

氏 名 かとう しんいちろう  
**加藤 真一郎**

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 富医薬博甲第 137 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 薬学領域 博士課程  
生命薬科学専攻

学位論文題目 **不均一ながん細胞の相互作用による腫瘍悪性化機構の解明**

論文審査委員

(主査)	教授	濟木 育夫	(指導教員)
(副査)	教授	今中 常雄	
(副査)	教授	門脇 真	

# 論文内容の要旨

## 【序論】

腫瘍組織は、がん細胞、間質細胞を含む不均一な細胞集団として存在しており、そこでは極めて複雑な細胞間クロストークが繰り広げられている。こういった腫瘍内における細胞間クロストークは腫瘍微小環境の構成因子として、がんの恒常的な増殖を維持し、転移を導く上で重要な要因として機能している。

腫瘍悪性化の最大の特徴である転移には、高い浸潤能の獲得に伴う原発巣からの脱離が必須であり、その脱離には上皮間葉転換(epithelial-to-mesenchymal transition : EMT)と呼ばれるプロセスが綿密に関わっている。EMTはTGF- $\beta$ などの細胞外シグナルによって制御されており、浸潤能の亢進と共に、転写因子 Snailなどを介した上皮系マーカー E-cadherin の発現抑制をその特徴とする。さらに、腫瘍内部における EMT の誘導は空間的に不均一であり、結果として異なった表現型を有する不均一ながん細胞集団を生み出すという側面を持っている。ところが、同じく腫瘍微小環境を構成するがん細胞 - 間質細胞間の相互作用に対し、性質の異なるがん細胞同士の相互作用は全く注目されてこなかった。

本研究は、不均一ながん細胞間相互作用の腫瘍生物学的な役割を明らかにするため、「EMTを起こしたがん細胞 (M-cell)」と「EMTを起こしていないがん細胞 (E-cell)」のクロストークが腫瘍悪性化に及ぼす影響、およびその不均一性を維持する機構の一端を実験的に明らかにすることを目的とした。

【第1章】間葉転換した上皮系がん細胞は、WNT3 および WNT5B の分泌を介して周囲の上皮系がん細胞の転移を助長する<sup>(1)</sup>

M-cell と E-cell が共存することによる機能的表現型を調べるために、TGF- $\beta$  の刺激誘導性に EMT を起こすヒト肺腺癌由来上皮系細胞株 A549 およびヒト膵癌細胞株 Panc-1 を用いた共培養実験を行った。

TGF- $\beta$  刺激 A549 および Panc-1 を M-cell、未刺激 A549 および Panc-1 を E-cell として、M-cell と E-cell を 24 時間の直接共培養させた後にマトリゲル浸潤アッセイ、実験的肺転移モデルに供した。その結果、M-cell との共培養によって、E-cell の浸潤能・転移能が著しく亢進され、がん細胞間クロストークの重要性が明らかとなった。さらに、トランスウェルチャンバーを用いた間接共培養実験、M-cell 由来の培養上清 (M-CM) 処理実験から、E、M-cell 間クロストークには M-cell 由来の液性因子が重要な役割を果たしていることが推察された。この液性因子を同定する目的で cDNA マイクロアレイ解析および Gene set enrichment analysis (GSEA) を行ったところ、個体発生に必須であり、がん遺伝子としても知られる WNT family のうち、WNT3 および WNT5B がその候補に挙げられた。実際に、M-cell との相互作用によって E-cell に付与される浸潤能の亢進は、WNT 分泌阻害剤 IWP-2 および WNT3、WNT5B に対する siRNA を用いて M-cell からの WNT の分泌を阻害することでほぼ完全に抑制された。さらに、M-cell の共存による E-cell の肺転移能の亢進は、IWP-2 の存在下で共培養することで著しく抑制された。

したがって、M-cell は WNT3、WNT5B の分泌を介して E-cell に浸潤能・転移能を付与しており、WNT シグナルが転移抑制の一つの標的となることが示唆された。

