

氏名(本籍地) 鈴木厚子(福島県)  
 学位記および番号 博士(歯学), 甲 第335号  
 学位授与の日付 平成27年3月10日  
 学位論文題名 「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」  
 論文審査委員 (主査) 伊東博司教授  
 (副査) 加藤靖正教授  
 島村和宏教授

### 論文の内容および審査の要旨

【研究目的】 癌細胞の浸潤や転移の過程では, 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, *J Biol Chem* 1992) は, 酸性pHによりmelanoma細胞においてEMTが誘導されることを見出している。本研究では, carcinomaモデルとしてマウス肺扁平上皮癌に由来するルイス肺癌 (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。

【研究方法】 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転移結節を採取しディッシュ内の培養を繰り返し行うことで選択した。初回の転移結節から低転移株 (LLCml) とさらに3回の計4回の転移を繰り返して得られた高転移株 (LLCm4) を用いて本研究を行った。

細胞培養はDMEMとF12を等量混合した培地に15mM HEPES, 4mMリン酸, 重炭酸ナトリウムIg/Lおよび10% fetal bovine serum (FBS) を添加して行い, 培地のpHは塩酸と水酸化ナトリウムで調整した。遺伝子の発現はRT-qPCRにより決定し, matrix metalloproteinase (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の発現は, 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Boyden chamber assayにより分析した。

【研究結果】 両細胞をpH7.4で培養するとLLCml細胞は敷石状に増殖し, LLCm4細胞は線維芽細胞様の形態で増殖していた。両細胞の肺転移巣の数を比較したところ, LLCm4細胞の転移巣の数はLLCml細胞のそれよりも9倍多かった。LLCml細胞を酸性条件下で培養すると線維芽細胞様形態に変化した。MMP-9活性は両細胞のいずれでもpH7.4の場合と比べpH6.8条件下で有意

に増加した。RT-qPCRによる解析では両細胞ともに, MMP-9遺伝子発現のみならず, MMP-3やMMP-13の遺伝子発現も酸性条件下で有意に増強した。酸性pHeは, いずれの細胞でも上皮性マーカーであるE-cadherinの発現を減少させ, 間葉系マーカーであるvimentinの発現を誘導した。また, 酸性環境では2種の細胞で, E-cadherinのリプレッサーであるTwist1, Twist2, Zeb2mRNAが上昇していた。さらに酸性pH刺激は両細胞の運動能および浸潤活性を促進した。

【考察・結論】 LLCm4細胞株は, 線維芽細胞様の形態で, LLCml細胞より転移能が充進していた。LLCml細胞を, 酸性条件下で培養すると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。MMP-3, -9, -13の発現が, 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, 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) による事を示している。本研究では酸性pHeにより, いずれの細胞においても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された。

以上のことから, 酸性細胞外pHはEMTを誘導, 促進する細胞外微小環境因子であるという結論を得た。

本論文の審査委員会は平成27年1月9日に開催された。初めに申請者から論文内容に関する説明があり, その後, 委員より1) LLC細胞の由来, 2) LLCml細胞とLLCm4細胞の樹立方法, 3) 両細胞のEMT関連遺伝子発現様式の違い, 4) E-cadherinの転写機構などについて質疑があり, それらのいずれに対しても申請者からの確かな解答があった。また, 審査委員会は和文抄録の一部修正を求め, 後日, 修正がなされたことを各委員が確認した。

審査委員会は本論文が歯科医学の発展に寄与するものであると認め, 申請者は学位授与に値すると判定した。

### 掲載雑誌

*Cancer Cell International* 2014, 14:129  
 DOI: 10.1186/s12935-014-0129-1