

乳腺腫瘍における

Tumor endothelial marker 8 発現解析と

Endotrophin が腫瘍細胞に与える影響

(The expression of tumor endothelial marker 8 in mammary gland tumor, and  
the effects of endotrophin on neoplastic cells)

野 口 隼 矢

The expression of tumor endothelial marker 8  
in mammary gland tumor, and the effects of endotrophin  
on neoplastic cells

(乳腺腫瘍における Tumor endothelial marker 8 発現解析と  
Endotrophin が腫瘍細胞に与える影響)

Syunya Noguchi

乳腺腫瘍における  
Tumor endothelial marker 8 発現解析と  
Endotrophin が腫瘍細胞に与える影響

(The expression of tumor endothelial marker 8 in mammary gland tumor, and  
the effects of endotrophin on neoplastic cells)

野 口 隼 矢

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科  
獣医学専攻博士課程平成 28 年入学

(指導教員: 横須賀 誠)

令和 2 年 3 月

The expression of tumor endothelial marker 8  
in mammary gland tumor, and the effects of endotrophin  
on neoplastic cells

(乳腺腫瘍における Tumor endothelial marker 8 発現解析と  
Endotrophin が腫瘍細胞に与える影響)

Syunya Noguchi

Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science  
Nippon Veterinary and Life Science University

Doctoral Supervisor; Makoto Yokosuka, Professor  
(指導教員: 横須賀 誠)

March 2020

## 目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 イヌ正常組織における TEM8 の発現と局在および TEM8-isoform の組織特異的発現	
2-1 小序	5
2-2 材料と方法	9
2-2-1 試供動物	9
2-2-2 免疫組織化学	9
2-2-3 Total RNA 抽出、定性的 RT-PCR 解析・TOPO® TA クローニング	10
2-2-4 Western blot 解析	10
2-3 結果	12
2-3-1 TEM8-免疫組織化学	12
2-3-2 TEM8-定性的 RT-PCR 解析および PCR 増幅 DNA 断片シーケンス解析	22
2-3-3 TEM8-isoform western blot 解析	22
2-4 考察	26
第 3 章 ラット成長過程の乳腺組織における TEM8 の発現	
3-1 小序	29
3-2 材料と方法	31
3-2-1 試供動物	31
3-2-2 免疫組織化学	32
3-3 結果	33

3-3-1	TEM8-免疫組織化学	33
3-3-2	Notch-1-免疫組織化学	33
3-3-3	c-MET-免疫組織化学	33
3-4	考察	39
第4章 イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現とイヌ乳癌細胞株における TEM8 陽性細胞の形質的特徴		
4-1	小序	42
4-2	材料と方法	44
4-2-1	試供動物	44
4-2-2	病理組織学的診断	44
4-2-3	免疫組織化学	45
4-2-4	二重免疫組織化学	45
4-2-5	細胞培養	46
4-2-6	Western blot 解析	46
4-2-7	統計解析	47
4-3	結果	49
4-3-1	腫瘍組織学	49
4-3-2	免疫組織化学	49
4-3-3	二重免疫組織化学	50
4-3-4	<i>in vitro</i> における luminal および basal 細胞由来イヌ乳癌細胞の TEM8 発現	51
4-4	考察	61

第 5 章	イヌ乳腺腫瘍における Col-VI $\alpha$ 3 鎖 C5-domain 発現と Endotrophin が イヌ乳癌細胞に与える影響および腫瘍細胞の TEM8 発現調節に対する HIF-1 $\alpha$ の作用	
5-1	小序	66
5-2	材料と方法	72
5-2-1	試供動物	72
5-2-2	病理組織学的診断	72
5-2-3	抗体作成	72
5-2-4	免疫組織化学	72
5-2-5	細胞培養	73
5-2-6	WST-1 細胞増殖試験	73
5-2-7	<i>in vitro</i> 創傷治癒 (wound healing) 試験	74
5-2-8	Endotrophin 添加処理、Total RNA 抽出および定量的 real time RT-PCR 解析	74
5-2-9	HIF-1 $\alpha$ 誘導	75
5-2-10	Western blot 解析	75
5-2-11	統計解析	76
5-3	結果	78
5-3-1	免疫組織化学	78
5-3-2	ETP はイヌ乳癌細胞の細胞増殖を促進する	78
5-3-3	ETP は luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞の形質を変化させる	79
5-3-4	HIF-1 $\alpha$ 誘導により、TEM8-short isoform 発現は増加する	79
5-3-5	HIF-1 $\alpha$ 誘導により、Col-VI $\alpha$ 3 発現は減少する	79
5-4	考察	88

第6章 総括	96
謝辞	104
参考文献	105



## 略語一覧

ABs; Alveolar buds、胞状腺芽

ANTXR1; Anthrax toxin receptor

$\alpha$ SMA;  $\alpha$ -smooth muscle actin

$\alpha$ 3; VI型コラーゲン  $\alpha$ 3 鎖

BMP-1; Bone morphogenetic protein 1

CD133; PROM1 (prominin-1)

CD44; Hyaluronan 結合タンパク

CD49b; Integrin alpha 2

CD49f; Integrin alpha 6

CD61; Integrin beta 3、血小板糖タンパク GPIIIa

CK19; Cytokeratin 19

c-MET; 肝細胞増殖因子受容体

CoCl<sub>2</sub>; 塩化コバルト

Col- I; I 型コラーゲン (Collagen I)

Col-VI; VI型コラーゲン (Collagen VI)

C5-domain; VI型コラーゲン  $\alpha$ 3 鎖 C5-domain

C5-flagment; VI型コラーゲン  $\alpha$ 3 鎖 C5-domain を含んだ断片

DFO; Deferoxamine

ECM; 細胞外マトリックス

EMT; Epithelial-mesenchymal transition、上皮間葉移行

EpCAM; Epithelial cell adhesion molecule、CD326、上皮細胞接着分子

ETP; Endotrophin

HIF; Hypoxia-induce-factor、低酸素誘導因子

HE; ヘマトキシリン・エオジン

MaSCs; Mammary stem cells、乳腺幹細胞

MIDS; metal-ion-dependent adhesion site

PBS; リン酸緩衝生理食塩水

p-c-MET; リン酸化 c-MET

p63; がん抑制遺伝子 p53 ホモログ

RT; 逆転写

SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TBST; Tris / 0.2% Tween 20

TEBs; Terminal end buds、末梢芽状突起

TEM8; Tumor endothelial marker 8

TEM8-mAb; 抗 TEM8 マウスモノクローナル抗体

TEM8-pAb; 抗 TEM8 ウサギポリクローナル抗体

TNBC; Triple-negative breast cancer

vWA; von Willebrand factor type A

乳腺腫瘍; Mammary gland tumor (MGT)

免疫組織化学; Immunohistochemistry (IHC)

## 第 1 章

### 緒言

Tumor endothelial marker 8 (TEM8) は、腫瘍内の血管内皮細胞に高度に発現する TEM 遺伝子ファミリーの 1 つであり、Anthrax toxin receptor (炭疽菌毒素受容体、ANTXR1) としても知られている。TEM8 は、血管系の発達や腫瘍内の血管新生に関与していることが報告されているが (St Croix et al., 2000; Bradley et al., 2001; Carson Walter et al., 2001; Friebe et al., 2016)、さらに、マウスやヒトにおいて、TEM8 が心臓、肝臓、腎臓、皮膚など広範囲な組織で発現していることが明らかとなっている。また、近年では、乳癌、食道癌、肺癌やメラノーマなどの腫瘍細胞においても発現していることが明らかになっている (Davies et al., 2006; Cullen et al., 2009; Chen et al., 2013; Cao et al., 2016; Gong et al., 2018)。

TEM8 は alternative splicing によって、多様な isoforms を産生することが明らかとなっており、ヒトでは、現在までに 5 種類の TEM8 splicing variants が確認されている (Vargas et al., 2012)。Variants 1、2、4 は、細胞外、細胞膜および細胞内ドメインを持つ受容体型の膜結合型糖タンパクである。細胞外ドメインには metal-ion-dependent adhesion site (MIDS) を有する von Willebrand factor type A (vWA) ドメインが含まれており、この構造は炭疽菌毒の防御抗原との結合に重要な役割を担っている。Variants (V) 3、5 は可溶型であり、細胞膜ドメインと細胞内ドメインを欠き、V 1、2、4 の細胞外ドメインとほぼ同一の構造を有しているが、C 末端部位に特異的な 13 個の残基配列を持っている。TEM8 は、vWA ドメインを介して I 型コラーゲン (Col-I) や VI 型コラーゲン (Col-VI)  $\alpha 3$  鎖 ( $\alpha 3$ ) と結合することが知られているが (Werner et al., 2006)、Nanda et al. (2004) は  $\alpha 3$  の C5 ドメインの分解産物である Endotrophin (ETP) が受容体型 TEM8 の生理的リガン

ドであることを明らかにしている。

生体内における TEM8 の生理的な機能を検索するために、現在までに 2 種類の TEM8 knock-out (KO) マウスが作製されている。第一の TEM8-KO マウスを用いた研究において、TEM8 は正常な生理学的血管新生には関与しないことが明らかになっている。しかしながら、TEM8-KO マウスの卵巣、子宮および皮膚などの組織において、細胞外マトリックス (ECM) の過剰産生が認められていたことから、TEM8 は ECM の恒常性の制御に関与していることが示唆されている (Cullen et al., 2009)。また、第二の TEM8-KO マウスを用いた研究においては、血管内皮基底膜の形成過程における経時的な変化を解析した結果、TEM8 は皮膚における血管内皮細胞と線維芽細胞の恒常性維持に重要な因子であることが示唆されている (Besschetnova et al., 2015)。

また、TEM8 は腫瘍の進展に重要な役割を担っていることが、多数の研究者によって報告されており、いくつかのタイプの腫瘍において、腫瘍組織内の血管内皮細胞や線維芽細胞での TEM8 の増加が腫瘍の悪性形質発現に関連していることが示唆されている (Davies et al., 2006; Gong et al., 2018; Gutwein et al., 2011; Nanda et al., 2004; Rmali et al., 2004; Sakai et al., 2009; Yang et al., 2017)。また、TEM8-KO マウスを使用した異種移植実験において、TEM8 が腫瘍内の血管新生を増加させることによって腫瘍の成長を促進することを明らかにしている (Høye et al., 2018)。近年では、腫瘍細胞自体における TEM8 の発現と機能に関する研究もいくつか報告されている。骨肉腫細胞株を用いた研究においては、TEM8 は ERK1/2 を介して細胞増殖を促進することが示唆されている (Cao et al., 2016)。また、乳癌細胞株においては、ETP が受容体型 TEM8 を活性化させ、Wnt シグナルを介して腫瘍幹細胞の自己複製や、腫瘍の浸潤・転移を増強させることが明らかになっている (Chen et al., 2013)。さらに、Høye et al. (2018) は乳癌細胞株から産生された可溶性 TEM8 が血管内皮細胞の遊走を増強させることによって、血管

新生を促進させることを明らかにしている。これらのことから、TEM8は腫瘍細胞の動態を制御する重要な因子である可能性が高いものと考えられる。さらに、腫瘍治療領域においても、TEM8を標的とした治療は少ない副作用で腫瘍の進行を抑制する可能性があるものとして注目を集めており、近年、Triple-negative breast cancer (TNBC) において、TEM8を標的としたCAR T細胞免疫療法の有効性が示されている (Byrd et al., 2018)。しかしながら、腫瘍症例において、腫瘍細胞でのTEM8の発現に関しては、ほとんど報告がなく、その機能に関しては未だ不明な点が多い。さらにイヌにおけるTEM8の発現および局在は明らかにされていない。

乳腺腫瘍はイヌとヒトにおける最も一般的な腫瘍であり、イヌ乳腺腫瘍の上皮様構造はtubular、papillaryおよびsolidなどの多様な組織構造を形成し、その組織型によって異なる生物学的挙動を示している。近年では、腫瘍組織形態のみならず乳腺上皮細胞におけるluminalあるいはbasal/myoepithelial細胞マーカーを免疫組織化学的に検索することで、より詳細な組織分類が行われている。ヒトにおいて、TEM8は乳癌、結腸癌およびメラノーマなどの悪性腫瘍における血管内皮および腫瘍細胞で発現していることが明らかとなっている。

第2章では、イヌ乳腺腫瘍におけるTEM8発現を調査するにあたり、始めに、イヌ正常組織におけるTEM8発現および局在を免疫組織化学およびRT-PCR解析により検索すると同時に、各組織におけるTEM8-isoform発現の分布を明らかにすることを目的にWestern blot解析を行った。

第3章では、乳腺の成熟過程におけるTEM8発現の変化を検索するために、出生直後から出産期以降までのラット乳腺組織を使用し、それぞれの時期におけるTEM8発現を免疫組織化学により検索した。また、乳腺の形態形成に関与しているとされるNotch-1およびc-METの発現を同時に検索することで、TEM8発現と乳腺形態形成の関連性を調査した。

第 4 章では、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現および組織学的特徴との関連性を明らかにするために、イヌ乳腺腫瘍 91 症例における TEM8 発現と luminal 細胞およびbasal/myoepithelial細胞マーカーを免疫組織化学によって検索した。また、luminal および basal 細胞由来の異なる 2 種類のイヌ乳癌細胞株における TEM8、Notch-1、c-MET および p-c-MET 発現を検索することで、TEM8 陽性腫瘍細胞の形質を解析した。

第 5 章では、イヌ乳腺腫瘍において、TEM8 の生理的リガンドである ETP の発現と局在を予測するために、ETP の供給源である Col VI、Col VI  $\alpha 3$  鎖 ( $\alpha 3$ ) および C5-domain の発現・局在を免疫組織化学により検索した。また、ETP のイヌ乳癌細胞に与える影響を明らかにするために、ETP 添加によるイヌ乳癌細胞における細胞増殖能および形質の変化を解析した。最後に、イヌ乳腺腫瘍細胞における TEM8 発現調節を明らかにするために、血管新生において重要な転写因子である Hypoxia-induce-factor (HIF) -1 $\alpha$  の TEM8-isoform 発現に対する作用を *in vitro* により検索した。

第 6 章では、全ての章の結果を受け、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 および ETP に関する総合的な考察を行った。

## 第 2 章

### イヌ正常組織における TEM8 の発現と局在および

#### TEM8-isoform の組織特異的発現

##### 2-1 小序

Tumor endothelial marker 8 (TEM8) は、結腸癌の血管内皮細胞における遺伝子発現解析 (SAGE) により初めて発見された (St Croix et al. 2000)。その研究において、*TEM8* mRNA 発現は腫瘍血管内皮細胞で顕著に増加し、また正常な血管内皮細胞でも少なからず発現していることが明らかされている。その後、Bradley et al. (2001) により、TEM8 は炭疽菌毒素の受容体 (ANTXR1) と同一であることが明らかにされた。TEM8 は血管内皮細胞で発現していたことから、血管形成および腫瘍血管新生に関与していると考えられており、いくつかの *in vitro* および *in vivo* 実験によってそれらは明らかにされている。また、TEM8 は結腸癌以外のいくつかの腫瘍血管内皮細胞でも選択的に発現していることがわかっている (St Croix et al., 2000; Carson-Walter et al., 2001; Nanda et al., 2004)。

TEM8 は細胞外に van Willebrand factor type A (vWA) ドメイン、Ig-like ドメインを含む、1 回膜貫通ヘリックスおよび細胞質ドメインを有する type I 膜貫通型タンパクである (Deuquet et al., 2012)。また、TEM8 は vWA ドメインにおいて、metal-ion-dependent adhesion site (MIDS) ドメインを介してリガンドと結合することがわかっており、現在までに Collagen I (Col- I)、ゼラチンおよび Collagen VI (Col-VI)  $\alpha 3$  鎖 ( $\alpha 3$ ) が結合することが明らかにされている (Scobie et al., 2003; Nanda et al., 2004; Hotchkiss et al., 2005)。そのため、TEM8 は細胞外マトリックス (ECM) と相互作用することが示唆されており、Hotchkiss et al.

