

## 論文内容の要旨

### 論文題目

ヒト顆粒膜細胞腫悪性化機構に関与する遺伝子群の同定

今井美沙

### はじめに

卵巣癌は婦人科系癌の中で致死率が最も高いことが報告されている。卵巣は様々な細胞で構成されることから、多様な腫瘍が発生することが知られている。卵巣腫瘍は、表層上皮性・間質性腫瘍、胚細胞性腫瘍、性索・間質性腫瘍とその他の四種類に分類される。また、悪性度を指標として、良性腫瘍、悪性腫瘍および境界悪性腫瘍に分類され、組織学的にも最も変化に富んだ腫瘍のグループである。

顆粒膜細胞腫は、境界悪性腫瘍に分類され、エストロゲン産生細胞である原始卵胞の上皮細胞(顆粒膜細胞)に由来する。卵巣癌と診断される全症例に占める顆粒膜細胞腫の割合は 1~2%と少ないものの、20 年後の生存率は極めて低い。また、初期の発症から再発・転移に数十年を要することや悪性度の低い病巣の方が再発・転移しやすいことなどから、顆粒膜細胞腫の悪性化は特殊な分子機構を介するものと推測される。顆粒膜細胞腫の好発年齢が更年期であることや発症のリスクが不妊治療により上昇する可能性も報告されていることから、性ホルモンの関与が示唆されているが、未だ決定的な証拠は得られていない。また、顆粒膜細胞腫特異的な腫瘍マーカーは明らかになっておらず、早期診断法および効果的治療法が得られるには至っていない。

そこで、本研究では、顆粒膜細胞腫の悪性化機構解明を目標として、顆粒膜細胞腫細胞株 KGN 細胞を用い、詳細な細胞特性解析を行うとともに、正常顆粒膜細胞との比較による差別的トランスクリプトーム解析を行い、顆粒細胞腫悪性化に関わる遺伝子群の同定を試みた。

## KGN 細胞の特性

KGN 細胞は、癌細胞の特性を示すのみならず、アロマトラーゼ活性、ホルモン受容体の発現やプロゲステロン産生など、顆粒膜細胞の性質も保持していることがすでに報告されている。加えて、予備実験の結果から、継代を重ねるにしたがって増殖速度を著しく増していくことが明らかとなってきた。そこで、この結果を検証するため、異なる継代数の KGN 細胞を用いて、細胞増殖能の測定を行ったところ、継代数を重ねた細胞(継代数 47 以上)は継代数の少ない細胞(継代数 10 以下)の約2倍の速度で増殖していることが示された。次に、異なる継代数の KGN 細胞の浸潤能を明らかにするため、細胞浸潤アッセイを行ったところ、継代数を重ねた細胞は継代数の少ない細胞の約2倍の浸潤能を示し、増殖能と同様に浸潤能も顕著に上昇することが明らかになった。また、マイトマイシン C 処理により増殖能を抑制した KGN 細胞を用いた場合でも同様の結果が得られたことから、増殖能とは無関係に浸潤能を高めていると考えられる。以上の結果から、KGN 細胞は継代により癌の特性を高めていることが明らかとなった。

次に、継代数を重ねた KGN 細胞と継代数の少ない細胞の性質の変化を分子レベルで証明するため、それぞれの細胞における癌悪性化マーカーの発現解析を行った。その結果、顆粒膜細胞腫の腫瘍マーカーの一つである p53 は、継代数の増加とともに顕著に発現亢進していることが明らかとなり、同様に、他の細胞腫の悪性化マーカーとして知られる OPN や Bag1 などの発現も継代とともに増加していることを確認した。一方、悪性化マーカーの一つであり、アポトーシス促進分子として知られる Bax の発現は顕著に減少していることが明らかとなった。これらの結果は、いずれも細胞の継代を進めるにしたがって KGN 細胞の性質が変化していることを示す重要な証拠であると考えられる。

さらに、KGN 細胞の特性変化の原因として、FSH、LH、hCG などのホルモンや脂質、酸化ストレスが考えられることから、培養系にそれぞれのホルモンや脂質、過酸化水素を添加して KGN 細胞の増殖能や浸潤能に及ぼす影響を検討したが、特に、KGN 細胞の特性変化は認められなかった。また、ステロイド産生細胞である KGN 細胞は血清中の脂質を取り込んで細胞を活性化させていると考えられることから、リポタンパク質などを除去した血清を用いて細胞培養を試みたが、同様に変化は認められなかった。したがって、KGN 細胞の体外培養系における増殖能や浸潤能の変化については、ホルモンやストレスとの関連は否定的であると考えられるが、*in vivo* の状況とは異なることから、これらの分子が *in vivo* では重要な関連因子である可能性も否定できない。

次に、*in vivo* における KGN 細胞の特性を明らかにするため、継代数の異なる KGN 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、1 週間おきに3ヶ月間観察を行った。継代数の相違に関わらず、移植後 1 週間目までは皮下において注入した細胞塊が観察されたものの、2 週間目以降皮下における KGN 細胞の増殖は目視で確認することができなかった。しかしながら、3ヶ月後、継代数を重ねた KGN 細胞を移植した皮下において細胞が増殖していることが確認され、腹腔内を観察したところ、

