

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 河田 美貴子

本研究は癌細胞の浸潤・転移過程において重要な役割を果たすと考えられている上皮間葉転換(EMT)に対するマクロファージ細胞の影響を明らかにするため、肺腺癌細胞株A549を用いて、TGF- β による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、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、同定されたサイトカインとTGF- β の協調作用を説明する分子機構の解明を試み、この協調作用が他種の肺癌細胞株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、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の一端をin vitroレベルで明らかにすることを試みたもので、下記の結果を得ている。

1. A549細胞とRAW 264.7細胞の共培養の結果、TGF- β 誘導性のA549細胞のEMTは、RAW 264.7細胞存在下で促進された。
2. TGF- β によるA549細胞の形態変化はRAW 264.7細胞の培養上清によって促進され、これはLPS添加によりわずかに増強された。RT-PCRによる検討では、培養上清によるFibronectinとN-cadherinのTGF- β との協調的な発現誘導が観察された。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- β 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。
3. RAW 264.7細胞からTNF- α 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RT-PCRおよびELISAにて確認した。
4. TGF- β 誘導性のEMTに対するTNF- α の作用に関して解析をした。A549細胞におけるTGF- β による細胞の形態変化とN-cadherin、Fibronectinの発現上昇は、TNF- α を加えることにより亢進した。これらの結果は、mRNAおよび蛋白レベルで証明できた。
5. MMP-9やMMP-2の発現がTGF- β により上昇し、それはTNF- α の共刺激によりさらに促進された。TGF- β 単独刺激と比較してTNF- α の共刺激により細胞運動能の亢進が認められ、これはMMP阻害剤で抑制された。
6. A549細胞のTGF- β によるEMTに対するTNF- α の増強作用について、そのメカニズムの解析をしたところ、既報で示されていたTNF- α によるA549細胞におけるTGF- β 受容体の発現上昇は認められず、さらにTGF- β 刺激によるシグナル伝達分子Smad2のリン酸化はTNF- α

により亢進されなかった。一方、TGF- β シグナルの標的遺伝子であるPAI-1の転写がTGF- β とTNF- α 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、EMTを誘導する転写因子でTGF- β シグナルの標的遺伝子であるSnailの発現調節においても認められたが、この協調作用はSmad結合elementのみからなる9xCAGAレポーターやTNF- α シグナルに応答するNF κ Bレポーターでは見られなかった。以上のことから本論文におけるTGF- β とTNF- α の協調作用は、Smad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。

7. 別の肺腺癌細胞株Lc2/adを用いてTNF- α のTGF- β によるEMTに対する作用につき検討を行い形態変化およびEMT関連マーカーに関してA549細胞と同様に促進効果を認めた。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- β 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- α の作用を検討したところ、SnailについてはTGF- β 単独で有意な発現上昇が認められないものの、TNF- α によって増強された。一方TTF-1についてはTGF- β のみならず TNF- α によっても発現が抑制された。
8. マウスTNF- α 中和抗体を作用させたRAW 264.7細胞の培養上清では、A549細胞のTGF- β 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- α 中和抗体による抑制が部分的であったことから、RAW 264.7細胞で発現するIL-1 β 、IL-6のTGF- β によるFibronectin、N-cadherin発現への影響を検討したところ、TNF- α と同様にIL-1 β に発現促進作用認められ、IL-6では促進作用が認められなかった。

以上、本論文は肺癌細胞A549におけるTGF- β 誘導性のEMTがマクロファージRAW 264.7細胞の働きによりさらに促進されることを明らかにした。その機序の一つとしてRAW 264.7細胞から分泌されるTNF- α とIL-1 β がTGF- β による癌細胞のEMTを増強することを示した。今回得られた結果はあくまで培養細胞株を用いたin vitroの実験系で限界があるものの、EMTの素過程の一端としてTGF- β 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あると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。