(2005) は TEM8 がコラーゲンを介して血管内皮細胞の遊走能を増加させることを明らかにしている。しかしながら、これら TEM8 と ECM における生理的機序は不明な点が多い。

St Croix et al. (2000) により、マウス TEM8 には 3 つの splicing variants (V1、V2、V3) が存在し、V1; long isoform、V2; medium isoform、V3; short isoform としてそれぞれのタンパクをコード化していることが明らかにされている。Long isoform は、プロリンを豊富に含んだ長鎖細胞内ドメインを持つ 564 個のアミノ酸残基からなる細胞膜貫通型タンパクである。Medium isoform は、少なくとも long isoform とは COOH 末端において 4 つのアミノ酸に違いがある短鎖細胞内ドメインを持つ 368 個のアミノ酸残基からなる細胞膜貫通型タンパクである。一方で、short isoform は膜貫通ヘリックス構造を欠いており、V1 および V2 と同一の細胞外ドメインを持つが、特有な 13 個の C 末端構造を保持した 333 個のアミノ酸残基で構成されている。Bradley et al. (2001) は V2 が炭疽菌毒素受容体であると特定しており、後の研究によって V1 も炭疽菌毒素受容体としての機能を持つが、V3 には受容体としての機能はないことが明らかにされている (Liu et al., 2003)。そのため、V1 と V2 は膜結合型タンパク (受容体型タンパク)、V3 は可溶型タンパクとして存在していることが明らかになった (Fig. 2-1)。Bonuccelli et al. (2005) は、マウス正常組織における TEM8 発現分布を検索した結果、皮膚、肺および小腸などの様々な組織で TEM8 は発現し、またそれぞれの組織における TEM8-isoform 発現が異なることを明らかにした。さらに Vargas et al. (2012) は、ヒト正常組織において新たな膜貫通型タンパクである V4 と可溶型タンパクである V5 を同定し、mRNA レベルでの組織発現分布を検索した結果、各組織において発現する TEM8 variants が異なることを明らかにした。しかしながら、現在までに、イヌにおける TEM8 発現に関する研究は報告されていない。

本章では、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現を調査するにあたり、始めに、イ



又正常組織における TEM8 発現および局在を免疫組織化学および RT-PCR 解析により検索した。さらに、各組織における TEM8-isoform 発現の分布を明らかにするために、TEM8 の共通領域を認識するポリクローナル抗体と、V1 および V4 に特異的に存在する細胞内ドメインを認識するモノクローナル抗体を使用した Western blot 解析を実施した。

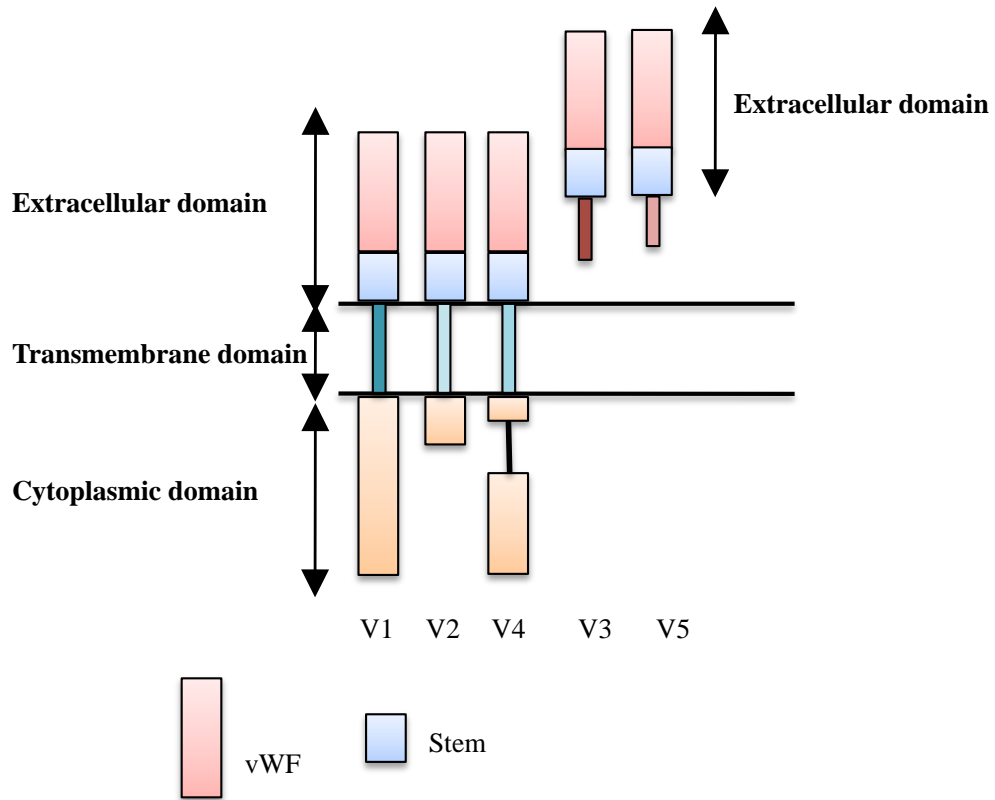


Fig.2-1. TEM8-splicing variants

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 供試動物

本研究における動物実験は全て日本獣医生命科学大学の動物実験委員会の承認(承認番号 30K-10)を得て行った。本章において、正常ビーグルイヌ(3匹)を使用した。試供動物は日本獣医生命科学大学、生命科学共同研究施設で室温 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\%\pm 10\%$ 、12:12時間の明暗周期の飼育環境で維持されていた。ペントバルビタール( $50\text{ mg/kg}$ )を静脈内投与し、安楽死を実施した後、皮膚、乳腺、肺、副腎、腎臓、膀胱、胆嚢、肝臓、膵臓、空腸、結腸、リンパ節、脾臓、骨格筋、心臓、精巣、前立腺、脳をそれぞれ採材し、10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温、24時間固定した後、定法に従いパラフィン包埋し、 $3\text{ }\mu\text{m}$ の切片を作製した。作製した切片はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および免疫組織化学的検索に用いた。また、各組織の一部をmRNAおよびタンパク解析のために液体窒素で瞬間凍結した。この凍結組織は定性的RT-PCR解析およびWestern blot解析に用いた。

### 2-2-2 免疫組織化学(Immunohistochemistry: IHC)

内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、0.01Mクエン酸緩衝液(pH 6.0)を $60^{\circ}\text{C}$ にて60分間反応させた。次に抗体の非特異的結合を防ぐため、10%正常ヤギ血清(Dako, Japan)を室温で60分間反応させた。次にTEM8の局在を調査するために、抗TEM8ウサギポリクローナル抗体(1:2,000、ab21270、Abcam、Cambridge、UK)を $4^{\circ}\text{C}$ にて一晩反応させた。続いて、ヒストファイニンシンプルスチンMAX-PO(Nichirei Biosciences、Tokyo、Japan)を室温にて30分間反応させた。最後に、DAB solution(EnVision<sup>TM</sup>+, Dako)で発色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

### 2-2-3 Total RNA 抽出、定性的 RT-PCR 解析および TOPO® TA クローニング

採取した各臓器の Total RNA は酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Chomczynski & Sacchi, 1987) を用いて抽出した。逆転写 (RT) は ReverTra Dash RT-PCR Kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、メーカーが推奨するプロトコールに従って行った。それぞれの反応には 1 µg の total RNA を使用した。定性的 RT-PCR では ReverTra Dash RT-PCR Kit (Toyobo) と Bio-Rad C1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) を使用した。定性 RT-PCR に使用したプライマーは、共通領域を認識する canine TEM8: Fw; CGTCTTAAGCGGGA、Rv; TTCCCGCTTAAG (Product 423bp) であった。Thermal cycling parameter は Activation; 95°C 1 分間、続いて Denature; 95°C 1 分間、Annealing; 60°C 1 分間、Extend; 72°C 1 分間を 35 cycle 繰り返し、最後に Elongation step; 72°C 7 分間を行った。PCR 増幅された DNA 断片は、TOPO® TA クローニングキット (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Massachusetts, USA) により ligation した後、QIAGEN-TIP プロトコール (QIAGEN, Hilden, Germany) に従って plasmid 精製を行い、シーケンス解析 (FASMAC, Kanagawa, Japan) を行った。

### 2-2-4 Western blot 解析

採取した各臓器を 0.9% NaCl で洗浄し、10% トリクロロ酢酸/0.9% NaCl を用いて 30 分間 0°C で固定し、8M 尿素/1% ジチオトレイトールおよび 2% Triton X-100 で溶解した (Frischholz et al., 1998)。タンパク質濃度は Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いた Lowry 法で測定し、10 µg の total protein を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて分離し、ポリフッ化ビニリデン・メンブラン (Millipore Corp, Bedford, MA) に転写した。メンブランを Tris 緩衝生理食塩水/0.2% Tween 20 (TBST) で洗浄し、抗体の非特異的結合を阻害するために 1% ECL blocking reagent (GE Healthcare、

Chalfont St Giles, England)/TBST を 4°C で一晩反応させた。メンブランを 3 回 TBST で洗浄し、抗 TEM8 ウサギポリクローナル抗体 (1:5,000、Abcam)、抗 TEM8 マウスモノクローナル抗体 (1:1,000、200C1339、Abcam) あるいは抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (1:500、C4、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA) を 2 時間室温で反応させた。洗浄後、メンブランを HRP-標識抗ウサギ IgG ロバ抗体 (1:5,000、GE Healthcare Bio-Sciences AB、Uppsala、Sweden) あるいは HRP-標識抗マウス IgG ヒツジ抗体 (1:5,000、GE Healthcare Bio-Sciences AB) を室温で 30 分間反応させた。プロットは ECL prime detection reagents (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 用いた化学発光によって検出した。Band density は Image J software (National Institutes of Health) を用いて評価した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 TEM8-免疫組織化学

陽性反応はすべて細胞質のみに認められ、局在の概要は Table. 2-1 に示した。

外皮: 皮膚において、表皮および毛包上皮で陽性反応が認められた (Fig. 2-2A-B)。

乳腺において、乳腺上皮細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-2C-D)。

呼吸器系: 肺において、葉気管支の多列線毛上皮、呼吸細気管支のクララ細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-2E-F、Fig. 2-3A-B)。

内分泌系: 副腎において、皮質の球状帯および束状帯で陽性反応が認められた (Fig. 2-3C-D)。

泌尿器系: 腎臓において、近位尿細管、遠位尿細管および薄壁尿細管で陽性反応が認められた (Fig. 2-3E-F、Fig. 2-4A-B、Fig. 2-4C-D)。膀胱において、移行上皮細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-4E-F)。

消化器系: 胆嚢において、粘膜上皮細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-5A-B)。肝臓において、肝三つ組隣接肝細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-5C-D)。膵臓において、外分泌細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-5E-F)。空腸および結腸において、吸収上皮細胞および腸表面上皮細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-6A-B、Fig. 2-6C-D)。

リンパ器官: リンパ節において、陽性反応は認められなかった (Fig. 2-6E-F)。脾臓において、陽性反応は認められなかった (Fig. 2-7A-B)。

筋組織: 骨格筋、心筋および平滑筋において、それぞれの筋細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-7C-F、Fig. 2-8A-B)。

生殖器系: 前立腺において、粘液細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-8C-D)。精巣において、間質細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-8E-F)。

神経系: 大脳皮質において、神経細胞で陽性反応が認められた (Fig. 2-9A-B)。

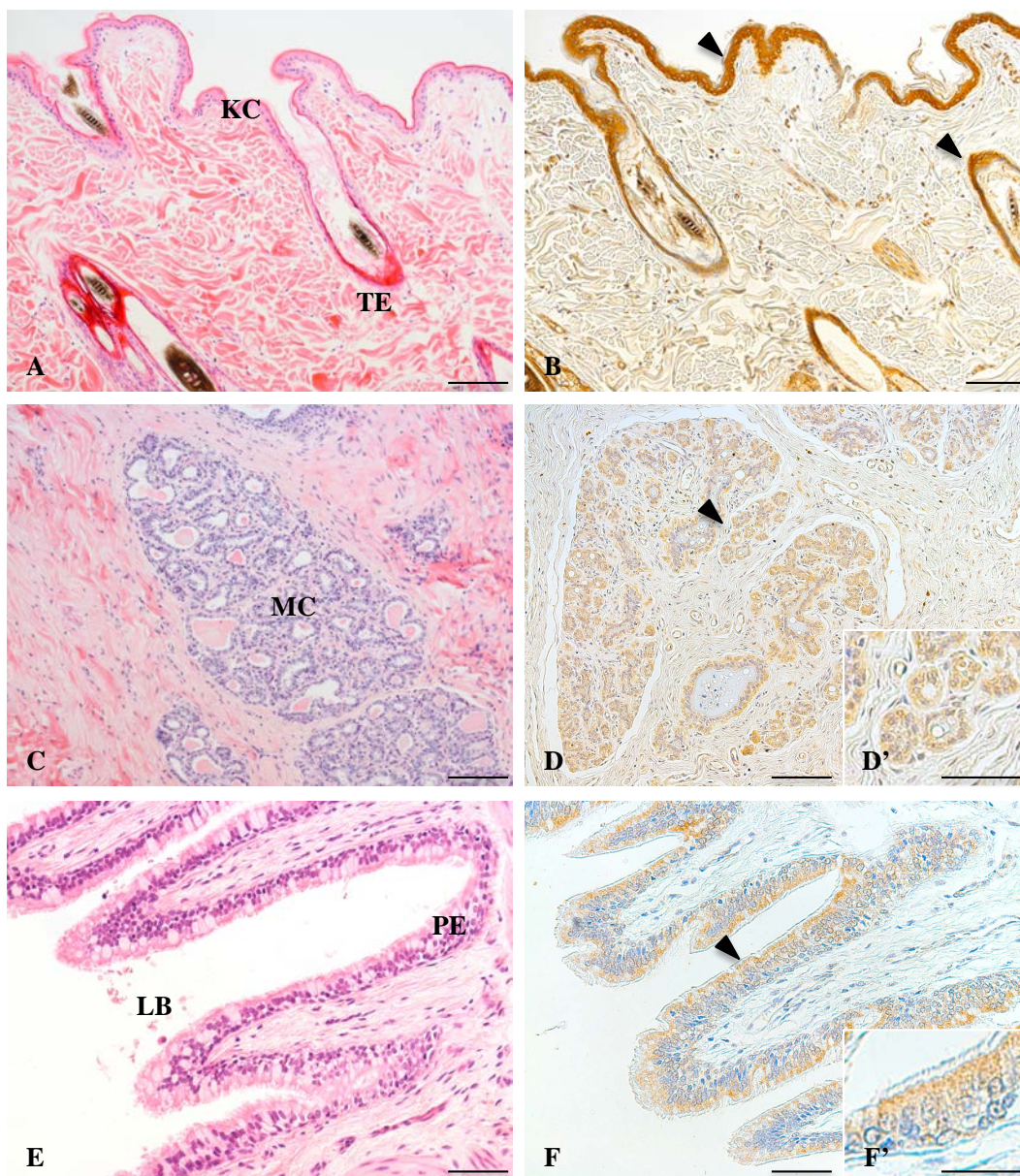


Fig. 2-2. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

皮膚; (A) HE, (B) TEM8-IHC; 角化細胞 (KC) および毛包上皮細胞 (TE) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。乳腺; (C) HE, (D) TEM8-IHC, (E') 高倍率; 乳腺上皮細胞 (MC) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。肺; (E) HE, (F) TEM8-IHC, (F') 高倍率; 葉気管支 (LB) の多列線毛上皮細胞 (PE) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50 $\mu$ m、D', F': Scale bars = 25 $\mu$ m

