

論文内容の要旨

肺癌細胞株における TGF- $\beta$ による  
上皮間葉転換の炎症性サイトカインによる増強効果

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 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

河田美貴子

癌の悪性化の過程において癌細胞がどのように浸潤・転移する能力を獲得していくか解明していくことが有効な治療法の開発のために非常に重要である。上皮細胞が浸潤・転移をする過程において、上皮細胞が間葉系細胞へと分化するプロセスである上皮間葉転換（Epithelial-mesenchymal transition: EMT）の役割が注目されている。この EMT を誘導する主たるサイトカインとして transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )が知られており、種々の細胞株、とくに肺癌においては肺

腺癌細胞株 A549 を用いて、その機序について解析が進められてきた。その結果 TGF- $\beta$  による EMT における Snail 転写因子の重要性や、Thyroid transcription factor-1 (TTF-1)による EMT の拮抗作用など多くの制御因子の関与が明らかとなっている。一方マクロファージは癌細胞に直接働きかけて、その増殖を亢進するのみならず、癌細胞の EMT を誘導することが、マクロファージ様細胞株 RAW 264.7 細胞を用いた肝癌細胞株での検討などによって示されている。

こうした背景を踏まえて、本研究においては、(1) TGF- $\beta$  による肺癌細胞 A549 の EMT の誘導にマクロファージ様 RAW 264.7 細胞が果たす役割を検討し、(2) RAW 264.7 細胞から分泌される EMT を誘導する炎症性サイトカインを同定した上で、(3) 同定されたサイトカインと TGF- $\beta$  の協調作用を説明する分子機構の解明を試み、(4) この協調作用が他種の肺癌細胞 Lc2/ad において見出されるか検討した。これらの知見を得ることにより、癌組織微小環境を形成する因子の一つであるマクロファージが肺癌細胞の悪性化において果たす役割を *in vitro* レベルで明らかにすることを目的とした。

まず A549 細胞と RAW 264.7 細胞の共培養による検討を行った。A549 細胞は TGF- $\beta$  単独の刺激で、上皮細胞の形態からやや紡錘状の形態に変化し RAW 264.7 細胞存在下に促進された。RT-PCR による EMT に伴う遺伝子の発現の変化の検討では、TGF- $\beta$  刺激による EMT に伴う Fibronectin や N-cadherin の発現上昇傾向が、RAW 264.7 細胞との共培養により促進された。一方 E-cadherin の発現減少は TGF- $\beta$  のみで強く誘導され、RAW 264.7 細胞の共培養による促進は認められなかった。次に共培養による観察が RAW 264.7 細胞からの分泌因子によるものか

検討するために RAW 264.7 細胞の培養上清を調製して TGF- $\beta$ による A549 細胞の EMT への影響を検討した。その結果、TGF- $\beta$  による A549 細胞の形態変化は RAW 264.7 細胞の培養上清の添加によって促進され、これは LPS 添加による活性化により有意に増強された。RT-PCR による検討でも、培養上清による Fibronectin と N-cadherin の TGF- $\beta$  との協調的な発現誘導が観察された。E-cadherin の発現減少に対しては共培養と同様に培養上清による増強効果は明らかではなかった。こうした遺伝子発現変化は、蛋白レベルでも同様の傾向であった。以上のことから、RAW 264.7 細胞由来の液性因子により、TGF- $\beta$  による A549 細胞の EMT における形態変化と、間葉系マーカーの発現が促進されることが示唆された。

マクロファージ細胞から分泌されるサイトカインの代表的なものとして TNF- $\alpha$  が知られているが、RAW 264.7 細胞から TNF- $\alpha$  が産生されており、その分泌量が LPS の用量依存的に有意に増加することを明らかにした。続いて TGF- $\beta$  誘導性の EMT における TNF- $\alpha$  の作用に注目して解析を進めた。A549 細胞に TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の単独刺激あるいはその共刺激を行ったところ、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  それぞれ単独投与によって形態変化が認められ、それは両者の併用によって促進した。EMT 関連遺伝子の発現の変化についても、間葉系マーカーである N-cadherin、Fibronectin の TGF- $\beta$  による発現上昇は、TNF- $\alpha$  を加えることにより亢進した。これらの結果は、mRNA およびタンパクレベルで証明できた。

EMT に伴い癌細胞は細胞外プロテアーゼの分泌を促進して ECM のリモデリングを行い、さらに自身の運動能も亢進する。この過程は癌細胞の浸潤、転移

にとって重要であるとされている。そこで MMP-9 や MMP-2 の発現に関して、TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  の作用について検討を行ったところ、TGF- $\beta$  により発現が上昇し、それは TNF- $\alpha$  の共刺激によりさらに促進された。一方、TGF- $\beta$  や TNF- $\alpha$  は MMP-13 の発現を変動させなかった。細胞運動能への TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  の作用についての検討では、TGF- $\beta$  単独刺激と比較して TNF- $\alpha$  の共刺激により運動能の亢進が認められた。

