

論文の内容の要旨

論文題目 癌の浸潤・転移における TGF- β ファミリーシグナルの解析

指導教員 宮園浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 勝野 蓉子

Transforming growth factor (TGF)- β や Bone morphogenetic protein (BMP)を含む TGF- β ファミリーのサイトカインは、癌の進行において複雑な役割を持つ。TGF- β は、多くの上皮細胞の増殖を抑制し、癌の初期においては癌抑制因子として機能する一方で、癌の進行期には、癌の周囲の間質に対して血管新生、細胞外マトリックス産生、免疫抑制などの作用を持つと同時に、癌細胞の運動や浸潤を誘導し、癌の転移を促進する。

BMP シグナルと癌との関係についてはこれまでにいくつか報告がある。胃癌、卵巣癌、前立腺癌、乳癌などいくつかの癌細胞においては BMP が発現していることが報告されている。一方、最近の研究で、BMP は大腸癌、メラノーマ、前立腺癌など多くの癌において癌細胞の運動能、浸潤能を亢進させることが報告されている。また、BMP シグナル経路のシグナルコンポーネントの発現量と乳癌の悪性度が正に相関することが報告されており、BMP が癌の転移に促進的に働く可能性が示唆されるが、BMP の癌転移における役割についてはよくわかっていない。

癌の転移は、癌細胞の局所での浸潤、血管内への侵入、血中での生存、遠隔臓器での血管外遊出、その臓器での生着と増殖といった多段階のステップによりなりたっている。循

環中の腫瘍細胞のうちの多くが遠隔の臓器で生着、増殖することができず、腫瘍を構成する細胞のうちごく一部の細胞のみが転移を形成することができると考えられている。癌細胞の多様性を説明するモデルとして、癌幹細胞モデルが近年注目されている。このモデルは、癌を構成する多種類の細胞のうち癌幹細胞とよばれる一部の細胞のみが腫瘍を形成し、維持する能力を持ち、この癌幹細胞が正常幹細胞と同様に自己複製能と分化能を有し、多様な子孫癌細胞を生み出し階層構造をつくるという仮説である。癌転移の多段階ステップを考えると、癌幹細胞は、癌の転移においても重要な役割を果たすと考えられる。転移を形成することができる細胞はごく一部の細胞であり、癌幹細胞のみが原発臓器を離れ、血行性やリンパ行性に他臓器へ到達したときに転移巣の源となることができると考えられる。TGF- β ファミリーシグナルは、幹細胞の増殖や分化を制御することが知られている。正常幹細胞と似た性質を持つ癌幹細胞の制御においても TGF- β や BMP が重要な役割を持つことがいくつかの癌で報告されているが、癌幹細胞の維持における TGF- β ファミリーシグナルの役割はまだ解析がなされていない部分が多い。

本研究では、種々の癌における TGF- β ファミリーシグナルの役割を明らかにすることを目的とし、乳癌の骨転移における BMP シグナルの役割と、スキルス胃癌幹細胞の維持における TGF- β シグナルの役割について、解析を行った。

1) 乳癌の骨転移における BMP シグナルの役割

TGF- β シグナルは乳癌の進行において重要であり、乳癌の骨転移を促進することがわかっている。BMP は、骨基質に多く含まれるが、乳癌の骨転移における役割はわかっていない。まず、乳癌細胞において BMP/Smad 経路が活性化されているかを調べるため、骨転移した乳癌症例の原発腫瘍、骨転移およびリンパ節転移の組織を用いた免疫染色を行った。乳癌の原発腫瘍組織、骨転移組織およびリンパ節転移組織において、腫瘍細胞で核にリン酸化 Smad2 とリン酸化 Smad1/5/8 の染色が見られ、乳癌細胞において TGF- β 、BMP シグナルが活性化されていることが示された。骨転移組織において特に強いリン酸化 Smad2 およびリン酸化 Smad1/5/8 の染色が見られ、骨転移した乳癌細胞が骨基質に存在する TGF- β お

よび BMP による刺激を受けている可能性が示唆された。

骨転移の進行における BMP の役割を明らかにするため、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 から得られた高い骨転移能を持つクローンである MDA-231-D 細胞を用いて実験を行った。この細胞のヌードマウス左心室への移植による実験転移モデルの骨転移組織においても癌細胞で Smad2 と Smad1/5/8 がリン酸化されていることを免疫染色と Western blot により確認した。この転移モデルにおいて、*in vivo imaging* を用いて、骨転移巣における TGF- β あるいは BMP 依存的な転写活性と腫瘍の増殖を同一個体で経時的に可視化する系を確立した。この *in vivo imaging* の系を用いることで、骨転移した乳癌細胞で TGF- β あるいは BMP に誘導される Smad 依存的転写が活性化されていることを明らかにした。