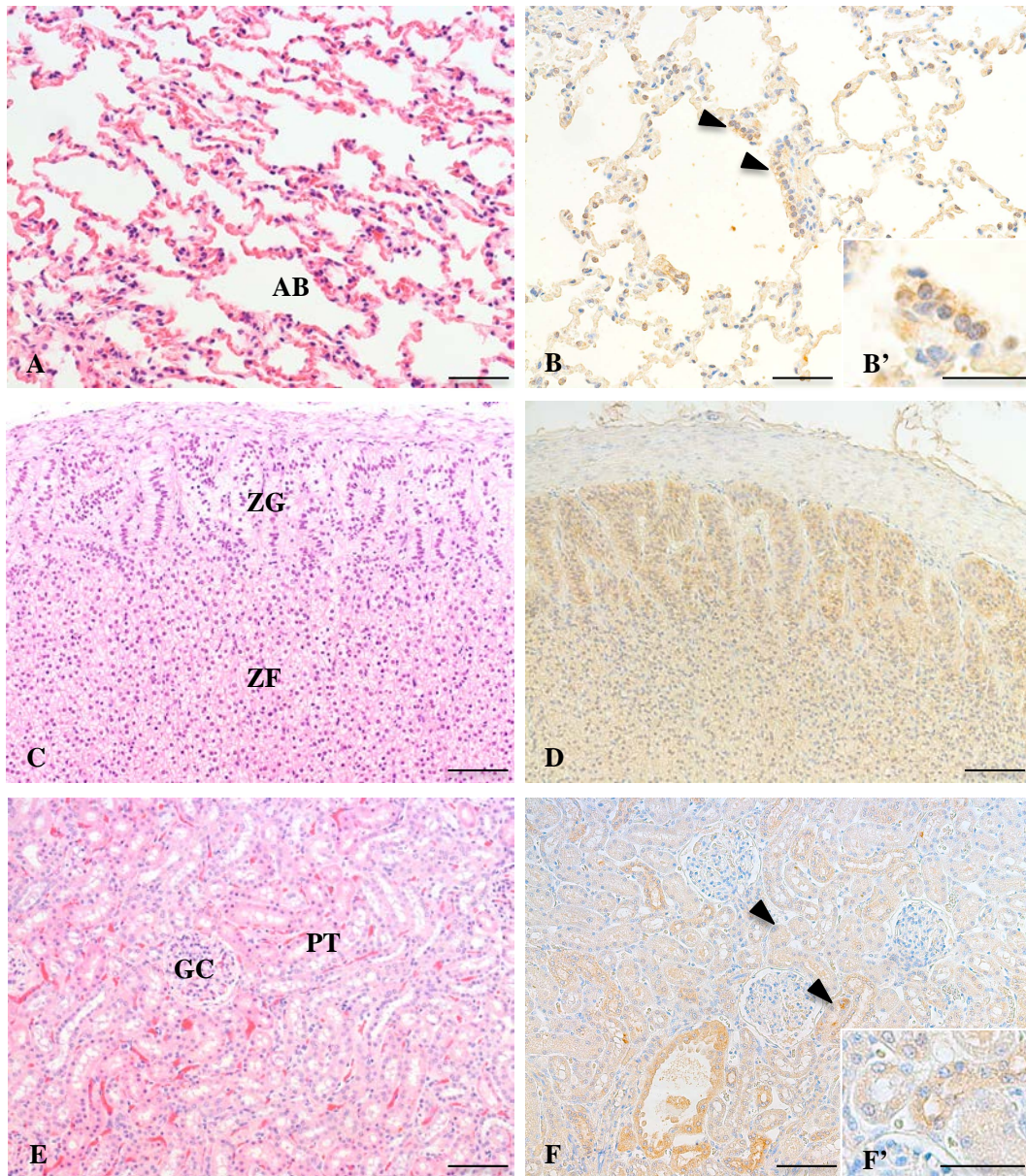


Fig. 2-3. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

肺; (A) HE, (B) TEM8-IHC, (B') 高倍率; 呼吸細気管支 (AB) のクララ細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。副腎; (C) HE, (D) TEM8-IHC, (F') 高倍率; 球状帯 (ZG) および束状帯 (ZF) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。腎臓; 近位尿細管 (PT) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', F': Scale bars = 25 $\mu$ m GC; 糸球体



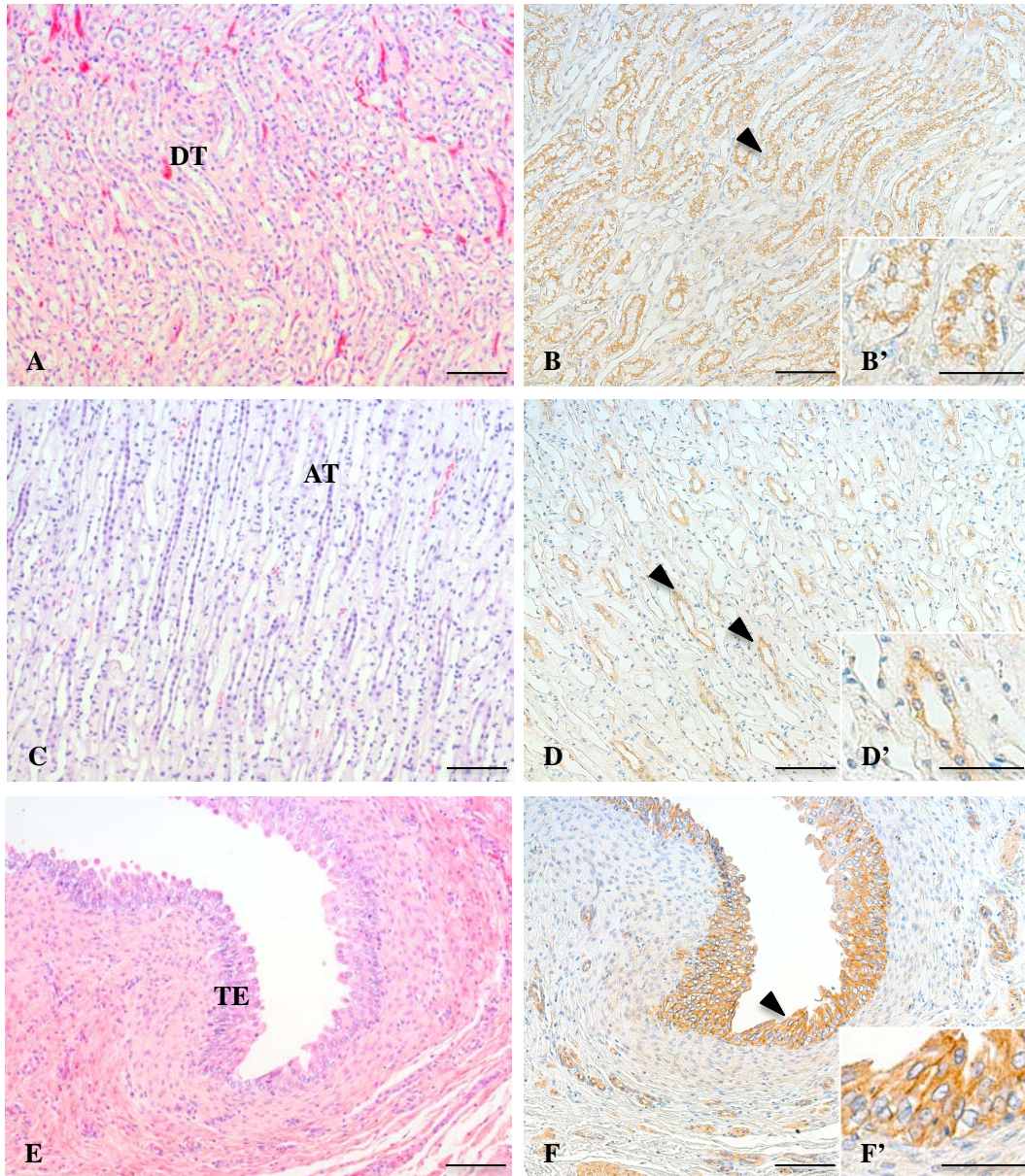


Fig. 2-4. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

腎臓; (A,C) HE, (B,D) TEM8-IHC, (B', D') 高倍率; 遠位尿細管 (DT) および薄壁尿細管 (AT) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められた。膀胱; (E) HE, (F) TEM8-IHC, (F') 高倍率; 移行上皮細胞 (TE) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められた。A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', D', F': Scale bars = 25 $\mu$ m

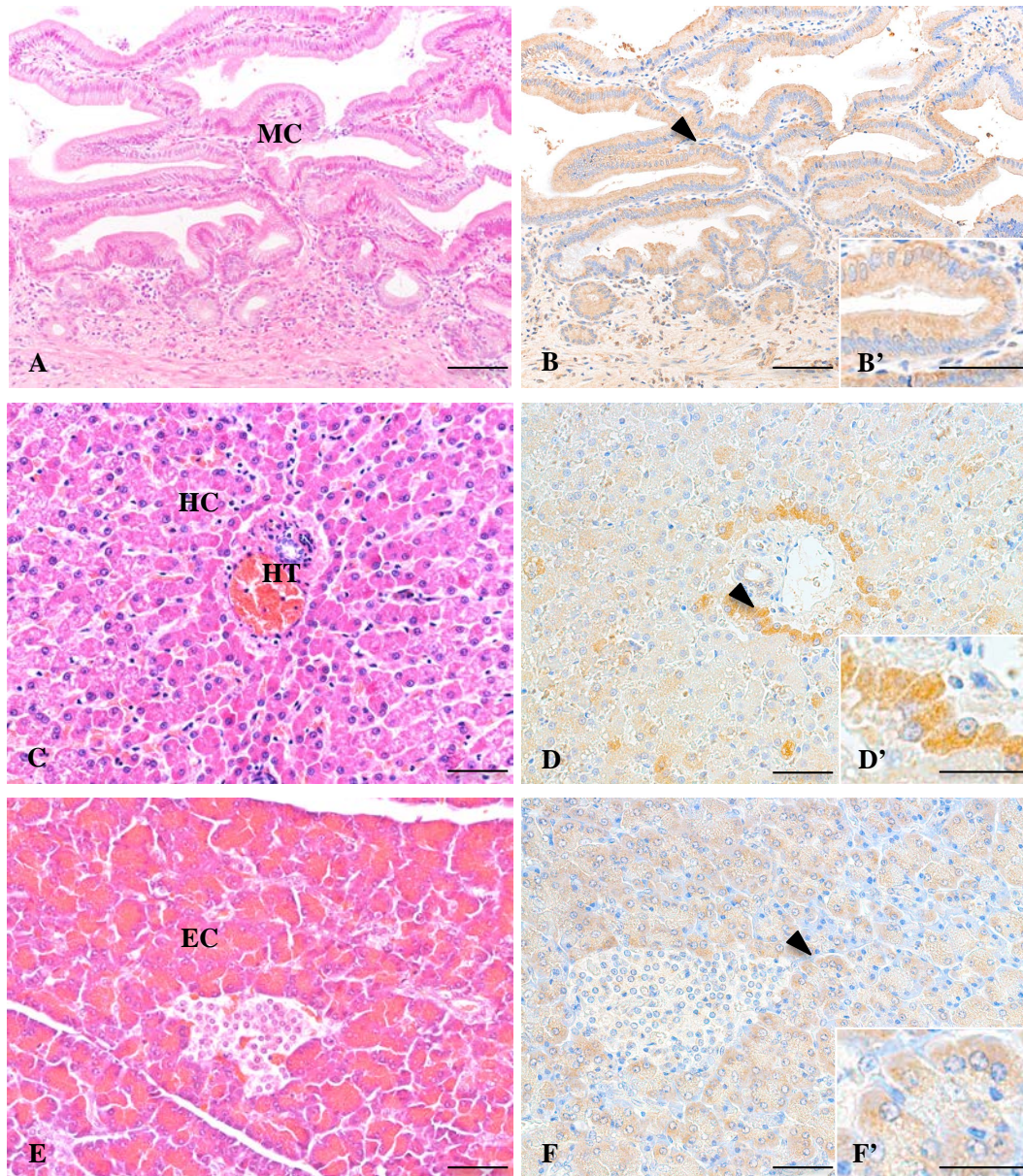


Fig. 2-5. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

胆嚢; (A) HE, (B) TEM8-IHC, (B') 高倍率; 粘膜上皮細胞 (MC) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。肝臓; (C) HE, (D) TEM8-IHC, (D') 高倍率; 肝三つ組 (HT) 周囲の肝細胞 (HC) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。膵臓; (E) HE, (F) TEM8-IHC, (F') 高倍率; 膵外分泌細胞 (EC) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', D', F': Scale bars = 25 $\mu$ m

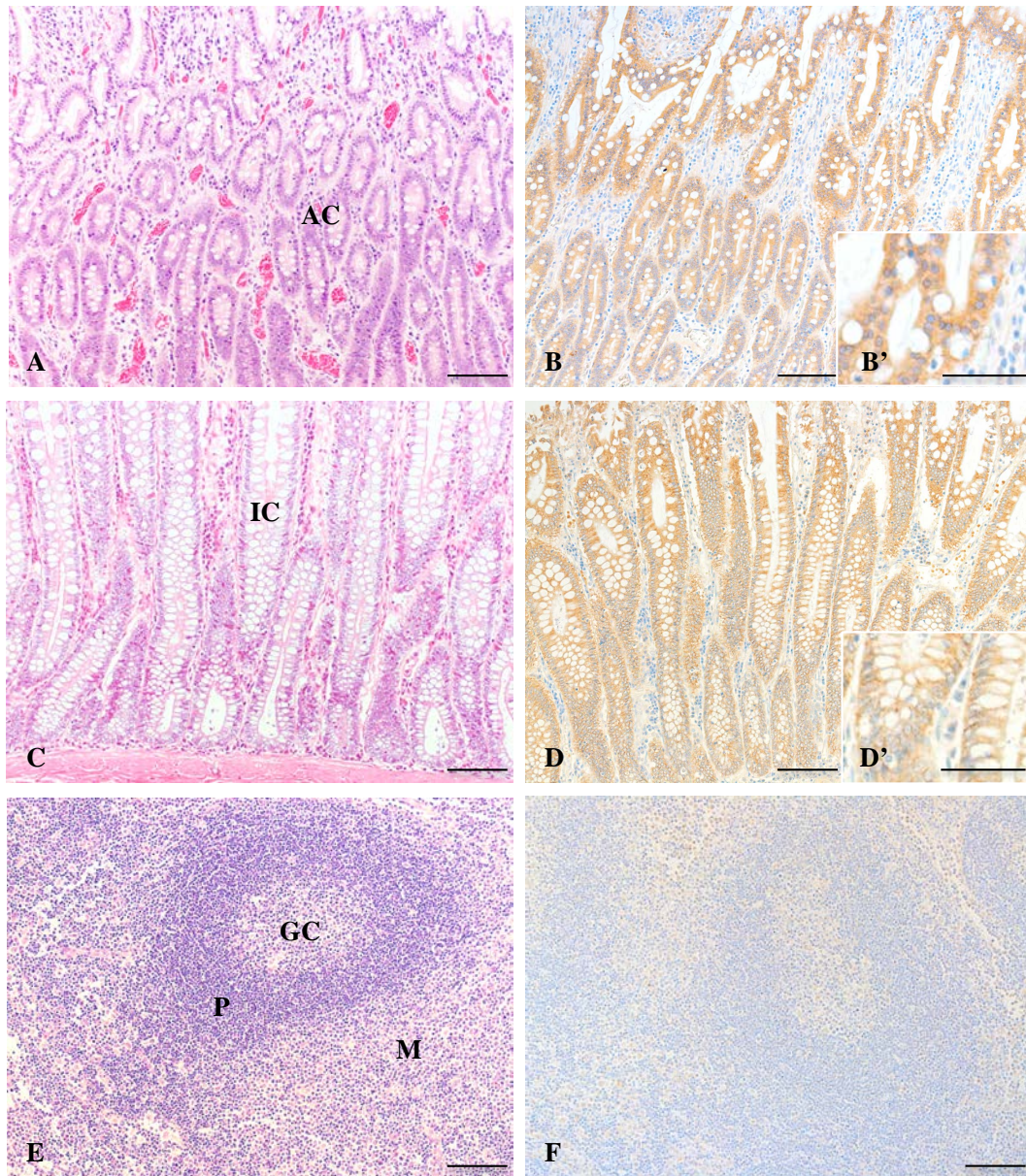


Fig. 2-6. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

空腸; (A) HE, (B) TEM8-IHC, (B') 高倍率; 吸収上皮細胞 (AC) の細胞質において、陽性反応が認められる。結腸; (C) HE, (D) TEM8-IHC, (D') 高倍率; 腸表面上皮細胞 (IC) の細胞質において、陽性反応が認められる。リンパ節; (E) HE, (F) TEM8-IHC; 陽性反応は認められない。GC; 胚中心、P; 傍皮質、M; 髄質

A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', D': Scale bars = 25 $\mu$ m

