと NOF を恒常的に発現しているため、ギセリンの同種分子間結合および異種分子間結合が腫瘍細胞と血管の接着さらに血管壁・血管外への浸潤を促進するものと考えられた。

第2章 腫瘍細胞の浸潤・転移におけるギセリンの細胞内領域の関与

腫瘍細胞の動態におけるギセリンの細胞質内領域の関与を検討するため、マウス線維芽細胞株 L-929 細胞を用いた。この細胞株はカドヘリンや Ig スーパーファミリーを含む殆どの細胞接着分子が陰性であるため、遺伝子導入による接着分子の機能解明のための優れたモデル細胞とされている。

まず、L-929 細胞への遺伝子導入により L-および S-ギセリン発現細胞株を樹立した。親株および両ギセリン発現細胞株それぞれ同数をヌードマウスに皮下移植し、増殖性や浸潤性さらに他臓器への転移性を検討した。皮下移植3週目の腫瘍体積を計測したところ、L-および S-ギセリン細胞ともに親株と比べ大きな腫瘍塊を形成することが判明した。病理組織学的には、親株による皮下腫瘍では周囲組織への浸潤性は認められなかった。一方、両ギセリン細胞は真皮および骨格筋への浸潤が促進されていた。親株と S-ギセリン細胞株の皮下移植では他臓器への転移がみられなかったが、興味あることに、L-ギセリン細胞株を

移植されたマウス全個体の肺において多数の転移巣が認められ、肺動脈に栓塞した細胞が肺組織に浸潤増殖していた。

次に、静脈内接種を行い肺の血管への親和性を検討した。尾静脈接種後7日後の肺組織標本では、親株とS-ギセリン細胞株において比較的小さな肺動脈のみの栓塞像が見出されたが、浸潤性は見られなかった。しかし、L-ギセリン細胞株は大きな血管内にも接着しており血管壁への浸潤も顕著であることが判明した。

次に発育鶏胚の漿尿膜・外胚葉上皮に上記細胞を移植した。10日後の病理組織学的検索により、親株移植では漿尿膜組織に病変は認められなかったが、両ギセリン発現細胞は結合組織内で増殖していることが判明した。さらに、漿尿膜から鶏胚臓器への転移を検証するためマウスのmicroglobinのプライマーによるpolymerase chain reaction (PCR)を行ったところ、L-ギセリン細胞を移植した鶏胚の肺にのみマウスのmicroglobin遺伝子が検出された。つまり、L-ギセリン細胞のみが漿尿膜から肺転移をしたことが証明された。

以上の結果より、ギセリンの細胞内領域が腫瘍細胞の転移に関与することが示唆された。肺の血管内皮細胞の表面にはギセリンが恒常的に発現しており血行性に流れてきたL-ギセリン発現細胞との接着やその後の血管外浸潤が微絨毛進展促進や細胞内蛋白質相互作用により促進された可能性が考えられた。

第3章 外的因子によるギセリンの発現調節

ギセリンは発生時に発現し、成熟組織では殆ど消失するが、腫瘍細胞では再発現する。つまり、ギセリンの発現調節機構を解明することは腫瘍細胞の動態を理解する上で重要と考えられる。本研究ではマウス肝癌 hepa1-6 細胞を用いて、外的因子が腫瘍細胞でのギセリン発現に与える影響を検討した。このマウス hepa1-6 細胞は肝細胞の増殖に対する様々な外的液性因子の影響を検討する *in vitro* モデルとして汎用されている。さらに、内因性ギセリンを僅かに発現しているため、発現変化に関する実験系を組みやすいという利点があった。

牛胎子血清 (FBS) 添加および無添加条件による hepa1-6 細胞でのギセリンmRNA の発現を RT-PCR で検討した結果、培養液への FBS 添加によりギセリンの発現が増強することが判明した。このことより、ギセリンの発現が外的因子により調節されることが示唆された。次に、肝細胞に反応性を示すことが知られている transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、hepatocyte growth factor (HGF)、interleukin (IL)-6 および tumor necrosis factor- α (TNF- α) をそれぞれ無血清培地に添加したところ、TGF- β 1 および TNF- α 刺激により hepa1-6 細胞でのギセリンmRNA の増加が認められた。TGF- β 1 の濃度を変化させたところ、濃度依存的にギセリンmRNA 発現が増加した。一方、IL-6 と HGF の刺激には反応を示さなかった。

次に、ギセリン遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを hepa1-6 細胞に導入し、デュアルルシフェラーゼ法により TGF- β 1 刺激の影響を検討

した。その結果、TGF- β 1 添加によりルシフェラーゼの発現量の増加が認められた。このことから、TGF- β 1 刺激は最終的にギセリン遺伝子のプロモーター領域に作用し転写活性を促進することが示唆された。

次に、動物体内におけるギセリン発現とTGF- β 1 の関連性を検討することを試みた。腫瘍組織内でのTGF- β 1 の発現に関する報告はあるが、再現性のある腫瘍病変モデルは開発されていない。そこで、TGF- β 1 の発現モデルとしても汎用されている四塩化炭素 (CCl₄) 誘発肝炎モデルを用いた。マウスにCCl₄を 1 回経口投与した後、経時的 (1~5 日) に肝臓を採取し、ギセリンとTGF- β 1 のmRNA発現を定量的リアルタイムRT-PCR法により検討した。その結果、投与後 3 日目 (組織再生の活発なステージ) にギセリン、TGF- β 1 ともにその発現増加のピークが認められた。次に、初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 肝細胞再生モデルを用い、TGF- β 1 刺激が肝細胞のギセリンmRNA発現に与える影響を検討した。その結果、無血清培地ではギセリンmRNA発現は低いレベルに維持されていたが、TGF- β 1 刺激により著しく増加 (添加後 32 時間目以降) することが判明した。これらのことより、TGF- β 1 の発現が肝細胞のギセリン発現を増強させ、肝組織の再構築に関与することが予想された。