続いて A549 細胞の TGF- $\beta$  による EMT に対する TNF- $\alpha$  の増強作用について、そのメカニズムの解析を試みた。既報で示されていた TNF- $\alpha$  による A549 細胞における TGF- $\beta$  受容体の発現上昇は認められず、さらに TGF- $\beta$  刺激によるシグナル伝達分子 Smad2 のリン酸化は TNF- $\alpha$  により亢進されなかった。以上から EMT における TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  の協調作用は Smad2 のリン酸化よりも下流において起こっていることが示唆された。そこで TGF- $\beta$  シグナルの標的遺伝子である PAI-1 の転写が TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  により協調的に誘導されることが PAI-1 プロモーター配列を有するレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイならびに内因性 PAI-1 の発現を検討する定量的 RT-PCR により示された。この協調作用はやはり TGF- $\beta$  シグナルの標的遺伝子であり、EMT を誘導する転写因子である Snail の発現調節についても認められたが、Smad 結合 element のみからなる 9xCAGA レポーターや TNF- $\alpha$  シグナルに応答する NF $\kappa$ B レポーターでは見られなかった。以上のことから本研究における TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  の協調作用は、Smad 経路についてはそのリン酸化による活性化段階では認められず、その下流で標的遺伝子の転写制御の段階までに起きていることが示唆された。また EMT を誘導する因

子 Snail の mRNA レベルの発現上昇に両者が協調的に働いていることが示唆された。

次に肺腺癌細胞株 Lc2/ad を用いて TNF- $\alpha$  の TGF- $\beta$  による EMT に対する作用につき、A549 細胞と同様のことが観察されるか検討を行ったところ、細胞の形態変化について同様の促進作用が認められた。Fibronectin の TGF- $\beta$  単独刺激による発現誘導は明らかではなかったが、TNF- $\alpha$  により有意に促進された。また N-cadherin の発現は TGF- $\beta$  単独で誘導され、両者による促進は明らかではなかった。E-cadherin については、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  単独の刺激による発現抑制が、両者の投与により促進された。この Lc2/ad 細胞では A549 と異なり Mesenchymal to epithelial transition (MET) の誘導因子 TTF-1 の発現が認められ、この TTF-1 は E-cadherin の発現を誘導し、TTF-1 自身は TGF- $\beta$  によって発現抑制を受けることが報告されている。Snail に加え TTF-1 の発現に対する TNF- $\alpha$  の作用を検討したところ、Snail については TGF- $\beta$  単独で有意な発現上昇が認められないものの、TNF- $\alpha$  によって増強された。一方 TTF-1 については TGF- $\beta$  のみならず TNF- $\alpha$  によっても発現が抑制された。

上記の観察から、RAW 264.7 細胞から分泌された TNF- $\alpha$  が TGF- $\beta$  による A549 細胞の EMT を促進しているのではないかと考え、マウス TNF- $\alpha$  に対する中和抗体の効果について RT-PCR により遺伝子発現変化の検討をおこなった。コントロールの IgG 抗体を加えた場合と比較して、TNF- $\alpha$  中和抗体を作用させた条件では、TGF- $\beta$  による N-cadherin や Fibronectin の発現誘導が LPS 前処理下に部分的に抑制された。TNF- $\alpha$  中和抗体による抑制が部分的であったことから、RAW 264.7

細胞から分泌されるその他の炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  と IL-6 の発現を RT-PCR で検討した。その結果 RAW 264.7 細胞に IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA の発現が認められ、LPS で用量依存的に増強することが明らかとなった。そこで TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 それぞれの TGF- $\beta$  による Fibronectin、N-cadherin 発現への影響を検討したところ、TNF- $\alpha$  と同様に IL-1 $\beta$  に発現促進作用があるのに対して、IL-6 では促進作用が認められなかった。このため IL-1 $\beta$  について TGF- $\beta$  による EMT 誘導への影響の確認を行った。細胞の形態変化は TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$  それぞれ単独で誘導され、それは両者の刺激で促進された。蛋白発現では TGF- $\beta$  による Fibronectin の発現誘導と E-cadherin の発現抑制は IL-1 $\beta$  により促進される傾向があった。

以上のことから、肺癌由来 A549 細胞における TGF- $\beta$  誘導性の EMT とそれによる細胞運動能・浸潤能の亢進は、マクロファージ RAW 264.7 細胞の働きにより、さらに促進されることが明らかとなった。その機序の一つとして RAW 264.7 細胞から分泌される TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  が TGF- $\beta$  による癌細胞の EMT を増強することが明らかとなった。今回得られた結果はあくまで培養細胞株を用いた *in vitro* の実験系で得られたものであり、実際の癌の悪性化における EMT を解明する目的においては限界があるものの、EMT の素過程の一端として TGF- $\beta$  と炎症性サイトカインの関係が明らかになったという点で意義が大きいと思われる。