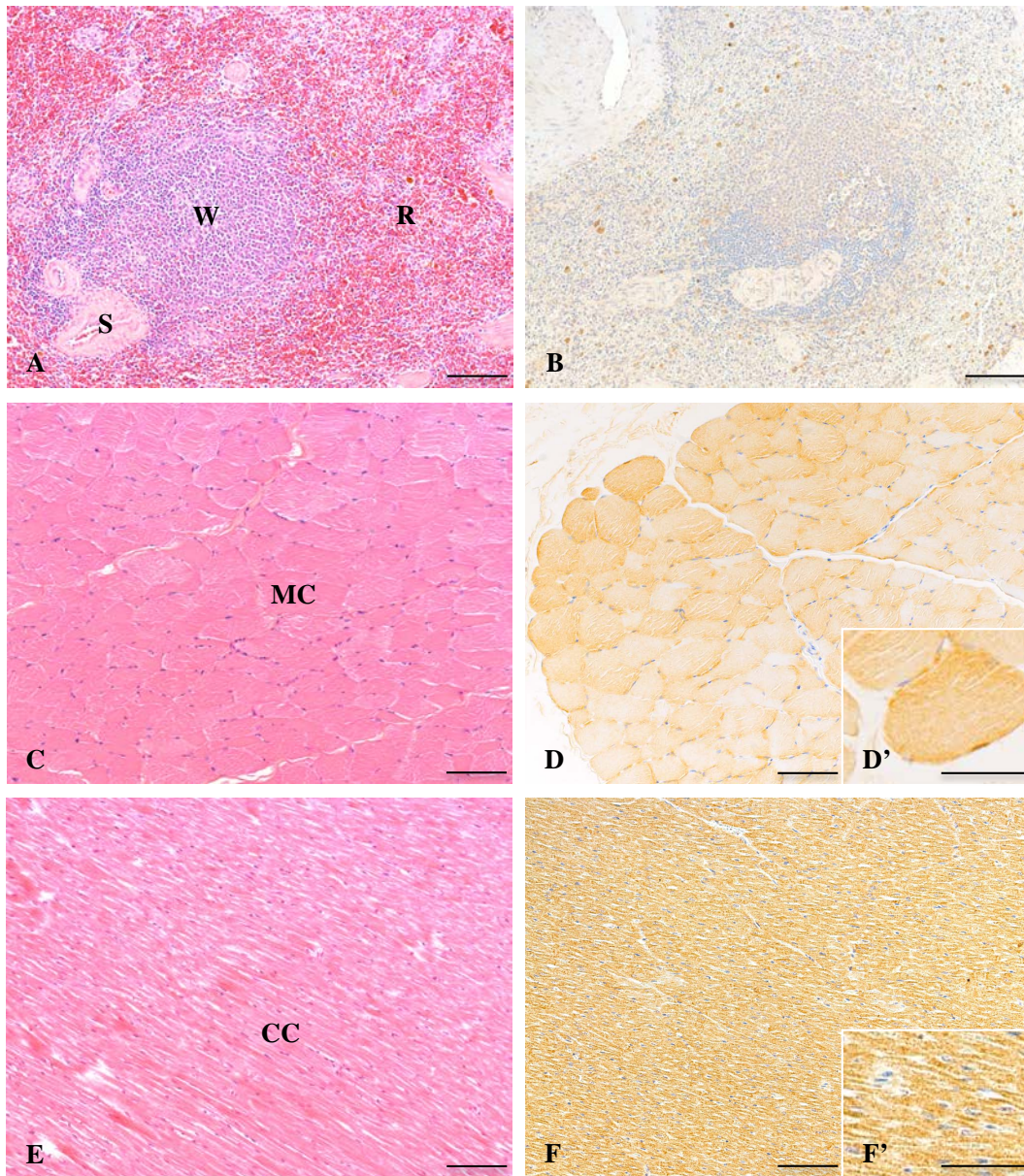


Fig. 2-7. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

脾臓; (A) HE, (B) TEM8-IHC; 陽性反応は認められない。骨格筋; (C) HE, (D) TEM8-IHC, (D') 高倍率; 骨格筋細胞 (MC) の筋形質において、陽性反応が認められる。心筋; (E) HE, (F) TEM8-IHC, (F') 高倍率; 心筋細胞 (CC) の筋形質において、陽性反応が認められる。A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50 $\mu$ m、D', F': Scale bars = 25 $\mu$ m、W; 白脾髄、R; 赤脾髄、S; 莢動脈

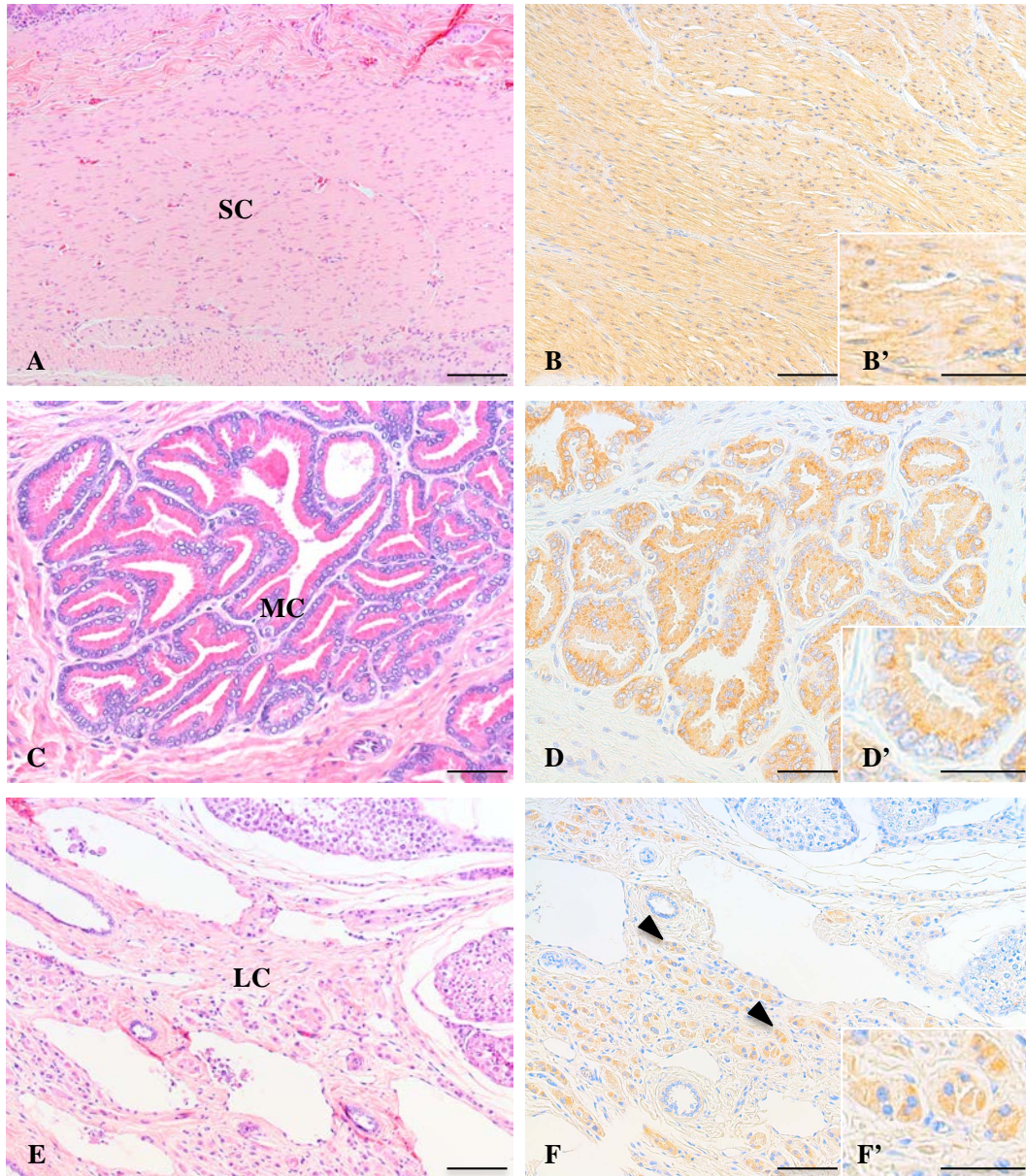


Fig. 2-8. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

平滑筋; (A) HE, (B) TEM8-IHC, (B') 高倍率; 平滑筋細胞 (SC) の筋形質において、陽性反応が認められる。前立腺; (C) HE, (D) TEM8-IHC, (D') 高倍率; 粘液細胞 (MC) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。精巣; (E) HE, (F) TEM8-IHC, (F') 高倍率; ライディッヒ細胞 (LC) の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B, C, D, E, F: Scale bars = 50µm、B', D', F': Scale bars = 25µm

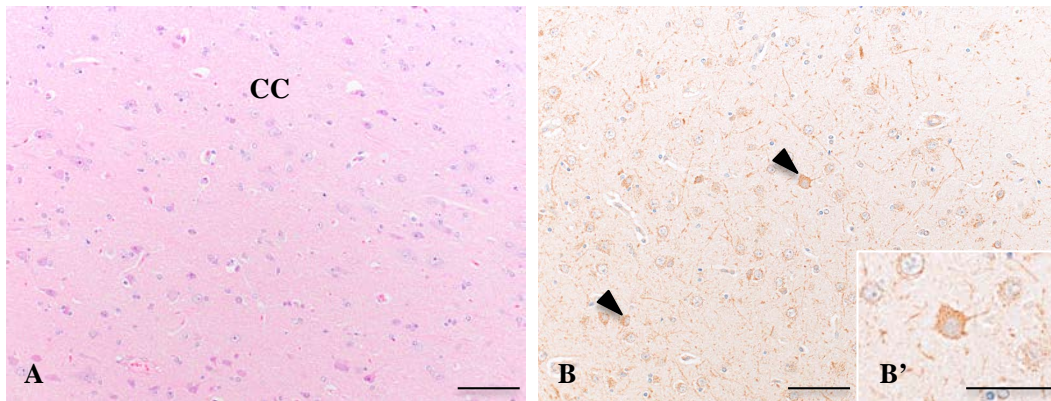


Fig. 2-9. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

脳; (A) HE, (B) TEM8-IHC, (B') 高倍率; 大脳皮質 (CC) の神経細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B: Scale bars = 50 $\mu$ m、B': Scale bars = 25 $\mu$ m

Table. 2-1. Summary of TEM8-tissue distribution

<i>Tissue Type</i>	<i>Distribution</i>
Skin	Keratinocyte and Hair follicle epithelium
Mammary gland	Mammary gland epithelial cells
Lung	Pseudostratified ciliated epithelium and Clara cells
Adrenal gland	Cortex; zona glomerulosa, zona fasciculata
Kidney	Proximal tubules, Distal tubules and Attenuated tubules
Bladder	Transitional epithelial cells
Gallbladder	Mucosal epithelial cells
Liver	Hepatocytes around hepatic triad
Pancreas	Pancreatic exocrine cells
Jejunum	Absorptive epithelial cells
Colon	Intestinal superficial epithelial cells
Lymph node	None
Spleen	None
Skeletal muscle	Skeletal muscle cells
Heart muscle	Cardiac muscle cells
Smooth muscle	Smooth muscle cells
Prostate gland	Mucous cells
Testis	Leydig cells
Brain	Nerve cells

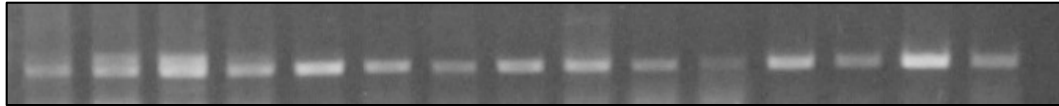
### 2-3-2 TEM8-定性的 RT-PCR 解析および PCR 増幅 DNA 断片シーケンス解析

今回検索に用いた全組織、すなわち前立腺、腎臓、肺、精巣、副腎、リンパ節、骨格筋、胃、心臓、空腸、結腸、甲状腺、肝臓、脾臓および乳腺において、*TEM8* mRNA 発現が認められた。また、PCR 増幅 DNA 断片シーケンス解析により、*Homo sapiens anthrax toxin receptor 1; mRNA* (BLAST; BC012074) と 91%の同一性であることが確認された (Fig. 2-10)。

### 2-3-3 TEM8-isoform Western blot 解析

我々は、イヌ正常組織における *TEM8*-isoform 発現を検索するために、*TEM8* の共通領域を認識するウサギポリクローナル抗体 (*TEM8*-pAb) と、V1 および V4 に特異的に存在する細胞内ドメインを認識するマウスモノクローナル抗体 (*TEM8*-mAb) を使用して、Western blot 解析を行った。*TEM8* は使用した全ての組織で発現を示し、また各組織において異なる *TEM8*-isoform 発現を示していた (Fig. 2-11、Table. 2-2)。Long isoform (97kDa) は主に、乳腺、腎臓、膀胱、胆嚢および脳で発現していた。一方で、medium isoform (66kDa) は主に、皮膚、乳腺、胆嚢、肝臓および脾臓で発現していた。最後に、short isoform (45kDa) は副腎、腎臓、骨格筋、心臓、精巣および脳で顕著に発現していた。





PG KD LG TS AG LN SM ST HT JJ CO TR LV SP MG

PCR-product sequence (423 bp)

ACGACGTGGTGACCTTACTTTAGAT  
 AATGAAACACCTTGTCAACCGAGTA  
 TTTAAGTAGTCGGGTGTCGATTCTTA  
 CAGGAAATAACAGAAGAGATGTGCT  
 CCTTGATGGGAGTACTTCGACTGGC  
 TTCTGGCCCTTGTCTAAGCAGTCCC  
 GGATCTCCTCGACGTCTTCCAGGAC  
 GGCCCTCCTCTGTGAATGTACGTAC  
 TTCTTAAACTTTCCCGGTCGCTCGTC  
 TAAATAATACTTTTGTCAAGTTCCTAT  
 GTCCTGCCGGTTCGACAGTAGTAACGA  
 GACTGGCTACCCCTCGAGGTACTTC  
 TGGAGAAAAGATAAGTCTCTCCCT  
 CCGATTGTCTAGGGCTCTAGAACCA  
 CGTTAACAATGACACAGCCACACT  
 TCCTAAAGTTACTTTTGTGTCGACCG  
 GGCCTAACGCCTGTCAATTC

```
>BC012074|BC012074.1 Homo sapiens anthrax toxin receptor 1, mRNA
(cDNA clone MGC:19967 IMAGE:4563020), complete cds.
Length = 2112

Score = 539 bits (272), Expect = e-149
Identities = 386/424 (91%)
Strand = Plus / Minus

Query: 108 tccttactgtcgcgaatccggccagctgtttcattgaaatccttacaccgacacag 167
Sbjct: 699 tccttactgtcgcgaatccggccagctgttctcattgaaatccttacaccaacacag 640

Query: 168 taacaattgcaccaagatctcgggtctgttagcctcctctgaatagaasaagagg 227
Sbjct: 639 taacaattgcaccaagatctcgggtctgttagcctcctctgaatagaasaagagg 580

Query: 228 tcttcattggagctcccccagtcagagcagcagctgagcgtgagcgtctgtatctga 287
Sbjct: 579 tcttcattggagctcccccagtcagagcagcagctgagcgtgagcgtctgtatctga 520

Query: 288 ctgtttcataaataactcgtcgtcgtcccttcaaatcctcatgcatgaagtgtct 347
Sbjct: 519 ctgtttcataaataactcgtcgtcgtcccttcaaatcctcatgcatgaagtgtct 460

Query: 348 cctcccgccaggacctctgagcctccttaggcctcagcaatctgtcccggtctcg 407
Sbjct: 459 cctcccgccaggacctctgagcctccttaggcctcagcaatctgtcccggtctcg 400

Query: 408 gtcagctcatgagggtagtctcctcgtgtagagaagacaataaaggacattctagctgt 467
Sbjct: 399 gtcagttcattaaggtgttctcgggtgagaasaacaataaaggacattctcaactgt 340

Query: 468 gggctgatgaattatgagccaactgttccacasagtaataagattccagtggtgc 527
Sbjct: 339 gggctgatgaattatgagccaactgttccacasagtaataagattccagtggtgc

Query: 528 agca 531
Sbjct: 279 agca 276
```

Fig. 2-10. イヌ正常組織における *TEM8* mRNA発現および PCR増幅DNA断片シーケンス解析

前立腺 (PG)、腎臓 (KD)、肺 (LG)、精巣 (TS)、副腎 (AG)、リンパ節 (LN)、骨格筋 (SM)、胃 (ST)、心臓 (HT)、空腸 (JJ)、結腸 (CO)、甲状腺 (TR)、肝臓 (LV)、脾臓 (SP)、乳腺 (MG) において、*TEM8* mRNA発現が認められる。PCR増幅DNA断片のシーケンス解析を行ったところ、ヒト anthrax toxin receptor 1 (BC012074) と91%の同一性であることが確認された。