## 【第 2 章】論文投稿を予定しているため論文採択後に公開

## 【第 3 章】桂皮由来化合物 Procyanidin C1 は TGF- $\beta$ 誘導性の EMT を抑制する<sup>(2)</sup>

TGF- $\beta$  シグナルの構成因子である Smad4 のノックアウトマウスでは腫瘍の進行に伴う EMT が誘導されないことから、TGF- $\beta$  が EMT 誘導に必須のシグナル経路であることが報告されている。さらに TGF- $\beta$  による EMT が、がん細胞間の相互作用を介して、悪性化を助長することを示した。そこで、当研究室で見出だした大腸がん細胞の肝転移抑制作用を有する十全大補湯の構成生薬エキス（黄耆、甘草、桂皮、地黄、芍薬、川芎、当帰、人参、茯苓、蒼朮）を用い、TGF- $\beta$  誘導性 EMT を抑制する生薬由来化合物の探索を行った。

A549 細胞に各種生薬エキスを前処理し、E-cadherin の発現変化を指標にすることで TGF- $\beta$  誘導性 EMT に対する各種生薬エキスの効果を検討した。その結果、桂皮エキスが TGF- $\beta$  誘導性 EMT に伴う E-cadherin の発現低下を最も強く抑制した。さらに、桂皮エキスは A549 細胞の運動能には直接影響せず、EMT に伴って亢進される運動能のみを抑制したことから、桂皮エキスが TGF- $\beta$  依存性 EMT を抑制することが示された。また、桂皮エキスの E-cadherin の発現低下に対する抑制効果は、産地やロットごとに異なっていた。LC-MS/MS による解析から、この効果は桂皮エキス中に含まれる Procyanidin C1 の含有量に依存していることが示唆され、実際に Procyanidin C1 の濃度依存的に TGF- $\beta$  誘導性 EMT が抑制されることを明らかにした。

## 【総括】

従来、腫瘍微小環境中の間質細胞とがん細胞間のクロストークが腫瘍悪性化に及ぼす影響が注目されてきたが、それに対し本研究では形質の異なるがん細胞同士のクロストークによる腫瘍悪性化機構を初めて明らかにした。特に EMT を起こしたがん細胞依存的な WNT シグナルが、腫瘍の悪性化、不均一性の維持に関与することを示した。さらに、現在 EMT 誘導の中心的な分子とされている TGF- $\beta$  シグナルを標的とした桂皮由来化合物 Procyanidin C1 を見出すことに成功した。今後は、がん細胞の不均一性が如何に腫瘍悪性

化を導くのかを EMT のみならず様々な視点から明らかにし、新たな治療標的の発見を命題  
としたい。

**【参考論文】**

- 1) Mesenchymal-transitioned cancer cells instigate the invasion of epithelial cancer cells through the secretion of WNT3 and WNT5B, Kato S, et al., *Cancer Sci.*, 2014, *in press*.
- 2) Procyanidin C1 from *Cinnamoni Cortex* inhibits TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition in A549 lung cancer cell line, Kin R, Kato S, et al., *Int. J Oncol.*, 2013; 43:1901-1906

## 学位論文審査の要旨

腫瘍組織は、がん細胞、間質細胞を含む不均一な細胞集団として存在しており、そこでは極めて複雑な細胞間クロストークが繰り広げられている。こういった腫瘍内における細胞間クロストークは腫瘍微小環境の構成因子として、がんの恒常的な増殖を維持し、転移を導く上で重要な要因として機能している。

腫瘍悪性化の最大の特徴である転移には、高い浸潤能の獲得に伴う原発巣からの脱離が必須であり、その脱離には上皮間葉転換(epithelial-to-mesenchymal transition : EMT)と呼ばれるプロセスが綿密に関わっている。EMTはTGF- $\beta$ などの細胞外シグナルによって制御されており、浸潤能の亢進と共に、上皮系マーカーE-cadherinの発現抑制をその特徴とする。さらに、腫瘍内部におけるEMTの誘導は空間的に不均一であり、結果として異なった表現型を有する不均一ながん細胞集団を生み出すという側面を持っている。ところが、がん細胞-間質細胞間の相互作用に対し、性質の異なるがん細胞同士の相互作用の実態については報告がなかった。

