

論 文 要 約

論 文 題 目

Endoglin (CD105)はSMAD4を介した制御を受けて発現し、ヒト膵癌細胞のspheroid形成の保持、浸潤の抑制に関与する。

Endoglin (CD105) is relevant to maintenance of spheroid formation and suppression of invasion, and its expression is regulated by SMAD4 in human pancreatic cancer cells.

氏 名 _____ 小 梶 恵 利 _____

〔目的〕

膵癌の90%以上を占める膵管癌の進展の特徴として、高度な線維化を示す腫瘍間質の中を腫瘍細胞が容易に遊走・浸潤していくことが挙げられる。そこで、本研究では、膵癌の予後不良を規定する因子の一つである易浸潤性に関わる因子とその制御機構を明らかにすることを目的に、膵癌培養細胞株におけるspheroid形成能とその制御因子を探った。

〔方法並びに成績〕

1. ヒト膵癌組織由来の培養細胞9株 (AsPC-1、BxPC-3、KP-1NL、KP-2、KP-3、MIA-PaCa、Panc-1、SUIT-2、TCC PAN2) を用いて、通常の単層(2D)培養とともに、非接着性の条件下で三次元(3D)培養することでspheroidを形成させた。9株のうち、KP-2、KP-3は細胞同士が結合し、球状の集塊、すなわち、spheroidを形成する傾向を示した。その他の細胞株は、培地中では細胞が集簇する傾向を示すものの、細胞同士の結合が緩く、spheroidを形成するものは少なかった。得られたKP-2、KP-3のspheroidのcell block標本では、内部構造は一様で、極性を持った配列や腺管構造などの明らかな組織構築像は認めなかった。
2. 両培養を行ったKP-2、KP-3のtotal RNAを用いて、3' -IVT Arrayによる網羅的遺伝子発現解析を行った。2Dと比較して3Dで5倍以上発現が増強している遺伝子は、KP-2で1156 entities、KP-3で1139 entitiesであった。Venn diagramによる解析では、KP-2とKP-3に共通して5倍以上発現が増強していたのは212 entitiesであり、その中にはSMAD family member 4 (SMAD4)が含まれていた。
3. 用いた細胞株9株でのSMAD4 mRNAの相対発現量を確認すると、AsPC-1、BxPC-3、SUIT-2およびTCC-PAN2では殆ど発現がないか、あってもごく僅かであった。一方、KP-2、Panc-1、KP-1NL、KP-3およびMIA-PaCaでは差はあるものの、SMAD4 mRNA発現を示していた。2Dと3D培養条件下の比較では、KP-2、Panc-1、KP-3およびMIA-PaCaでは、有意に3D条件下でSMAD4 mRNAの発現の亢進を認めた。
4. KP-3において、SMAD4をknockdownし、mRNAの発現量の差異を確認した。BMP and activin membrane bound inhibitor (BAMBI)やnoggin (NOG)のmRNAは発現の亢進を示した。一方で、endoglin (ENG) mRNAは2Dでは発現に変化を認めなかったが、3Dではその発現が減弱していた。用いた細胞株9株において、ENG mRNAはいずれの細胞株においても発現が認められたが、SMAD4とほぼ同様の発現パターンを示し、KP-2、Panc-1、KP-1NLおよびMIA-PaCaの4株の細胞において高い発現を認めた。

5. KP-2において、ENGをknockdownし、3D培養を行った結果、control細胞群に比べて、ENG knockdown細胞群でspheroidの直径が有意に短くなり、spheroidの小型化がみられた。このspheroid細胞では、ENGの発現抑制に伴い、TGFB2、SMAD9のmRNA発現量の減弱がみられた。また、蛋白発現ではphospho-SMAD1/5/9の変動が認められた。
6. Transwell cell invasion assayでは、Matrigel Invasion Chamber を用いて、matrigelの水和後、一定量のspheroidをupper chamberに播種した。播種0、3、6、12、18、24時間後のupper chamberのspheroidの形態を観察するとともに、その数を計測した。播種したspheroidはmatrigel上で、徐々に小型化・崩壊し、細胞が孤在化するとともにmatrigel内に浸潤する傾向を示した。Control細胞群では播種後24時間を経過しても幾つかのspheroidは残存していたのに対して、ENG knockdown細胞群では、播種後12時間後にはほぼ全てのspheroidが崩壊し、孤在性に細胞が伸展していた。播種24時間後、膜裏に浸潤した細胞を計数すると、膜裏に遊走した細胞はcontrol細胞群に比べてENG knockdown細胞群で少なかった。さらに、膜裏から剥離し、lower chamberに沈下・浮遊する細胞は、ENG knockdown細胞群の方が多かった。

[総括]

膵癌細胞ではENGはSMAD4を介したpathwayによって発現が制御されている可能性が示唆された。また、ENGは腫瘍細胞相互の結合性の保持と浸潤の抑制に働いていることが明らかになった。今後、ENGの発現とその消滅機構を明らかにすることで膵癌の予後を左右する易浸潤性を特異的に抑制することもできると思われる。