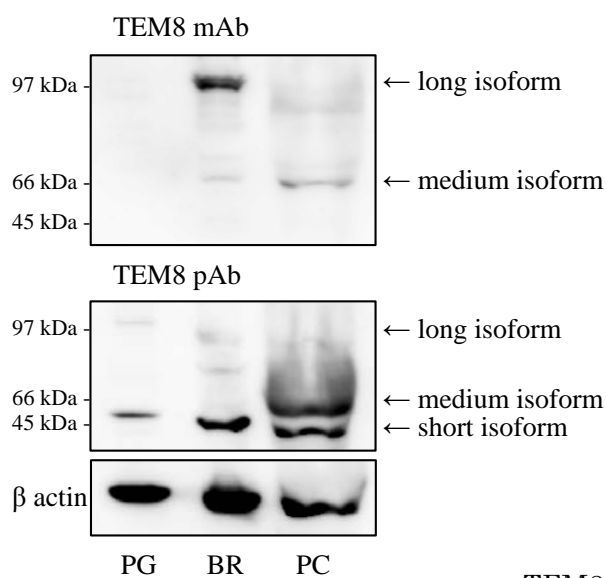
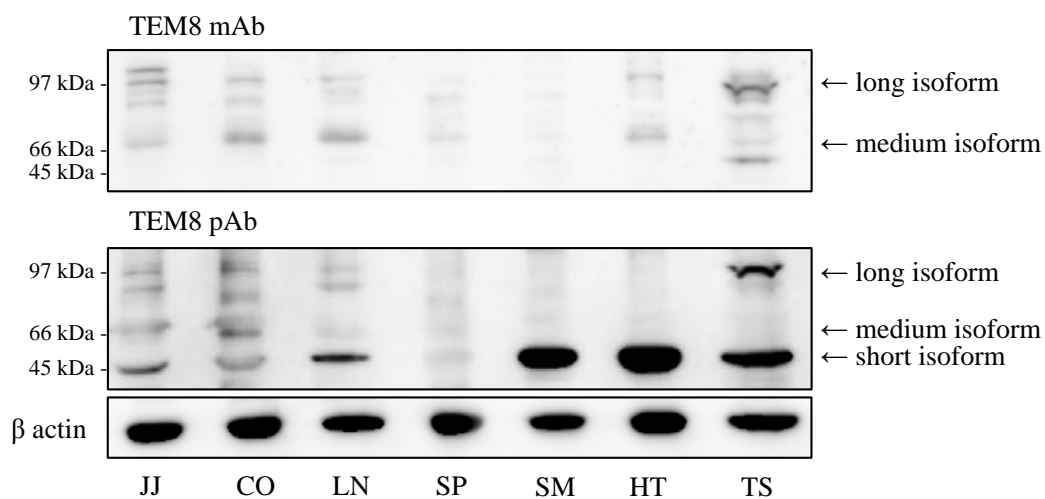
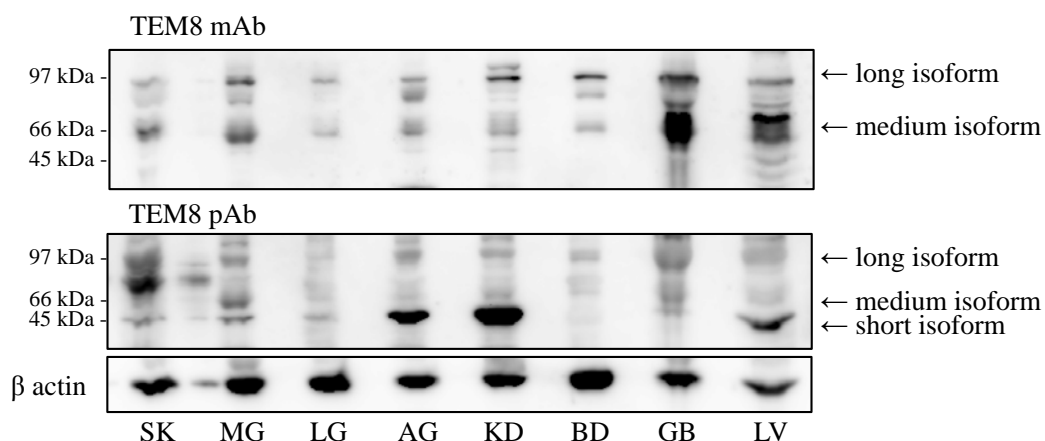


Fig.2-11. イヌ正常組織におけるWestern blot解析

TEM8 mAbおよびpAbの2種類の抗体を使用し、TEM8-isoform発現解析を行った。各組織において、異なるTME8-isoform発現パターンを示していた。

SK; 皮膚、MG; 乳腺、LG; 肺、AG; 副腎、KD; 腎臓、BD; 膀胱、GB; 胆嚢、LV; 肝臓、JJ; 空腸、CO; 結腸、LN; リンパ節、SP; 脾臓、SM; 骨格筋、HT; 心臓、TS; 精巣、PG; 前立腺、BR; 脳、PC; 膵臓

TEM8 mAb; 抗TEM8-モノクローナル抗体  
TEM8 pAb; 抗TEM8-ポリクローナル抗体

Table. 2-2. Summary of tissue-specific expression of TEM8 isoforms

<i>Tissue Type</i>	<i>TEM8 Isoform Prevalence</i>
Skin	Medium > long and short
Mammary gland	Long and medium > short
Lung	Long and medium > short
Adrenal gland	Short > long and medium
Kidney	Short > long and medium
Bladder	Long > medium
Gallbladder	Long and medium
Liver	Medium and short > long
Jejunum	Long, medium and short
Colon	Long, medium and short
Lymph node	Short > long and medium
Spleen	None
Skeletal muscle	Short
Heart	Short > long and medium
Testis	Long and short > medium
Prostate gland	Short
Brain	Long and short
Pancreas	Medium and short

## 2-4 考察

今回使用した全てのイヌ正常組織において、*TEM8* mRNA 発現が認められた。また、*TEM8*-免疫組織化学染色では、血管内皮以外でも発現していることが明らかとなった。*TEM8* は血管内皮および腫瘍血管内皮で発現していることから、血管新生に関与していることが示唆されているが、その他の生理的機能に関する詳細は十分に解明されていない (St Croix et al., 2000; Nanda et al., 2004)。マウス正常組織における *TEM8* 発現を検索した研究により、*TEM8* は血管内皮以外にも皮膚、肺および小腸などの様々な組織の上皮系組織で発現していることが明らかになっていることから、血管新生以外の機能を有する可能性も考えられている (Bonuccelli et al. 2005)。*TEM8* は Integrin  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha m$  および  $\alpha x$  と同様に、細胞外領域ににおいて vWA ドメインを有し、Col- I および Col-VI などの細胞外マトリックスとの結合に関与しているとされている (Scobie et al., 2003; Nanda et al., 2004; Hotchkiss et al., 2005)。また、Werner et al. (2006) により *TEM8* は Integrin 様接着分子としての機能を有することが明らかにされており、Col- I とアクチン細胞骨格を介して、アクチン依存性細胞伸長を調節しているがわかっている。このことから、*TEM8* は vWA ドメインを介して ECM との相互作用を示すことで、細胞間接着に関与している可能性が考えられる。

本章では 2 種類の抗体を使用することで、各組織における *TEM8*-isoform 発現の分布も明らかとなった。以前の研究で示された *TEM8*-Western blot 解析では、分子量の違いにより 3 つの isoform を識別し、80~85 kDa が long isoform (V1)、~60 kDa が medium isoform (V2)、45 kDa が short isoform (V3) として検索されていた (Bonuccelli et al., 2005)。本研究において使用した *TEM8*-pAb は、イヌにおいて 3 つの isoform を認識することが明らかとなった。また、V1 および V4 の細胞内ドメインを特異的に認識する *TEM8*-mAb を使用した Western blot 解析を行った結

果、TEM8は80~85 kDa および ~60 kDa で有意な免疫反応を示すことが明らかとなった。TEM8-isoformに関する報告では、V4はV1と比較して細胞内ドメインのリン酸化部位が欠損しているのみであるのに対し、V2の細胞内ドメインはV1と比較し、極端に短いことがわかっている (Vargas et al., 2012)。また、V2のアミノ酸残基は368個であり、V1(564個)よりもV3(333個)に近く、タンパクの分子量から推測しても、V4はV2よりもV1に近いタンパク構造であると考えられる。さらにTEM8-pAbで有意な免疫反応を示した~60 kDaは、TEM8-mAbで認められたものと一致していた。このことから、本研究において認められた long isoformはV1、medium isoformはV2およびV4、short isoformはV3およびV5を認識していると考えられた。V1とV4の構造的違いはリン酸化の有無であるが、この違いによる影響としては、V4の炭疽菌毒素受容体としての機能欠損が挙げられる。V1は毒素が結合することでリン酸化およびエンドサイトーシスを示し、その結果、受容体と毒素が結合した状態で細胞内に取り込まれると考えられている (Bonuccelli et al., 2005; Friebe et al., 2016)。しかしながら、V4にはリン酸化部位が存在しないため、受容体として機能する可能性は低いと考えられる。また、Bradley et al. (2001)はV2が炭疽菌毒素受容体としての機能を有することを示していることから、本研究により示された3つのバント (long、medium、short isoform)のうち、long isoform (V1)は受容体として機能する膜結合型、short isoform (V3、V5)は可溶性因子として機能する可溶型と考えられた。またmedium isoformには、膜結合型の中で、受容体として機能するV2および非受容体と考えられるV4が含まれていると考えられた。今後、medium isoformとして認識されたV2とV4を識別することが、TEM8のより詳細な組織分布および機能を解明する上で必要であると考えられる。

今回、イヌ正常組織におけるTEM8-isoform発現パターンは、組織によって優位に発現するisoformが異なっていた。このため、TEM8は腫瘍内における血管新生

や炭疽菌毒素受容体としての機能に加えて、広範囲な組織で重要な作用を担っているものと考えられた。また、乳腺においては、TEM8の発現は乳腺上皮細胞に限局し、受容体として機能する膜結合型 (long、medium isoforms) と可溶性因子として機能する可溶型 (short isoform) がともに優位に発現していることが明らかとなった。さらに、管腔型の器官で膜結合型 TEM8 が優位に、充実型の器官で可溶型 TEM8 が優位に発現する傾向が認められた。現在、可溶型 TEM8 の機能は明らかではないが、可溶型 TEM8 は膜結合型 TEM8 の細胞外ドメインと同じ構造を持つことから、デコイ受容体として機能している可能性が推測される。このため、各組織において、可溶型と膜結合型の割合を変化させることによって膜結合型 TEM8 の受容体としての機能を制御しているのかもしれない。

本研究において、TEM8-isoform のそれぞれの機能を明らかにすることはできないが、組織間でその発現を変化させるという事実は、TEM8 が組織形態分野において重要な役割を担っていることを暗に意味している。今後、TEM8-isoform の機能解析を進めることは、各組織における形態変化を解明する上で必要であると考えられた。

## 第3章

### ラット成長過程の乳腺組織における TEM8 の発現

#### 3-1 小序

乳腺は、発生学的に汗腺が変形したものと考えられている。まず始めに、乳腺は汗腺と同様に表皮の基底層が間葉領域に向かって増殖する。乳腺の原基（乳腺堤、mammary ridge）は、腋窩から鼠径部かけて表皮の線状増殖として出現し、いかなる哺乳類でも全て同様に認められる。乳腺堤はレンズ状に肥厚し、数珠玉状に連なるが、やがて数珠玉をつなぐ堤の部分が消失することで独立した乳点（milk point）を形成するようになる。各乳点から、表皮がコンベル状に一次突起としての上皮索を形成した後、間葉組織に下降する。その途中で乳槽となる膨らみを形成し、次いで二次突起が分枝して、さらなる分枝を重ねることで終末部を形成する。上皮索は、近位部において乳頭管、乳槽（乳頭洞）、乳管そして乳小管に分枝する。終末部は、胎生期および生後間もない時期において腺房を形成せず、単なる上皮細胞塊として存在する。乳腺芽は、乳腺形成初期においては表皮の窪みとして存在しているが、やがてその部分の表皮の基底層が増殖して盛り上がり、間葉とともに隆起することで乳頭を形成するようになる（Eguchi, 2006）。

出生後、乳腺の発達は細胞増殖や ECM リモデリングが集中的に生じることで、乳腺上皮が乳腺脂肪体へと伸展し、管状形態を形成するようになる（Russo et al., 1996）。この過程において、細胞成長、増殖、浸潤、分枝、遊走、アポトーシスといった一連の形態学的変化が認められるようになり、乳腺は数週間で分化するようになる（Howlin et al., 2006）。乳腺の発達は、春機発動と同時に、エストロゲンや成長ホルモンの増加に伴い細胞分裂が促進されることで、末梢芽状突起（Terminal

end buds; TEBs) が形成されることから始まる。TEBs は小導管の伸長や分枝を引き起こす高度な増殖能を有する未分化な上皮細胞を含んでおり、充実あるいは半充実な未分化上皮細胞の球状塊となっている (Masso-Welch et al., 2000)。この上皮細胞集塊は、薄いコラーゲン性基質層により脂肪体と境界を保っている (Imagawa et al., 2002; Howlin et al., 2006; Sakakura et al., 2013)。TEBs は 2 週齢で形成され、その数は 21-28 日齢で最大数に達する (Hughes et al., 1990)。TEBs は 2 つの小導管あるいは胞状腺芽 (Alveolar buds; ABs) へと分枝し、ABs は形態学的に TEBs よりも分化した構造物として考えられている (Forsyth et al., 1986; Masso-Welch et al., 2000; Russo et al., 2000)。TEBs が乳頭領域から乳腺脂肪体と呼ばれる前脂肪細胞、脂肪細胞あるいは線維芽細胞の集団辺縁に到達すると、それらは退行するようになる。さらなる側枝の発生は、成熟乳腺でのプロゲステロンシグナルに続くエストロゲンサイクルにより既に形成されている小導管から生じ、TEBs から生じるものではないとされている (Paine et al., 2017)。その後、ABs を形成する乳腺上皮は、プロゲステロンやプロラクチンなどの系統的なホルモン刺激により、急速に増殖を始めるようになる (Brisken et al., 2002)。妊娠期において、分化した ABs を形成する細胞は細胞分裂を起こし、乳タンパクや細胞質への脂肪滴産生といった腺房の分泌機能を有するようになる。出産に伴うプロラクチン産生と、それに続く急速なプロゲステロン産生の低下により、それら細胞は乳タンパクや乳脂肪球皮膜を内腔へと活発に分泌するようになる (McManaman & Neville, 2003; Oakes et al., 2008)。その後、離乳に伴い、分化した ABs を形成する細胞の多くはアポトーシスを起こし、マクロファージや一部の残存した乳腺上皮細胞により乳腺から除去される (Monks et al., 2005; Monks et al., 2008)。乳腺は“退行”という過程を通して、*virgin-like* の形態へと変化するようなりモデリングを行うことで、ABs の分化-分泌-退行の過程が繰り返し生じることを可能としている。

第 2 章において、TEM8 は乳腺をはじめ広範囲な組織で発現し、組織によって優



位に発現する isoform が異なっていた。乳腺では受容体として機能する膜結合型 (long、medium isoforms) と可溶性因子として機能する可溶型 (short isoform) がともに発現していることが明らかとなった。また、乳腺における TEM8 発現は乳腺上皮細胞に限局し、乳腺の上皮形態維持に関与することが示唆された。

本章では、乳腺の成熟過程における TEM8 発現の変化を明らかにするために、生後 1 日目から性成熟後まで、および授乳期のラットの乳腺組織における TEM8 の発現の変化を免疫組織化学的に検索した。さらに、乳腺上皮の形態形成において、luminal 細胞への分化に関与するとされる Notch-1 および乳腺の管腔形成に関与するとされる c-MET の発現を同時に検索することで、乳腺の成熟における TEM8 発現の関連を調査した。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 試供動物

本研究における動物実験は全て日本獣医生命科学大学の動物実験委員会の承認 (承認番号 28J-52) を得て行った。本章において、未経産の生後 1 日齢、3 週齢、4 週齢、8 週齢および、出産後 1 日目、2、4 週目の生後 4 ヶ月齢 (各 3 匹ずつ)、計 21 匹の Wister 雌ラットを使用した。試供動物は日本獣医生命科学大学、生命科学共同研究施設で室温  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\% \pm 10\%$ 、12:12 時間の明暗周期の飼育環境で維持されていた。ペントバルビタール ( $50 \text{ mg/kg}$ ) を腹腔内投与後、左心室を介して生理食塩水を灌流させ、続けて 4%パラホルムアルデヒド /  $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液 (PB、pH 7.4) を用いて灌流固定を行った。乳腺を周囲の脂肪組織とともに速やかに採取し、同固定液を用いて、 $4^{\circ}\text{C}$ にて 24 時間浸漬固定した。この材料は定法に従いパラフィン包埋し、 $3 \mu\text{m}$  の切片を作製した。作製した切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学的検索に用いた。

### 3-2-2 免疫組織化学

内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を 60°C にて 60 分間反応させた。次に抗体の非特異的結合を防ぐため、10% 正常ヤギ血清 (Dako) (for TEM8、c-MET)、Block Ace (Snow Brand Milk Products Co., Tokyo, Japan) (for Notch-1) を室温で 60 分間反応させた。次に第 2 章でも使用した抗 TEM8 ウサギポリクローナル抗体 (1:2,000、Abcam)、抗 c-MET マウスモノクローナル抗体 (1:300、B-2、Santa Cruz Bio.)、抗 Notch-1 ヤギポリクローナル抗体 (1:100、sc-6014、Santa Cruz Bio.) を 4°C にて一晩反応させた。続いて、ヒストファインシンプルシステイン MAX-PO および MAX-PO (G) (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を室温にて 30 分間反応させた。最後に、DAB solution (EnVision™+, Dako) で発色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 TEM8-免疫組織化学

生後 1 日齢における乳腺上皮に、陽性反応は認められなかった (Fig. 3-1B)。しかし、生後 8 週齢において、乳腺は急速に成熟を開始すると同時に、乳腺上皮で陽性反応が認められた (Fig. 3-2B)。その後、出産後 1 日目および 2 週目の乳腺は顕著な乳汁産生を示すようになり、乳腺上皮において陽性反応は継続して認められた (Fig. 3-3B、Fig. 3-4B)。また、出産後 4 週目での退行した乳腺においても、乳腺上皮で陽性反応は認められた (Fig. 3-5B)。