本研究は、不均一ながん細胞間相互作用の腫瘍生物学的な役割を明らかにするため、「EMTを起こしたがん細胞(M-cell)」、「EMTを起こしていないがん細胞(E-cell)」によるクロストークが腫瘍悪性化に及ぼす影響を実験的に明らかにすることを目的とした。

### 間葉転換した上皮系がん細胞は、WNT3およびWNT5Bの分泌を介して周囲の上皮系がん細胞の転移を助長する

M-cellとE-cellが共存することによる機能的表現型を調べるために、TGF- $\beta$ 刺激ヒト肺がん細胞A549およびヒト膵がん細胞Panc-1をM-cell、未刺激A549およびPanc-1をE-cellとして、M-cellとE-cellを24時間の直接共培養させた後にマトリゲル浸潤アッセイ、実験

的肺転移モデルに供した。

その結果、M-cell との共培養によって、E-cell の浸潤能・転移能が著しく亢進され、がん細胞間相互作用の重要性が明らかとなった。さらに、この相互作用は M-cell が分泌する WNT3 および WNT5B を介したものであることを示し、WNT3/WNT5B 依存的に E-cell に対して二次的に EMT を誘導することで浸潤能・転移能の高いがん細胞を生み出す機構を明らかにした。

#### **間葉転換したがん細胞は connective tissue growth factor (CTGF)の分泌を介して上皮系表現型を再獲得する**

原発巣における E-、M-cell の不均一性を維持する機構として、M-cell 同士の相互作用に注目し、M-cell が分泌する液性因子が M-cell 自身の EMT の表現型に及ぼす影響を検討した。

M-cell 由来の培養上清処理によって、M-cell 由来液性因子が EMT とは反対の MET (mesenchymal-to-epithelial transition) 様の変化を誘導しうることが明らかとなった。バイオインフォマティクスを用いた手法に加え、中和抗体による阻害実験、組み換え型タンパク質を用いた検討から、M-cell は自身が分泌する CTGF により上皮系がん細胞様の表現型を再獲得することが示された。すなわち、M-cell 同士の相互作用が腫瘍内の不均一性を維持している可能性を見出した。

#### **桂皮由来化合物 Procyanidin C1 は TGF-β誘導性の EMT を抑制する**

TGF-βによる EMT (M-cell) が、がん細胞間の相互作用を介して、悪性を助長することを示したことから、抗腫瘍・抗転移効果を有する漢方薬：十全大補湯の構成生薬エキスをを用いて TGF-β誘導性 EMT を抑制する生薬由来化合物の探索を行った。

十全大補湯構成生薬のうち、唯一桂皮エキスが TGF- $\beta$ 誘導性 EMT を抑制することを見出した。また、桂皮エキスの TGF- $\beta$ 誘導性 EMT に対する抑制効果は、産地やロットごとに異なっていた。LC-MS/MS による解析から、この効果は桂皮エキス中に含まれる Procyanidin C1 の含有量に依存していることが見出し、実際に Procyanidin C1 の濃度依存的に TGF- $\beta$ 誘導性 EMT が抑制されることを明らかにした。

以上の研究結果は、がん細胞同士のクロストークによる腫瘍悪性化機構を初めて明らかにしたものであり、近年注目を集めているがんの Heterogeneity の役割・意義に迫る上で重要な知見を提供するものと考えられる。さらに、TGF- $\beta$ シグナルを標的とした桂皮由来化合物 Procyanidin C1 を見出すことに成功しており、今後、EMT を標的とした分子標的治療に加え、がん細胞間の相互作用を標的とした治療法への貢献も期待される。すでに国際的な学術誌に公表していることから、審査の結果、提出論文内容が博士（薬学）の学位を受けるに値すると判断した。