

学位論文題名

Suppression of in vivo tumorigenicity of rat hepatoma cell line KDH-8 cells by soluble TGF- β receptor type II

(可溶性 II 型 TGF- β 受容体は TGF- β 産生 KDH-8 肝癌細胞の造腫瘍性を抑制する)

学位論文内容の要旨

(緒言)

Transforming growth factor- β (TGF- β) は、当初 epidermal growth factor 存在下で線維芽細胞の半固形培地中での増殖を可能にする因子として同定された。その後の検討で、TGF- β の機能が他の因子の存在によって変化することが知られるようになり、現在では腫瘍形成過程における役割に関しても初期には阻害因子として働き、後期には促進因子として働くことが知られている。TGF- β を産生する腫瘍細胞の多くは TGF- β 反応性を失っていることが多く、腫瘍から産生される TGF- β は癌細胞の周囲に存在する宿主細胞、特に血管内皮細胞や免疫担当細胞に働いていると考えられている。TGF- β の免疫抑制作用機序としては、免疫担当細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導、サイトカイン産生の抑制などが報告されている。TGF- β の免疫抑制を解除することで、癌に対する免疫応答を再構築できる可能性が考えられる。本研究は、癌細胞自身に可溶性 II 型 TGF- β 受容体を産生させることで、TGF- β 産生を介した免疫監視機構の攻撃を回避している KDH-8 肝癌細胞の免疫監視機構からの回避機構を解除できる可能性を検討した。

(材料と方法)

細胞は、ラット肝癌細胞株 KDH-8 を用いた。TGF- β 産生量の測定は、ミンク肺上皮細胞由来 TGF- β 感受性細胞株 Mv1Lu 細胞株の増殖抑制程度を MTS 法にて検討した。可溶性 II 型 TGF- β 受容体導入株は、II 型 TGF- β 受容体の細胞外ドメイン (アミノ酸 1-159) を pcDNA3.1 発現ベクターに組み込み、KDH-8 細胞に電気穿孔法にて導入し、G418 にて選択後クローンを得た。RT-PCR は、細胞より RNA を Trizol にて抽出後、cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。PCR 増幅は、95° C 1 分間処理後、95° C 1 分間、57° C 1 分間、72° C 1 分間を 35 サイクル行った。Western blot による可溶性 II 型 TGF- β 受容体の同定は、細胞の培養上清及び細胞より細胞質蛋白を抽出後、抗 II 型 TGF- β 受容体抗体にて検出した。細胞周期とアポトーシスは、Propidium Iodide (PI) 染色後 FACscan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) にて検討した。ラットにおける造腫瘍能の検討は、6-8 週令の WKAH ラット背部皮下に 5×10^6 個の癌細胞を移植し、その後腫瘍径を 5 日毎に計測した。脾細胞の Interleukin-2 (IL-2) 産生能は、移植ラットを犠牲死させる際に脾臓を採取して脾細胞を得た後、Con A 存在下で 48 時間培養後に上清を回収し、ラット IL-2 ELISA kit を用いて測定した。Interleukin-12 (IL-12) mRNA 発現は、移植ラットを犠牲死させる際に腫瘍組織を採取して RT-PCR 法にて測定した。統計学的有意差検定は、Student's *t*-test にて行った。

(結果)

可溶性 II 型 TGF- β 受容体導入株の樹立と可溶性 II 型 TGF- β 受容体発現の確認。

可溶性II型TGF- β 受容体導入株3株を樹立し、同時にvector導入株も樹立した。RT-PCR法にてmRNA発現を確認すると、可溶性II型TGF- β 受容体mRNAは可溶性II型TGF- β 受容体導入株に発現していたが、TGF- β はすべての細胞に発現していた。蛋白レベルでも同様に細胞質蛋白、培養上清いずれも導入株にのみ可溶性II型TGF- β 受容体の発現を認めた。

1. 可溶性II型TGF- β 受容体導入株の培養上清中TGF- β 活性

培養上清中のTGF- β 産生量には差がなかったが、可溶性II型TGF- β 受容体導入株では培養上清中に可溶性II型TGF- β 受容体が分泌されているために、TGF- β 活性が低下していることが予想される。

そこで、Mv1Lu細胞を用いて活性を測定したところ、vector導入株では増殖抑制を認めたが、可溶性II型TGF- β 受容体導入株の培養上清は、増殖抑制活性が低下していた。つまり可溶性II型TGF- β 受容体導入株のTGF- β 活性の低下が確認された。

2. 造腫瘍能

可溶性II型TGF- β 受容体導入株とvector導入株のin vitroでの増殖、細胞周期、アポトーシスなどには差を認めなかった。しかしながら、ラット生体内での造腫瘍性には可溶性II型TGF- β 受容体導入株KT-2とKT-3では明らかな差を認め、KT-3ではほぼ完全に退縮するラットも認められた。生存期間を Kaplan-Meier法にて検討すると、可溶性II型TGF- β 受容体導入株のKT-2とKT-3で明らかな生存期間の延長が認められた。

3. 脾細胞のIL-2産生能

脾細胞のIL-2産生と分泌は、明らかな生存期間の延長が認められた可溶性II型TGF- β 受容体導入株のKT-2とKT-3にて認められた。

4. 腫瘍組織のIL-12 mRNA発現

腫瘍組織中のIL-12 mRNA発現も明らかな生存期間の延長が認められた可溶性II型TGF- β 受容体導入株のKT-2とKT-3にて認められた。

(考案)