#### 3-3-2 Notch-1-免疫組織化学

生後 1 日齢において、TEM8 と同様に、乳腺上皮に陽性反応は認められなかった (Fig. 3-1C)。生後 8 週齢において、発育した乳腺上皮の細胞質で陽性反応が認められた (Fig. 3-2C)。その後、出産後 1 日目および 2 週目の拡張した乳腺の乳腺上皮の細胞質で陽性反応が認められた (Fig. 3-3C、Fig. 3-4C)。また、退行した乳腺を示す出産後 4 週目において、乳腺上皮で陽性反応は認められた (Fig. 3-5C)。

#### 3-3-3 c-MET-免疫組織化学

生後 1 日齢において、TEM8 および Notch-1 と同様に、乳腺上皮で陽性反応は認められなかった (Fig. 3-1D)。生後 8 週齢において、発育した乳腺上皮の細胞質で陽性反応が認められた (Fig. 3-2D)。その後、出産後 1 日目および 2 週目の拡張した乳腺上皮の細胞質および核において、陽性反応が認められた (Fig. 3-3D、Fig. 3-4D)。また、退行した乳腺を示す出産後 4 週目において、乳腺上皮の細胞質および核で陽性反応が認められた (Fig. 3-5D)。

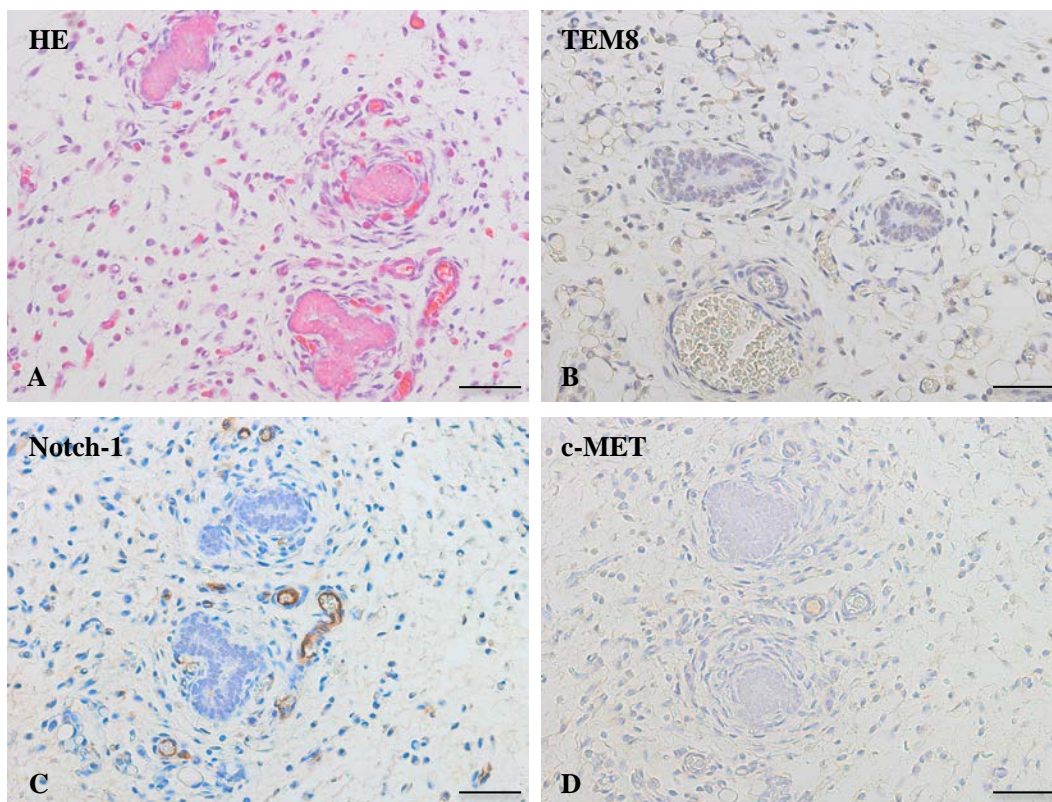


Fig. 3-1. 生後1日齢（未經産）ラット乳腺における免疫組織化学 (IHC)

(A) HE; 未分化な上皮細胞集塊が認められる。(B) TEM8-IHC, (C) Notch-1-IHC, (D) c-MET-IHC; 乳腺上皮細胞における陽性反応は認められない。A, B, C, D: Scale bars = 50µm

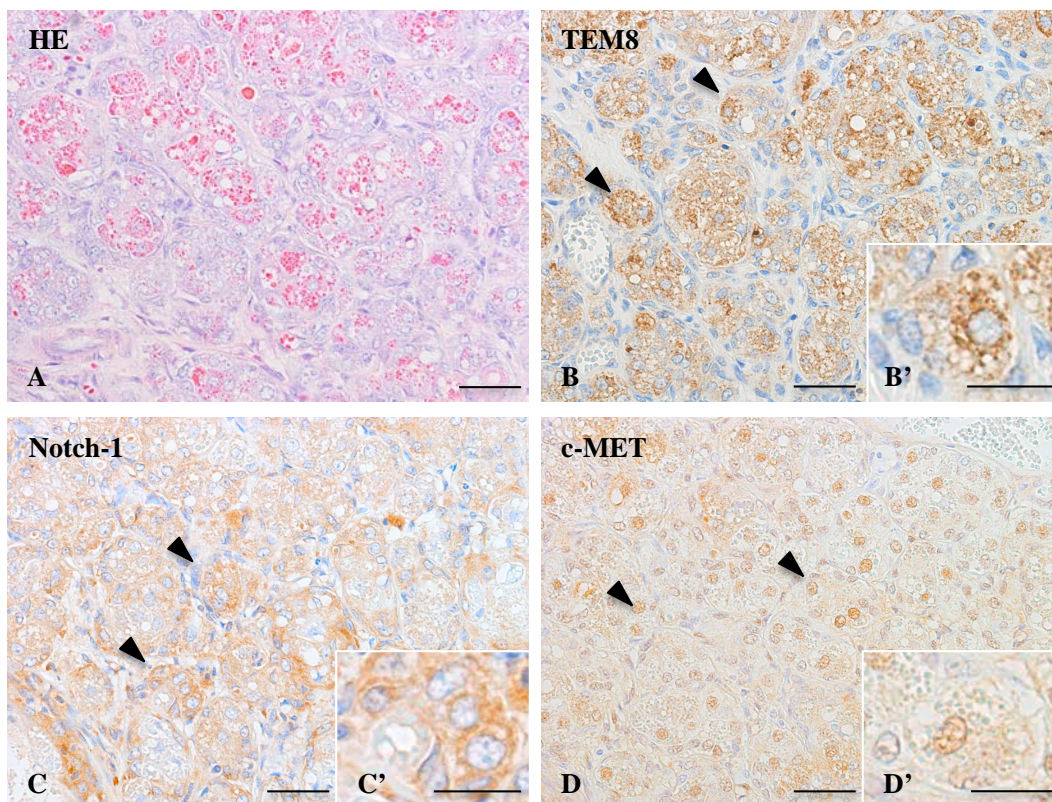


Fig. 3-2. 生後8週齢 (未経産) ラット乳腺における免疫組織化学 (IHC)

(A) HE; 急速な乳腺の発育が認められる。乳腺上皮細胞は豊富な細胞質の中に好酸性の小滴が認められる。(B) TEM8-IHC, (C) Notch-1-IHCおよび (B', C') 高倍率; 発育した乳腺上皮細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(D) c-MET-IHC, (D') 高倍率; 乳腺上皮細胞の細胞質および核において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B, C, D: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', C', D': Scale bars = 25 $\mu$ m

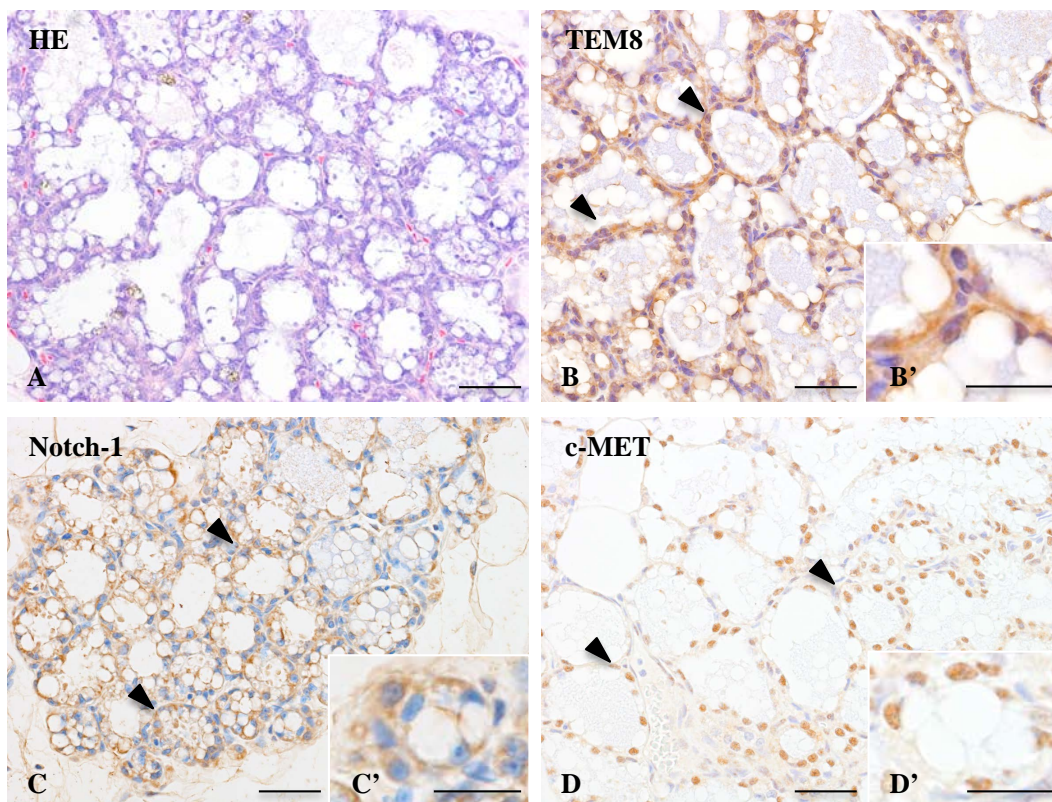


Fig. 3-3. 出産後1日目ラット乳腺における免疫組織化学 (IHC)

(A) HE; 妊娠および出産に伴い、乳腺上皮細胞の細胞質において乳タンパクおよび脂肪滴産生が認められ、乳腺は腺房の分泌機能を有するようになる。(B) TEM8-IHC, (C) Notch-1-IHCおよび (B', C') 高倍率; 乳腺上皮細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(D) c-MET-IHC, (D') 高倍率; 乳腺上皮細胞の細胞質における陽性反応は減弱し、核における陽性反応 (矢頭) が顕著に認められる。A, B, C, D: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', C', D': Scale bars = 25 $\mu$ m

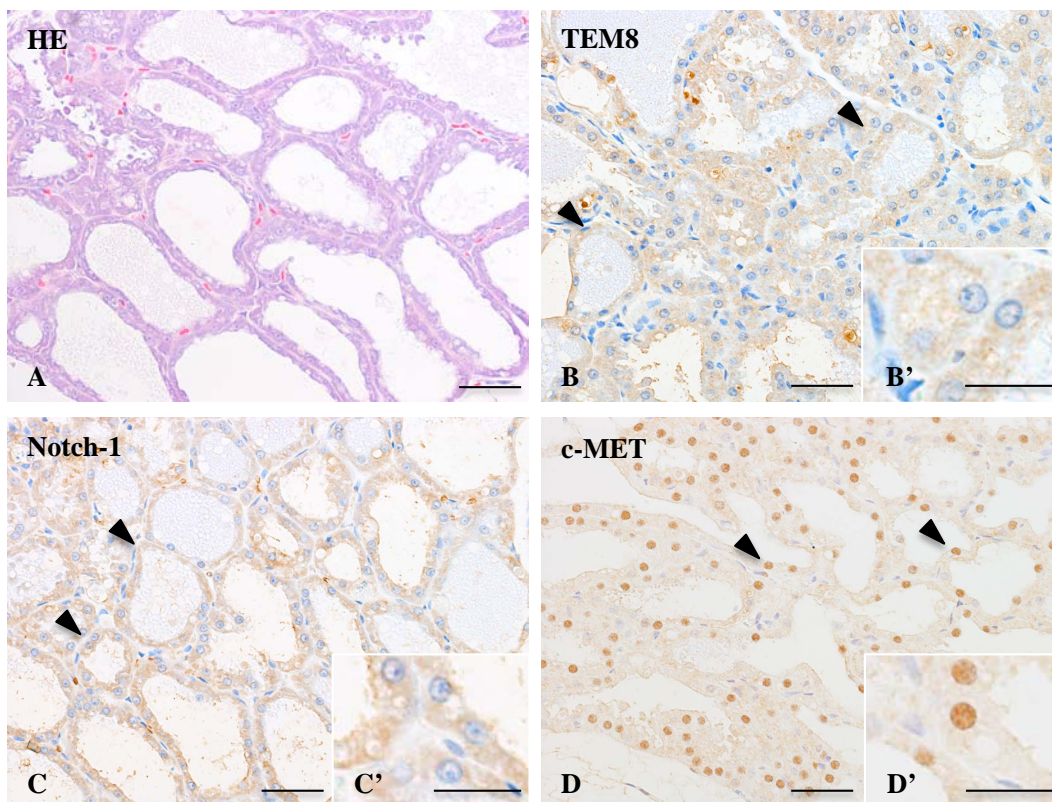


Fig. 3-4. 出産後2週目ラット乳腺における免疫組織化学 (IHC)

(A) HE; 授乳に伴い、乳腺は顕著な拡張を示すようになる。乳腺上皮細胞は乳タンパクおよび乳脂肪球を内腔へと活発に分泌するようになる。(B) TEM8-IHC, (C) Notch-1-IHCおよび (B', C') 高倍率; 乳腺上皮細胞の細胞質において、陽性反応(矢頭)が認められる。(D) c-MET-IHC, (D') 高倍率; 出産後1日目乳腺と同様に、乳腺上皮細胞の細胞質における陽性反応は弱く、核における陽性反応(矢頭)が顕著に認められる。A, B, C, D: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', C', D': Scale bars = 25 $\mu$ m

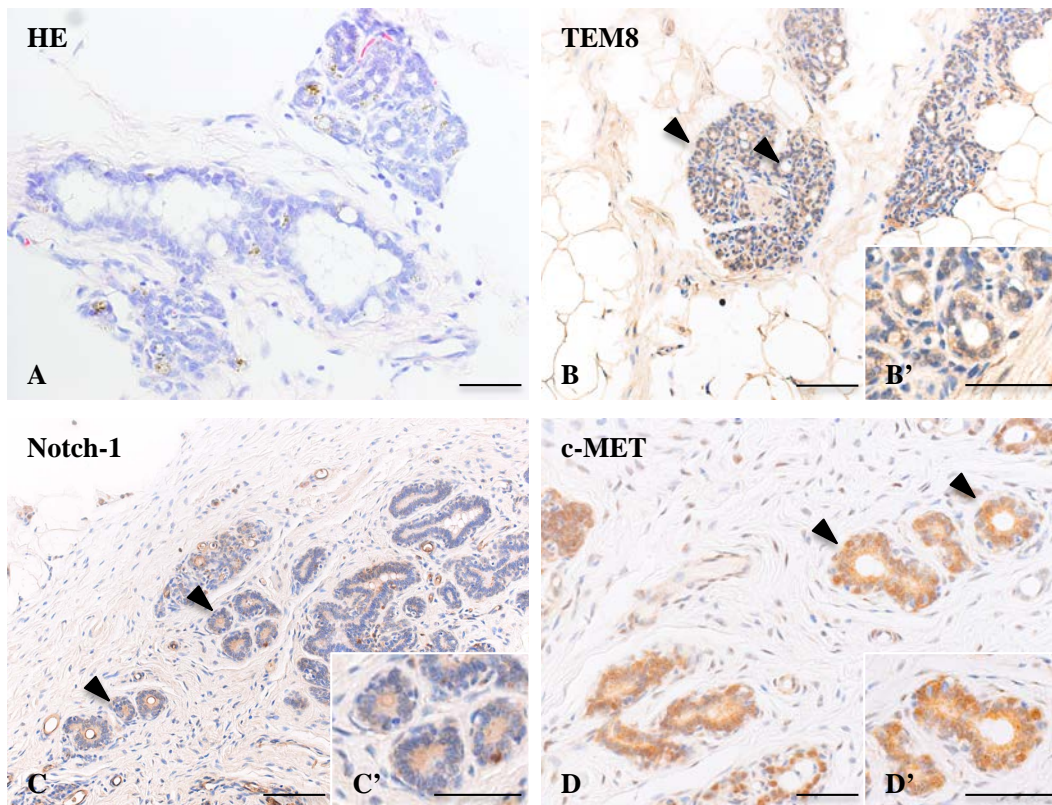


Fig. 3-5. 出産後4週目ラット乳腺における免疫組織化学 (IHC)