癌細胞の運動と浸潤は骨転移の進行において重要な役割を持つ。乳癌細胞の運動能と浸潤能に対する TGF- β と BMP の効果を wound-closure assay と invasion assay により検討した結果、TGF- β 同様、BMP は *in vitro* で MDA-231-D 細胞の運動能と浸潤能を亢進させた。

次に、TGF- β 、BMP シグナルを抑制することの骨転移に対する効果を検討するため、TGF- β あるいは BMP のレセプターのドミナントネガティブ変異体を MDA-231-D 細胞に発現させた。ドミナントネガティブレセプターにより TGF- β と BMP のシグナルを阻害することにより、MDA-231-D 細胞の *in vitro* での浸潤能が抑制された。さらに、マウスへの移植モデルにおいて、ドミナントネガティブレセプターを発現させて TGF- β あるいは BMP のシグナルを阻害した細胞では、骨転移が抑制され、移植マウスの生存時間が延長した。

以上の結果から、TGF- β 同様、BMP も乳癌の骨転移を促進し、TGF- β または BMP のシグナルを阻害することで骨転移を抑制できることが示唆された。最近、BMP シグナルを抑制する新規の低分子化合物も報告されており、BMP シグナルは乳癌の骨転移治療における新たな分子標的の候補として重要であると考えられる。

2) スキルス胃癌幹細胞の維持における TGF- β シグナルの役割

細胞内のアルデヒドを分解する酵素の 1 つである Aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 は、造血系幹細胞や神経幹細胞を濃縮できるマーカーとして報告されている。また、近年、種々

の癌において ALDH1 は癌幹細胞のマーカーであるという報告がされている。ALDH1 は、様々な組織由来の正常細胞と癌細胞において共通の幹細胞マーカーとして使うことができる可能性があることが示唆されている。そこで、まず、ALDH1 がスキルス胃癌幹細胞のマーカーの候補となり得るかを検討するため、スキルス胃癌の進行と ALDH1 の発現との関係を調べた。Borrmann IV 型胃癌と診断された症例の腫瘍から得られた一連の細胞株を用いて ALDH1 発現を比較した。ALDH1 は、この患者の原発腫瘍から得られた細胞を同所移植したマウスの転移組織から得られた細胞株である OCUM-2MD3 細胞と OCUM-2MLN 細胞において高い発現が見られた。

ALDH1+スキルス胃癌細胞が、癌幹細胞様の性質を持つか明らかにするため、OCUM-2MLN 細胞から Aldefluor assay と FACS を用いて ALDH1-細胞と ALDH1+細胞を単離し、*in vitro* での増殖と colony formation を比較した。ALDH1+細胞は、ALDH1-細胞に比較して *in vitro* での増殖が速く、寒天中でのコロニー形成能が高かった。さらに、ALDH1+細胞が腫瘍を形成する能力を持つか調べるため、単離した ALDH1-細胞と ALDH1+細胞をヌードマウスの皮下に移植した。ALDH1+細胞は、ALDH1-細胞に比較して、高い腫瘍形成能を示した。ALDH1+細胞によって形成された腫瘍は、ソートする前の細胞と同様に ALDH1-、ALDH1+の両方の細胞を含んでおり、ALDH1+細胞が自己複製能を有することが示唆された。

癌幹細胞は、癌の周囲の微小環境に含まれる増殖因子やサイトカインによって制御を受けていると考えられる。スキルス胃癌の癌細胞と間質には TGF- β が発現していることがわかっているので、ALDH1+スキルス胃癌細胞に対する TGF- β の作用を検討した。TGF- β は、スキルス胃癌細胞株において、ALDH1 の mRNA とタンパクの発現を減少させ、ALDH1+細胞の割合を減少させた。

以上の結果から、ALDH1 がスキルス胃癌の進行に重要な役割を持つこと、ALDH1+スキルス胃癌細胞が、高い増殖能と腫瘍形成能、自己複製能という癌幹細胞の性質を有すること、TGF- β がスキルス胃癌幹細胞の数を減少させることが示唆された。TGF- β は、スキルス胃癌幹細胞の数を減少させることで腫瘍形成能の抑制に働く可能性が示唆された。本研究

で示された、TGF- β がスキルス胃癌の癌幹細胞を制御するという結果は、スキルス胃癌の新たな治療法の開発にもつながる重要な発見であると考えられる。