


学位論文内容の要旨

受付番号	第 353 号	氏名	鈴木厚子 
論文題名	酸性細胞外pHは、ルイス肺癌モデルにおける上皮間葉系移行を促進する		
指導教員	加藤靖正		

論文内容の要旨(2,000字程度)

I 研究目的(300字程度)

癌細胞の浸潤や転移の過程には、上皮の性質から、間葉系の性質に変化する上皮間葉系移行(EMT)が注目されている。

これまでに、Katoら(JBC, 1992)は、酸性pHによりメラノーマ細胞がEMT様に変化することを見いだしている。本研究では、carcinomaモデルとしてマウスルイス肺癌(LLC)細胞株を用いて、酸性細胞外pH(pHe)が、EMTを誘導することを検証した。

II 研究方法(500字程度)

まず始めに、LLC細胞より高転移株と低転移株を樹立した。C57BL/6マウスの尾静脈にLLC細胞を注射し、約3週後肺転移を確認したのち、その結節を採取しディッシュ内の培養を繰り返し数回行うことで選択した。初回の転移結節から低転移株(LLCm1)とさらに3回の計4回の転移を繰り返すことによって得られた高転移株(LLCm4)を用いて本研究を行った。尚、マウスを用いた実験は、動物実験委員会の承認を受けて行った。

細胞培養は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)とF12を1対1に混合した培地に15mM HEPES 4mMリン酸と重炭酸ナトリウム1g/Lとを加えたものに10% fetal bovine serum (FBS)を添加し37°C・5%CO2条件下で培養した。pHの調整は塩酸と水酸化ナトリウムにて行った。

EMTマーカー遺伝子の発現は、逆転写反応後に定量的PCRにより決定した。細胞が分泌するMMPはゼラチンザイモグラフィとウエスタンブロット法にて評価した。またE-cadherinとVimentinについては、免疫染色法により蛍光顕微鏡下で観察した。

細胞遊走はwound healing assayで、浸潤活性はMatrigel[®]を用いるBoyden chamber assayにより分析した。

III 研究結果(600字程度)

LLC細胞よりマウスに実験的転移を繰り返すことで樹立した低転移株 (LLCm1細胞) と高転移株 (LLCm4細胞) を用いた本研究で、以下の結果を得た。

1. 両細胞をpH7.4で培養し、位相差顕微鏡下で観察するとLLCm1細胞は、細胞間隙が狭く密集して増殖し、LLCm4細胞では細胞間隙が広く線維芽細胞様の形態で、分散したまま増殖した。次に、それぞれの細胞をマウスの尾静脈に注射し、肺転移巣の数を比較したところLLCm4細胞はLLCm1細胞より9倍多くなっていた。
2. 細胞が分泌するMMPについて、培養上清を用いてゼラチンザイモグラフィで評価した結果、MMP-9活性はpH6.8条件下で有意に増加していた。
3. MMP-9の遺伝子発現量をRT-qPCRにて検証した。MMP-9遺伝子は、pH7.4よりpH6.8の条件下でLLCm1細胞、LLCm4細胞とも有意に増加していた。加えて、MMP-3やMMP-13の遺伝子発現も酸性pH条件で増強していた。
4. 位相差顕微鏡による観察では、LLCm1細胞をpH6.8条件下で培養するとLLCm4細胞と同様な線維芽細胞様形態に変化したことが見いだされた。
5. EMTのマーカーとしてE-cadherinとVimentinの発現量を比較したところ酸性pHeは、上皮マーカーの1つであるE-cadherinを減少させたが、間葉系マーカーの1つであるVimentinの発現を誘導した。
6. E-cadherin遺伝子発現抑制の機序を解明するために、転写調節因子について、RT-qPCRで検証した。その結果E-cadherin遺伝子発現の抑制にはTwist1, Twist2, Zeb2がリプレッサーとして関与していることが分かった。
7. 細胞の運動性について、wound healing assayで検討したところ、酸性pH条件下で両細胞ともに運動能が亢進した。
8. 細胞のインビトロ浸潤活性についてMatrigel[®]を用いBoyden chamber assay法により検討した結果、両細胞ともに酸性pHeによりインビトロ浸潤活性は促進した。

IV 考察及び結論(600字程度)

LLCm4細胞株は、線維芽細胞様の形態をし、LLCm1細胞より転移能が亢進していた。LLCm1細胞を、酸性条件下で培養するとLLCm4細胞と同様な線維芽細胞様の形態に変化した。このことは酸性pHeによりEMTが誘導されたことを示唆しており、その仮説について検討した。まず細胞外マトリックスの分解酵素の分泌について調べたところMMP-9やMMP-3活性についても、酸性条件下で有意に亢進した。MMP-9やMMP-3, MMP-13は癌細胞が血管等への浸潤・転移する際の重要な分子であり、また基底膜分解と基底膜内移動は、転移の律速段階と考えられている。酸性pHeによるE-cadherinの低下とVimentinやMMPsの誘導、そしてインビトロ浸潤能の亢進は、低転移性の癌細胞に見られた酸性細胞外pHによる形態の変化が上皮間葉系移行 (EMT) によるものであった事を示している。

一般的に、EMTの表現型としてE-cadherinの発現低下およびVimentin, N-cadherin, fibronectinの発現上昇と、MMP-9の発現が知られている。このうちE-cadherinは、Snail, Slug, Twist1, Twist2, Zeb1およびZeb2などによって制御されることが知られているが、本研究では酸性pHeにより、Twist1, Twist2, Zeb2が誘導された、一方、Snail, Slug, Zeb1の遺伝子発現には変化を及ぼさなかった。このことから、本研究におけるE-cadherinの転写抑制機構の1つには、Twist1, Twist2, Zeb2がリプレッサーとして作用している可能性が示唆された。Liuらは、TGF- β 刺激下でのEMTの誘導を検討した結果、Twist1, Zeb1, Snail, Slug, の誘導が認められたと報告しているが、遺伝子発現パターンは異なっており、本研究では別の機序でEMTが誘導された可能性が高い。

結論

酸性細胞外pHは、EMTを促進誘導する微小細胞外環境因子であることが示唆された。