(A) HE; 離乳に伴い、乳腺は乳汁産生を停止し、乳腺上皮細胞は退行を示すようになる。(B) TEM8-IHC, (C) Notch-1-IHCおよび (B', C') 高倍率; 退行した乳腺上皮細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(D) c-MET-IHC, (D') 高倍率; 乳腺上皮細胞の細胞質および核において、陽性反応 (矢頭) が顕著に認められる。A, B, C, D: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', C', D': Scale bars = 25 $\mu$ m



### 3-4 考察

乳腺の発生過程において、乳腺幹細胞 (MaSCs) は非対称性分裂により、basal あるいは luminal 前駆細胞へと分裂し、それぞれが myoepithelial あるいは luminal 細胞へと分化していくことが知られている (Santoro et al., 2016)。Notch-1 は、MaSCs の内因性調節因子であり、自己複製と増殖を促進するとともに (Dontu et al., 2004; Bouras et al., 2008)、ductal/alveolar 細胞への分化に関与しているものと考えられている (Yalcin-Ozuysal et al., 2010)。また、肝細胞増殖因子(HGF)受容体である c-MET は、多くの上皮細胞の機能調節を担っており (Trusolino et al., 2010; Garner et al., 2011)、乳腺上皮においては、MET シグナルが乳腺上皮細胞の成長、管腔形成および分化の調節に関与していることが明らかになっている (Soriano et al., 1995; Yang et al., 1995; Haslam et al., 2008)。

本研究において、ラット乳腺の成熟過程の検索において、未分化段階の乳腺では、TEM8、Notch-1 および c-MET の発現は認められなかった。しかしながら、春機発動時の乳腺上皮発育過程において、これらの発現が乳腺上皮細胞に認められた。これらの結果から、Notch および MET シグナルによって生ずる ductal/alveolar 細胞への分化および管腔形成の誘導と同時に、TEM8 の発現が開始されることが示唆された。さらに、活発な乳腺の発育を示す生後 8 週齢と比較して、泌乳期後の乳腺退行期では TEM8 および Notch-1 を発現する乳腺上皮細胞の減少が認められた。Notch-1 は ductal/alveolar 細胞への分化に関与していることから (Yalcin-Ozuysal et al., 2010)、乳腺の退行期では Notch-1 シグナルの減少が生じていることが示唆された。乳腺の成熟過程における TEM8 の発現は Notch-1 発現と類似した発現パターンを示していたことから、TEM8 は Notch-1 と共に、MaSCs から luminal 細胞への分化に重要な因子として関与している可能性が示唆された。

Werner らは、膜結合型 TEM8 が integrin 様の接着分子として機能し、Col-I

や Col-VI と接着することによって、細胞内骨格を変化させ、細胞の migration を誘導することを明らかにしている (Werner et al., 2006)。TEM8 と同様に vWA ドメインを持つ  $\alpha 2\beta 1$  integrin は乳腺上皮の luminal 細胞に高度に発現しており、vWA ドメインを介して Col-I と接着することによって、成熟した luminal 細胞の形質発現や管腔構造の維持に関与していることが報告されている (Del Buono et al., 1991; Saelman et al., 1995; Zutter et al., 1995; Klekotka PA et al., 2001)。このため、乳腺上皮の分化過程において、TEM8 も Col-I や Col-VI との接着によって luminal 細胞の分化・成熟や管腔構造の形成や維持に関与している可能性が示唆された。興味深いことに、Hodkinson らは、Notch-1 が  $\beta 1$  integrin の発現を促進することを明らかにしており、さらに、Mitra らは、 $\alpha 5\beta 1$ -integrin を介したシグナリングがリガンド非依存性に c-MET の活性化を誘導することを報告している (Hodkinson et al., 2007; Mitra et al., 2011)。このため、乳腺上皮細胞の分化過程において、TEM8 の発現も Notch シグナリングによって誘導され、さらに TEM8 の活性化が c-MET シグナルの増加をもたらすことによって、MaSCs から luminal 細胞への分化の制御に関与しているのかもしれない。

以上のことから、乳腺の成熟過程において、TEM8 は Notch-1 および c-MET とともに、乳腺の発育・分化および管腔形成に関与している可能性が示唆された。

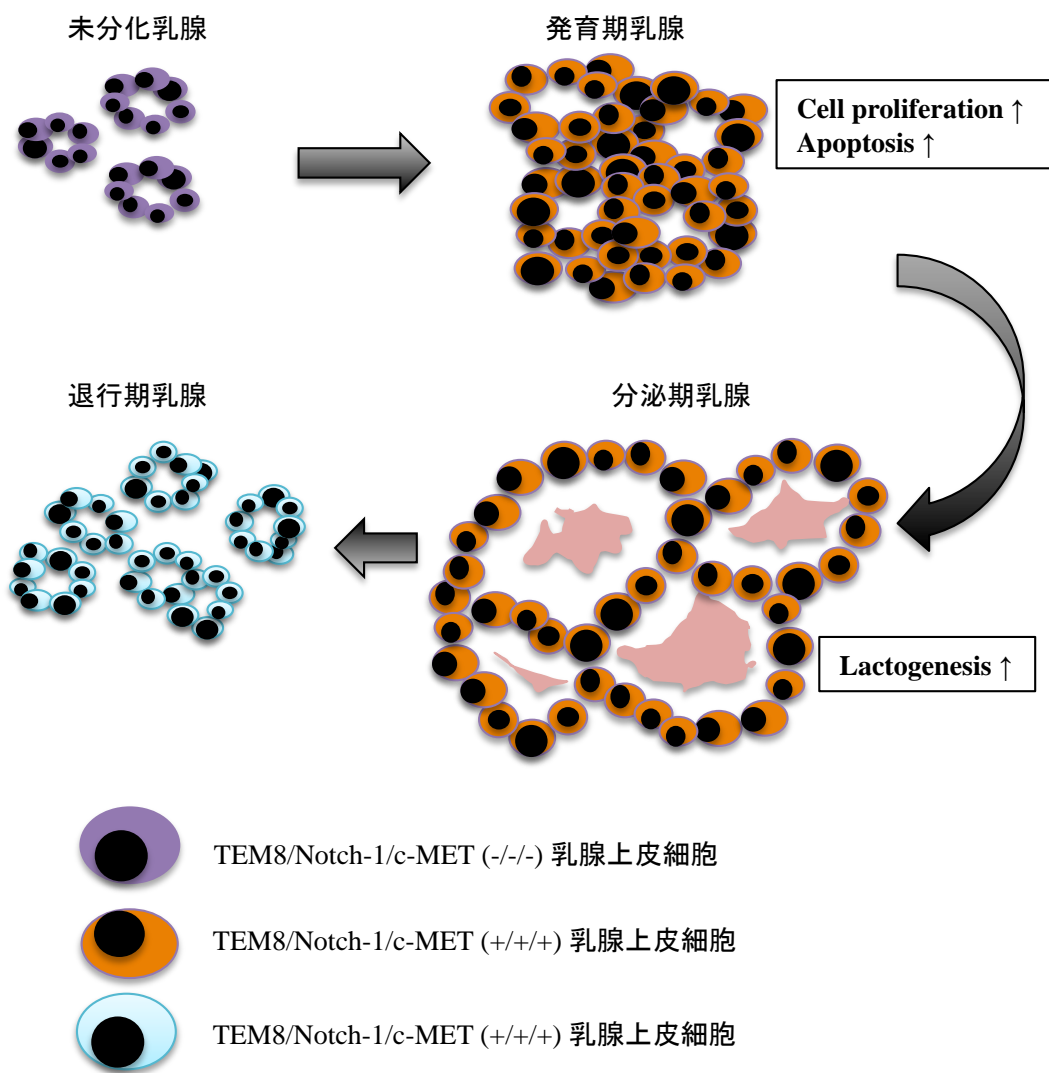


Fig. 3-6. ラット乳腺におけるTEM8, Notch-1, c-MET発現

## 第 4 章

### イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現と

### イヌ乳癌細胞株における TEM8 陽性細胞の形質的特徴

#### 4-1 小序

乳腺腫瘍 (mammary gland tumor: MGT) は、イヌとヒトにおける最も一般的な腫瘍の 1 つである。イヌ乳腺腫瘍の約 50% が悪性腫瘍であり、乳腺腫瘍の上皮様構造は tubular、papillary あるいは solid など様々な組織型を示す。また、それら組織型はイヌ乳癌の生物学的挙動を予測する指標となっている (Sorenmo et al., 2003; Sleekx et al., 2011; Sorenmo et al., 2011; Goldschmidt et al., 2011, Peña et al., 2014)。

近年、イヌ乳腺腫瘍は luminal 細胞あるいは basal/myoepithelial 細胞マーカーの発現を免疫組織化学的に検索することで、腫瘍細胞の表現型を評価した組織分類が行われており、Sassi et al. (2010) や Im et al. (2014) は luminal 細胞由来の乳腺腫瘍の多くが低悪性度であり、増殖速度も遅いことを示唆している。一方で、basal/myoepithelial 細胞由来の乳腺腫瘍の多くは高悪性度であり、増殖速度も速いと考えられている (Gama et al., 2008; Rasotto et al., 2014)。これら luminal あるいは basal 細胞の特徴を有する腫瘍細胞は、多くの tubular/papillotubular や solid 構造を示す乳腺腫瘍において認められている (Sassi et al., 2010; Im et al., 2014)。

TEM8 はマウスやヒトにおいて、結腸癌 (Nanda et al., 2004; Rmali et al., 2004)、乳癌 (Davies et al., 2006; Gutwein et al., 2011)、食道癌 (Nanda et al., 2004; Yang et al., 2017)、肺癌 (Nanda et al., 2004; Gong et al., 2018)、前立腺癌 (Sakai

et al., 2009) および膀胱癌 (Nanda et al., 2004) などの様々な癌における血管内皮細胞で発現していることが報告されており、近年では肺癌 (Gong et al., 2018)、乳癌 (Davies et al., 2006; Chen et al., 2013)、骨肉腫 (Cao et al., 2016) あるいはメラノーマ (Cullen et al., 2009) の腫瘍細胞でも発現していることが明らかになっている。第 2 章において記述したように、従来、TEM8 は血管新生、細胞接着および細胞外マトリックスの恒常性に関与していると考えられている。また、腫瘍分野における TEM8 に関する研究では、乳癌細胞で発現している受容体型 TEM8 を活性化させることで、Wnt シグナルが増強され、結果として癌幹細胞の自己複製、腫瘍の浸潤あるいは転移が促進することを明らかにしている (Chen et al., 2013)。さらに、腫瘍組織での TEM8 発現が生存期間の短縮と正の相関を示すことが報告されている (Davies et al., 2006)。しかしながら、腫瘍細胞での TEM8 発現と組織学的特性の関係性および TEM8 陽性腫瘍細胞の形質に関する研究は行われていない。

第 2 章において、TEM8 は乳腺をはじめ広範囲な正常組織で発現し、組織によって優位に発現する isoform が異なっていた。乳腺における TEM8 発現は乳腺上皮細胞に限局し、受容体として機能する膜結合型 (long, medium isoforms) と可溶性因子として機能する可溶型 (short isoform) がともに発現していることが明らかとなった。このことから、TEM8 は乳腺の上皮形態維持に関与することが示唆された。さらに、第 3 章において、乳腺の成熟過程において、TEM8 は管腔構造の発達に伴って乳腺上皮細胞での発現が増加し、luminal 細胞への分化を誘導する Notch-1 および管腔構造形成を促進する c-MET の発現と関連性を示していた。

本章では、乳腺の腫瘍化に伴う TEM8 発現の検索および組織学的特性との関連を調査するために、イヌ乳腺腫瘍 91 症例において TEM8-免疫組織化学を実施した。さらに、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 陽性腫瘍細胞の表現型を明らかにするために、luminal 細胞および basal/myoepithelial 細胞マーカーとして CK19、p63 およ

び  $\alpha$ SMA-免疫組織化学を行った。また、TEM8 は乳腺の成熟過程において、luminal 細胞への分化および管腔構造形成との関連性が示されたことから、TEM8 陽性腫瘍細胞の形質を検索するために、luminal 細胞由来および basal 細胞由来の 2 種類のイヌ乳癌細胞株における TEM8、Notch-1、c-MET および p-c-MET 発現を Western blot 法により解析すると同時に、乳腺腫瘍組織における Notch-1 および c-MET の発現・局在を免疫組織化学により検索した。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 試供動物

本研究におけるイヌ乳腺腫瘍検体は 2013 年から 2018 年にかけて、日本獣医生命科学大学附属動物医療センターおよび当研究室関連動物病院において、外科的切除を受けた 91 症例を飼い主の同意を得た後、使用した。切除された検体は 10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温、24 時間固定した後、定法に従いパラフィン包埋し、3  $\mu$ m の切片を作製した。作製した切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学的検索に用いた。

### 4-2-2 病理組織学的診断

本研究における検体は、Goldschmidt et al. (2011) による組織型分類に従い、3 人の診断医により独立して分類した後、同じ箇所において Peña 方式による組織グレード分類 (grade I、II、III) を行った (Peña et al., 2014)。組織グレードは管腔形成、核の多形性および有糸分裂像の 3 つの形態学的特性の評価に基づいて実施し、それぞれの特性においてスコア 1、2 および 3 と評価した後、最終合計スコアが 3-5 点: grade I、6-7 点: grade II、8-9 点: grade III とした。

#### 4-2-3 免疫組織化学

内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を 60°C にて 60 分間反応させた。次に抗体の非特異的結合を防ぐため、10% 正常ヤギ血清 (Dako) (for TEM8、c-MET)、Block Ace (Snow Brand Milk Products Co.) (for CK19、p63、 $\alpha$ SMA、Notch-1) を室温で 60 分間反応させた。次に抗 TEM8 ウサギポリクローナル抗体 (1:2,000、Abcam)、luminal 細胞マーカーとして抗 CK19 マウスモノクローナル抗体 (1:1,000、A53-B、NeoMarkets、California、USA)、basal/myoepithelial 細胞マーカーとして抗 p63 ウサギポリクローナル抗体 (1:2,000、N2C1、GeneTex)、myoepithelial 細胞マーカーとして抗  $\alpha$ SMA マウスモノクローナル抗体 (1:500、1A4、Dako、Glostrup、Denmark)、抗 c-MET マウスモノクローナル抗体 (1:300、Santa Cruz Bio.)、抗 Notch-1 ヤギポリクローナル抗体 (1:100、Santa Cruz Bio.) を 4°C にて一晩反応させた。続いて、ヒストファインシンプルシステム MAX-PO (Nichirei Biosciences) を室温にて 30 分間反応させた。最後に、DAB solution (EnVision™+, Dako) で発色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。腫瘍組織に隣接する正常乳腺組織を内因性コントロールとして使用した。これら免疫染色の評価として、TEM8、CK19、 $\alpha$ SMA、Notch-1 および c-MET は細胞質、p63 は核において陽性反応を示した腫瘍細胞の割合が 60% 以上であった場合、その組織検体は陽性と判断した。

#### 4-2-4 二重免疫組織化学

脱パラフィン後、抗原の賦活化のため 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) を 60°C にて 60 分間反応させた。続いて Block Ace (Snow Brand Milk Products Co.) を反応させ、抗 TEM8 抗体 (1:500) と抗 CK19 抗体 (1:500) のカクテルを 4°C にて一晩反応させた。次に Alexa Fluor 594-標識抗ウサギ IgG ロバ抗体 (1:250、Invitrogen、California、USA) および Alexa Fluor 488-標識抗マウス IgG ロバ抗体 (1:250、

Invitrogen) を室温で 2 時間反応させた後、DP2-BSW software (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

#### 4-2-5 細胞培養

Uyama et al. (2006) が樹立したイヌ乳癌由来細胞株 CHMp と CIPp を用いて細胞培養を行った。使用した細胞株のプロフィールは Table. 4-1. に示した。細胞は  $4.0 \times 10^4$  cells/ml で Dish に播種し、100  $\mu$ g/ml streptomycin (Meiji, Tokyo, Japan) と 1,000 U/ml Penicillin G (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) を添加した RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich)/10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT)、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で増殖させた。