総括

- 1) ギセリンの細胞接着能は腫瘍細胞の細胞間接着や運動性を活性化し、組織浸潤や血行性転移を促進する。
- 2) ギセリンの細胞内領域が腫瘍細胞の転移性に関与する。
- 3) 腫瘍組織や再生組織におけるギセリンの発現や転写活性は外的因子 (本研究では TGF- β 1) により調節される。

審査結果の要旨

細胞接着分子は細胞-細胞間と細胞-細胞外基質間の接着を介在する分子で、細胞は多様な細胞接着分子を介して接着する。腫瘍において、細胞接着分子は浸潤や転移など腫瘍細胞の挙動を左右する分子の 1 つと見なされているため、腫瘍細胞における細胞接着分子の発現と働きは重要な研究テーマになっている。ギセリンは鶏の平滑筋より発見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で、細胞質内領域の長さが異なる 2 種類のアイソフォーム、長い L-ギセリンと短い S-ギセリンが認められる。ギセリンは、ギセリン同士の結合による細胞-細胞間接着と Neurite outgrowth factor (鶏に発現するラミニンの一種 ; NOF) との結合による細胞-細胞外基質間の接着を介在する。ギセリンは発生時に強く発現するが、血管内皮には成体でも恒常的な発現が認められる。腫瘍やその転移巣において過剰発現することも報告されているが、ギセリンが腫瘍細胞の浸潤と転移に及ぼす影響を詳細に調べた報告は少ない。本研究では、アイソフォームの違いに焦点を当て

腫瘍細胞に発現するギセリンの役割を転移と浸潤の観点から調べ、また、腫瘍細胞におけるギセリンの発現調節機構を検討して、以下の成果を得た。

第1章では、腫瘍の浸潤と転移に及ぼすギセリンの影響について鶏マレック病性リンパ腫を対象に検討した。自然発症例でギセリン発現を調べた結果、陽性症例はすべて L-ギセリンのみを発現していることが明らかにされた。そこで、内因性ギセリン陰性の可移植性鶏マレック病性リンパ腫細胞株 MDCC-MSB1 を材料に、親株と細胞倍加時間が変わらない L-ギセリン遺伝子導入細胞を作製し腫瘍進行に及ぼすギセリンの影響を調べた。In vitro では、遺伝子導入株は親株と比べ、①細胞自己凝集能とギセリンおよび NOF 塗布基質上の細胞移動能が有意に促進し、これらは抗ギセリン抗体の添加により阻害されたことから、L-ギセリンは MDCC-MSB1 の接着・運動性状を変化させることが明らかにされた。鶏雛（7日齢）の翼下静脈内に遺伝子導入株と親株を接種し、5日後の肺、腎臓、肝臓を病理組織学的に観察し単位面積当たりの腫瘍巣数を計測・比較した結果、②すべての臓器において L-ギセリン発現細胞の方が腫瘍巣の数が有意に多く、マレック病性リンパ腫では L-ギセリンが発現すると転移能が亢進する可能性の高いことが示唆された。

第2章では、腫瘍細胞の浸潤・転移に及ぼす L-と S-ギセリンの影響について、L-929（カドヘリン類や免疫グロブリンスーパーファミリーなどの細胞接着分子を発現しないマウス線維芽細胞株）を材料に比較・検討した。L-と S-ギセリン遺伝子導入株（L-LG ; L-SG）を作製し、ヌードマウスに皮下移植して3週後に増殖、浸潤、転移性状を検討した。その結果、L-LG、L-SG ともに①腫瘍体積が有意に増大し、②親株接種群では認められない周囲組織への浸潤が認められ、③L-LG では肺への転移巣が確認された。発育鶏胚の漿尿膜・外胚葉上皮に移植して10日後に同様の性状を調べた結果、親株で認められない漿尿膜内増殖が L-LG、L-SG ともに認められ、L-LG は鶏胚の肺に転移していた。以上の結果から、L-ギセリンは、腫瘍細胞の転移を促進する細胞内領域を持っていることが示唆された。

第3章では外的因子によるギセリンの発現調節を検討した。内因性にギセリンを発現しているマウス肝癌hepa1-6細胞を材料に、肝細胞増殖制御因子の添加がギセリンmRNA発現に及ぼす影響をRT-PCR法で検討した結果、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) により発現上昇が認められた。ギセリン遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだプラスミドを導入したhepa1-6細胞を材料にルシフェラーゼアッセイを行いTGF- β 1によるギセリン遺伝子転写亢進を確認した。加えて、CCl₄を1回経口投与して作製した肝再生モデルマウスを材料に、ギセリンとTGF- β 1のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法により検討し、TGF- β 1とギセリン発現動態の相同性を明らかにした。以上の結果により、ギセリン発現はTGF- β 1により制御されていることが示唆された。

本研究で、(1)鶏マレック病性リンパ腫の自然発症例でギセリン陽性症例はすべて L-ギセリンのみを発現していること、(2)S-、L-ギセリンともに腫瘍細胞の接着・運動性状を変化させ、組織浸潤を促進させること、(3)S-ギセリンには無い L-ギセリン固有の細胞内領域が腫瘍細胞の転移に深く関与すること、(4)ギセリン発現は TGF- β 1 により調節されることが

明らかになった。これらの成果は、腫瘍の浸潤・転移機構解明の一助となるもので、医学・獣医学の発展に貢献すると判断される。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。