本研究では、可溶性II型TGF- β 受容体が分泌されていた導入株の培養上清中のTGF- β 活性が抑制されることを示した。さらに、可溶性II型TGF- β 受容体導入株の造腫瘍能が低下することを示した。TGF- β 活性の抑制と造腫瘍能の低下は、産生される可溶性II型TGF- β 受容体の量に依存しており、可溶性II型TGF- β 受容体の特異的な効果であることが示唆される。また、造腫瘍能の低下の認められるラットにおいて、脾細胞のIL-2産生能の増加と腫瘍組織におけるIL-12産生の増加が認められ、造腫瘍能の低下が脾細胞のIL-2産生能の増加と腫瘍組織におけるIL-12産生の増加が一因となった可能性を強く示唆する。KDH-8移植ラットでIL-2産生の低下が認められることを報告している教室の従来の報告とも矛盾しない成績と考えられる。可溶性II型TGF- β 受容体によって腫瘍組織におけるIL-12産生が増加したという事実は、TGF- β がIL-12産生抑制を介して腫瘍細胞の免疫監視機構から回避する働きをしている可能性を示唆する。IL-12産生は、単球・マクロファージ・樹状細胞から分泌され、T細胞やNK細胞を活性化することが知られており、腫瘍組織におけるIL-12産生の増加は腫瘍組織におけるT細胞やNK細胞の活性化をもたらしていることが予想されるが、今後腫瘍組織における単球・マクロファージ・樹状細胞の活性化、T細胞やNK細胞の活性化について検討したいと考えている。

本研究で示された結果は、腫瘍組織内に可溶性II型TGF- β 受容体を産生させることができれば、少なくともTGF- β 産生癌細胞の増殖を抑制できる可能性を示唆しており、今後naked DNAを用いた遺伝子治療による増殖抑制が可能であるかを検討する予定である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 野 口 昌 幸

学 位 論 文 題 名

Suppression of in vivo tumorigenicity of rat hepatoma cell line KDH-8 cells by soluble TGF- β receptor type II

(可溶性 II 型 TGF- β 受容体は TGF- β 産生 KDH-8 肝癌細胞の造腫瘍性を抑制する)

申請者は、TGF- β 産生ラット肝癌細胞株 (KDH-8) の皮下移植モデルにて IL-2 産生などの免疫応答が低下した研究成果から、TGF- β のシグナルを可溶性 II 型 TGF- β receptor (sTRII) を産生させることによって遮断し、免疫抑制の回復を図ることができると仮説を立て、以下の検討を行った。申請者は KDH-8 細胞に sTRII 発現ベクターを導入して 3 クローンを樹立した。sTRII 導入株で、sTRII の mRNA 発現と蛋白発現を確認した。また、ラット肝癌細胞株の産生する TGF- β 活性に対する中和効果を検討し、部分的に TGF- β 活性を中和していることを確認した。親株、vector 導入株、sTRII 導入株を WKAH ラットに移植したところ、sTRII 導入株の 3 株中 2 株にて増殖抑制が観察された。増殖抑制が観察された導入株では、腫瘍組織での可溶性 TGF- β 産生が確認されたが、増殖抑制が認められなかった1株では産生が低下していた。増殖抑制が観察された sTRII 導入株担癌ラットでは脾細胞培養上清中の IL-2 産生量と腫瘍組織における IL-12 mRNA 発現亢進が認められた。

公開発表にあたり、副査の秋田弘俊教授より、sTRII と TGF- β の直接的結合の有無、IL-12p70 のヘテロダイマーの発現に関する質問が出された。申請者は、培養上清中の TGF- β 活性が部分的に中和されていたので sTRII と TGF- β は直接的に結合している可能性が高く、IL-12p35 と IL-12p40 両者の発現を腫瘍組織で同時に確認しており、ヘテロダイマーが構成されている可能性が高いと回答した。副査の守内哲也教授からは、TGF- β 活性測定法についての質問、Mv1Lu 細胞を使用した bioassay で、KT1 と KT2 間の増殖抑制効果の差の有無、KT1 は in vitro では TGF- β の活性を抑制したが、in vivo における造腫

瘍性が低下しなかった理由についての質問が出された。申請者は、bioassay の方法について詳しく説明し、KT1 と KT2 間の増殖抑制効果に有意な差はなかったと回答した。最後の質問に対しては、sTRII 導入株の KT1 を維持している間に sTRII 発現を失ってしまった細胞が出現してヘテロな集団となっていた可能性があり、そのために in vivo では TGF- β を産生していない細胞が選択的に増殖した可能性があるかと回答した。副査の野口昌幸教授から、TGF- β を産生する腫瘍にはどのようなものがあるかとの質問が出された。申請者は、一般的にはより悪性化した癌細胞で TGF- β が高発現しており、臓器癌の中では特に膵癌、乳癌、肝癌などに高発現が認められると回答した。最後に、主査の今村雅寛教授より、Western blot で検討された蛋白量と活性に乖離があること、TGF- β 活性が低下すると IL-2 や IL-12 の産生が高まる理由について質問が出された。申請者は第 1 の質問に対して、タンパク質を採った時期と活性を測定した時期が違うので細胞の状況が異なる可能性があるかと回答し、また第 2 の質問に対しては、TGF- β が免疫抑制性サイトカインとして働いているためと考えられると回答した。いずれの質問にも妥当な回答をなし得た。

この論文は、TGF- β シグナルを遮断することで腫瘍による免疫抑制を解除できる可能性を in vivo にて明らかにしたことで高く評価され、今後の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位等も併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。