細胞の継代数に関わらず腸で結節が確認された。腸に新生した結節数は継代を重ねた細胞を用いた方が少ない細胞を用いた場合よりも顕著に多いことから、体外培養系における KGN 細胞の特性および進行、転移速度の遅い顆粒膜細胞腫の特性を in vivo においても再現していると考えられる。

以上の結果から、KGN 細胞が in vitro のみならず in vivo における顆粒膜細胞腫悪性化のモデル細胞として非常に有用であることが示された。また、皮下から腹腔内に転移する細胞株は現在までほとんど報告されておらず、顆粒膜細胞腫のみならず広く癌浸潤、転移機構を解明する上でも非常に有用な細胞株である可能性が示唆された。

### 顆粒膜細胞腫特異的遺伝子の同定

顆粒膜細胞腫悪性化の分子制御機構には、顆粒膜細胞腫自身によって作られるエストロゲンの作用や抗アポトーシス機構の活性化などが関わっているという報告があるが、未だに証明には至っていない。また、マウス顆粒膜細胞腫モデルでは、Wnt/ $\beta$ -catenin のシグナル伝達機構が関わっている可能性について報告されているものの、ヒト顆粒膜細胞腫でこれを支持する結果は得られていない。現在まで、顆粒膜細胞腫の悪性化を司る分子機構はほとんど明らかになっておらず、将来的に検査法や治療法を改善する上で情報の蓄積が必須である。そこで、顆粒膜細胞腫悪性化に関わる遺伝子群の同定を目的として、KGN 細胞および正常顆粒膜細胞との比較による差異的トランスクリプトーム解析を行った。

データ解析の結果、顆粒膜細胞腫悪性化の原因遺伝子として報告されている Wnt/ $\beta$ -catenin などの発現は、予想に反して比較的变化に乏しいことが明らかとなった。また、ステロイド合成に関与する分子群の発現は全体的に減少傾向にあり、KGN 細胞ではステロイド合成が不活発になっていることが示唆された。その他、アポトーシスやストレスに関与する遺伝子群の発現は抑制傾向が認められ、細胞の生存性が高まっていることが推測された。一方、正常顆粒膜細胞とは異なり顆粒膜細胞腫は増殖能を示すことから予想されるように、増殖に関連する遺伝子群は大きく変化していることが明らかとなった。さらに、細胞外マトリックスを含む細胞接着を制御する遺伝子群の発現も大きく変化していることが明らかとなり、顆粒膜細胞腫の悪性化とともに接着機構が変化している可能性が示唆された。KGN 細胞は高い浸潤能を示すにもかかわらず、予想に反して浸潤能と関わる遺伝子群の変化は小さいことが明らかとなったが、細胞外マトリックスの切断に直接的に関わる MMP2 の発現は強く亢進しており(72 倍)、KGN 細胞の浸潤能を調節しているものと考えられる。

以上の結果をもとに、正常細胞には発現が認められず KGN 細胞で強く発現が認められる 30 遺伝子に着目して、継代数の異なる KGN 細胞で発現亢進する遺伝子群の選別を行い、顆粒膜細胞腫悪性化に関与する遺伝子群の同定を試みた。これらの遺伝子のうち、9 遺伝子(STC2、

GPRC5B、LOXL1、LOXL2、BMP1、CREB3L1、FAM38B、COL1A1、NRXN3)は継代数の増加とともに KGN 細胞でさらに発現量が増加することが明らかとなり、顆粒膜細胞腫の悪性化と関連する候補遺伝子群であると考えられる。これらの遺伝子群に関して既に報告されている知見から、顆粒膜細胞腫悪性化分子機構にはコラーゲンのリモデリングが関与すると予想される。一方、現在まで機能解析が進められていない遺伝子も含まれており、顆粒膜細胞腫特異的な悪性化機構との関連が注目される。これまで、これらの 9 遺伝子が顆粒膜細胞腫悪性化機構と関連するという報告は見られず、新たな分子マーカーとしても利用価値が高いものと考えられる。

## 結論

本研究では、顆粒膜細胞腫悪性化機構の解明に向けて、非常に有用な KGN 細胞の特性解析を進めてきた。体外培養系において細胞継代を進めるにしたいが、KGN 細胞は増殖能、接着能および浸潤能を高め、マウス実験系では皮下におけるゆっくりとした増殖と腸管への転移性を示すことが明らかとなった。また、KGN 細胞と正常顆粒膜細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果から、細胞外マトリックス(コラーゲン)のリモデリングが悪性化と関わる可能性が示唆され、いくつかの候補遺伝子を選別することに成功した。本研究により得られた新たな知見は、顆粒膜細胞腫の悪性化機構の解明、検査法および治療法の開発の基礎となるものと考えられる。