#### 4-2-6 Western blot 解析

採取した培養細胞の細胞層を 0.9% NaCl で洗浄し、10%トリクロロ酢酸/0.9% NaCl を用いて 30 分間 0°C で固定し、8M 尿素/1% ジチオトレイトールおよび 2% Triton X-100 で溶解した (Frischholz et al., 1998)。タンパク質濃度は Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いた Lowry 法で測定し、10  $\mu$ g の total protein を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて分離し、ポリフッ化ビニリデン・メンブラン (Millipore Corp, Bedford, MA) に転写した。メンブランを Tris 緩衝生理食塩水/0.2% Tween 20 (TBST) で洗浄し、抗体の非特異的結合を阻害するために 1% ECL blocking reagent (GE Healthcare, Chalfont St Giles, England)/TBST を 4°C で一晩反応させた。メンブランを 3 回 TBST で洗浄し、抗 TEM8 ウサギポリクローナル抗体 (1:5,000, Abcam)、抗 CK19 マウスモノクローナル抗体 (1:3,000, NeoMarkets)、抗 p63 ウサギポリクローナル抗体 (1:2,000, GeneTex)、抗 c-MET マウスモノクローナル抗体 (1:500, Santa Cruz Bio.)、抗 p-MET ウサギポリクローナル抗体



(1:1,000、sc-34085、Santa Cruz Bio.)、抗 Notch-1 ヤギポリクローナル抗体 (1:1,000、Santa Cruz Bio.) あるいは抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (1:500、Santa Cruz Bio.) を 2 時間室温で反応させた。洗浄後、メンブランを HRP-標識抗ウサギ IgG ロバ抗体 (1:5,000、GE Healthcare Bio-Sciences AB)、HRP-標識抗マウス IgG ヒツジ抗体 (1:5,000、GE Healthcare Bio-Sciences AB) あるいは HRP-標識抗ヤギ IgG ウサギ抗体 (1:5,000、DAKO) を室温で 30 分間反応させた。プロットは ECL prime detection reagents (GE Healthcare Bio-Sciences AB) を用いた化学発光によって検出した。Band density は Image J software (National Institutes of Health) を用いて評価した。

#### 4-2-7 統計解析

腫瘍細胞における TEM8 発現と組織型分類、組織グレード分類、CK19 あるいは p63 発現との統計学的解析は、Pearson's test および two-way ANOVA により行った。

Western blot 解析の結果は平均値  $\pm$  S.D. で示した。統計学的有意差は Student's *t*-test を使用して評価した。

Table. 4-1 Profiles of cell lines

<i>Patients</i>	<i>Age (years)</i>	<i>Gender</i>	<i>Name of cell line</i>	<i>Histopathological view</i>	<i>Clinical stage TMN</i>	<i>Source of the tumor cells</i>
Mixed	12	Female	CHMp	Inflammatory AC	T4N1(+)M1 Stage IV	Primary mass
Shih Tzu	10	Female	CIPp	AC	T1cN1(+)M1 Stage IV	Primary mass

AC; adenocarcinoma

CHMp; CK19/p63 (+/-) luminal細胞由来

CIPp; CK19/p63 (-/+) basal細胞由来

## 4-3 結果

### 4-3-1 腫瘍組織学

イヌ乳腺腫瘍 91 症例における組織学的評価を実施した結果、adenoma - simple (25 症例)、carcinoma - simple (43 症例; tubular type 14 症例、tubulopapillary 29 症例)、carcinoma - micropapillary invasive (5 症例) および carcinoma - solid (18 症例) であった。Peña 方式による組織グレード分類の結果、grade I (22 症例; 33%)、grade II (29 症例; 44%) および grade III (15 症例; 23%) であった。TEM8 発現と組織グレードにおける統計学的な相関は認められなかった (Table. 4-2.  $p = 0.604$ )。

### 4-3-2 免疫組織化学

正常乳腺組織における TEM8-陽性反応は、第 2 章と同様に乳腺上皮細胞の細胞質に認められたが、筋上皮細胞での発現は認められなかった (Fig. 4-1)。過去の報告より、乳腺上皮の luminal 細胞の細胞質において、CK19-陽性反応は認められている。一方で、p63-陽性反応は、luminal 周囲の basal/myoepithelial 細胞の核で認められることが示されている。また正常乳腺上皮細胞と同様に、イヌ乳腺腫瘍の腫瘍細胞において、TEM8 発現は細胞質で認められた。

adenoma - simple (n=25)、carcinoma - simple (n=43) および carcinoma - micropapillary invasive (n=5) の全ての症例において、TEM8 陽性となり、carcinoma - solid (n=18) よりも有意に発現していた (Fig. 4-2A、Table 4-3.  $p < 0.05$ )。また、adenoma - simple (23/25 症例)、carcinoma - simple (40/43 症例) および carcinoma - micropapillary invasive (2/5 症例) の腫瘍細胞において、CK19 発現が認められた (Fig.4-2B)。TEM8 陽性腫瘍細胞における p63 および  $\alpha$ SMA 発現はともに認められなかった (Fig. 4-2C-D)。

carcinoma - solid (6/18 症例) において、solid 構造を形成する 60%以上の腫瘍細胞で TEM8 発現は認められた (Fig. 4-3A)。また、carcinoma - solid (12/18 症例) において、solid 構造の中に存在する luminal 構造を形成している 30%以下の腫瘍細胞で、TEM8 発現は認められた。p63 発現は、carcinoma - solid (12/18 症例) で solid 構造を形成する 60%以上の腫瘍細胞で認められた (Fig. 4-4C)。また、それら腫瘍細胞における TEM8 および CK19 発現は認められなかった (Fig. 4-4A-B)。一方で、p63 発現が認められなかった carcinoma - solid (6/18 症例) における solid 構造、または p63 陽性の carcinoma - solid (12/18 症例) における solid 構造の中に存在する luminal 構造を形成している腫瘍細胞は、TEM8 および CK19 発現を示していた (Fig. 4-3A-B、Fig. 4-4A-B)。全ての carcinoma - solid において、 $\alpha$ SMA 発現を示す腫瘍細胞は認められなかった (Fig. 4-3D、Fig. 4-4D)。Notch-1 および c-MET 発現は、solid および luminal 構造ともに TEM8 発現を示す腫瘍細胞において認められた (Fig. 4-5A-F)。

#### 4-3-3 二重免疫組織化学

adenoma - simple、carcinoma - simple および carcinoma - micropapillary invasive において、多くの TEM8 陽性腫瘍細胞は CK19 発現を示していた (Fig. 4-6A-C)。また、carcinoma - solid における solid 構造および luminal 構造を形成する腫瘍細胞において、TEM8 発現を示す腫瘍細胞は CK19 発現を示していた (Fig. 4-6D-F)。腫瘍細胞における TEM8 発現と CK19 発現は、統計学的に有意に相関していた (Table. 4-3.  $p < 0.05$ )。また同時に、TEM8 陽性腫瘍細胞において、p63 発現は有意に認められなかった (Table. 4-3.  $p < 0.05$ )。

#### 4-3-4 *in vitro*における luminal および basal 細胞由来イヌ乳癌細胞の TEM8 発現

CK19/p63 (+/-) luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞; CHMp および CK19/p63 (-/+) basal/myoepithelial 細胞由来イヌ乳癌細胞; CIPp において、TEM8、Notch-1、c-MET および p-c-MET 発現を Western blot 法により検索した。TEM8 発現は、long isoform および short isoform とともに CHMp および CIPp で認められたが、CHMp では CIPp と比較して有意に増加していた (Fig. 4-7.  $p < 0.05$ )。CHMp および CIPp において、TEM8-medium isoform 発現は認められなかった。また、CHMp における Notch-1、c-MET および p-c-MET 発現は、CIPp と比較して有意に増加していた (Fig. 4-7.  $p < 0.05$ )。

Table. 4-2. Histologic grade of malignant MGTs and TEM8 expression in the carcinoma cells

<i>Histologic grade</i>	<i>TEM8 positive</i>	<i>TEM8 negative</i>	<i>Total</i>
I	22	0	22 (33%)
II	18	11	29 (44%)
III	11	4	15 (23%)

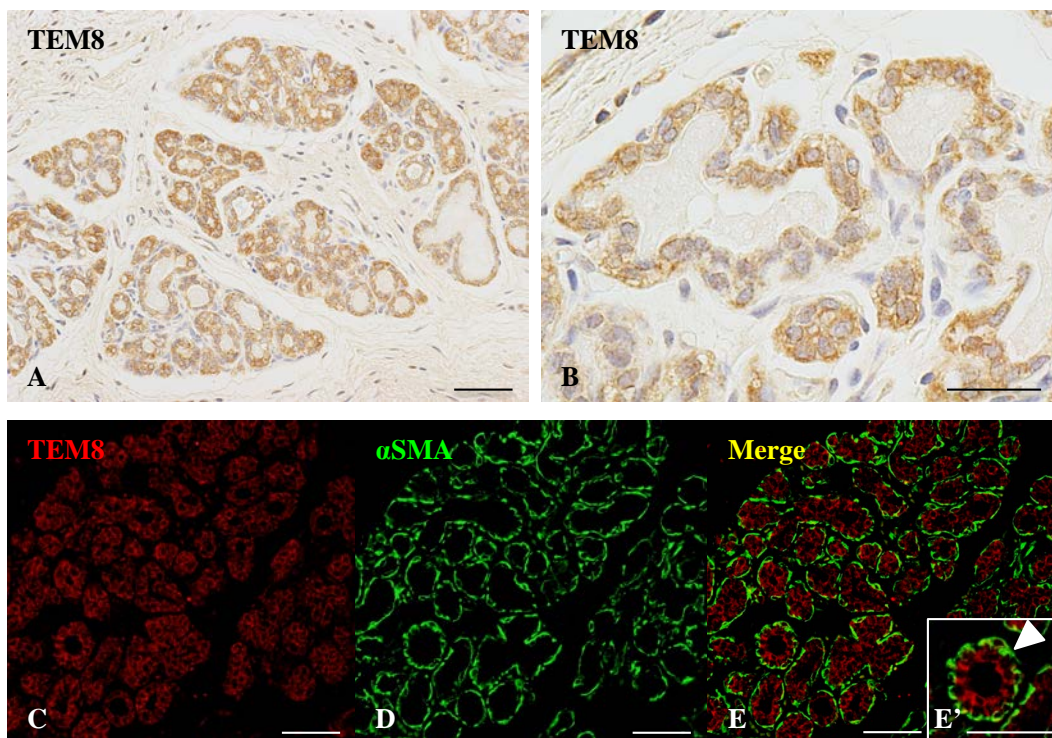


Fig. 4-1. イヌ正常組織におけるTEM8-免疫組織化学 (IHC)

(A, B) TEM8-IHC; 乳腺上皮細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。  
 (C, D, E) TEM8 (赤) とαSMA (緑) に対する二重標識免疫組織化学、(E) 高倍率; TEM8-陽性乳腺上皮細胞を囲むようにαSMA陽性筋上皮細胞が存在することを示す。Scale bars = 50μm

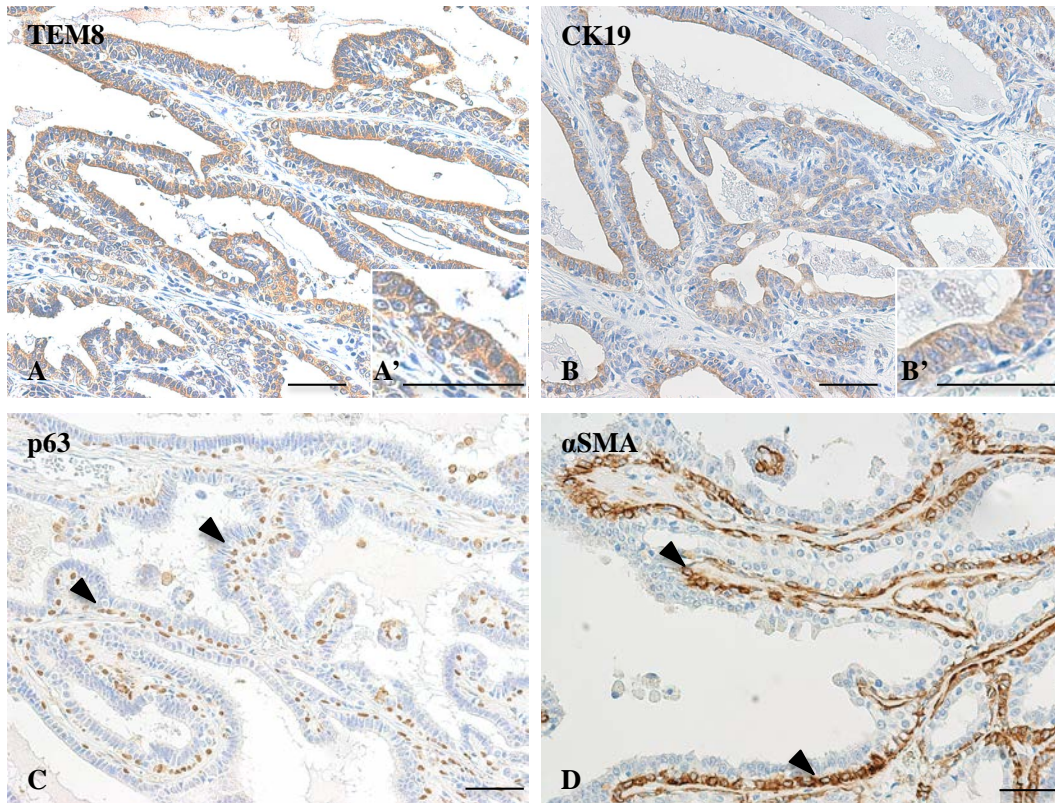


Fig. 4-2. Carcinoma - simpleにおける免疫組織化学 (IHC)

(A) TEM8-IHC, (A') 高倍率; 管腔を形成する腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(B) CK19-IHC, (B') 高倍率; TEM8と同様に、腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(C) p63-IHC, (D) αSMA-IHC; 腫瘍細胞層を裏張りするようにp63は核、αSMAは細胞質において陽性反応(矢頭)が認められる。Scale bars = 50μm



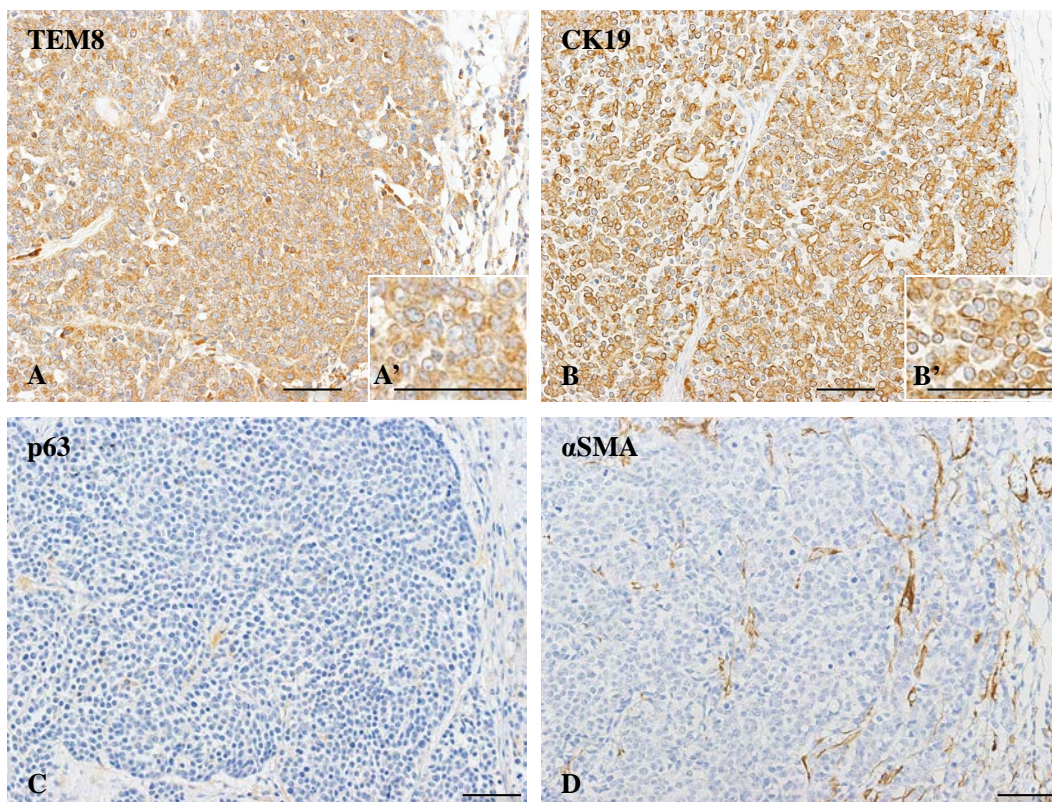


Fig. 4-3. TEM8-陽性 Carcinoma - solidにおける免疫組織化学 (IHC)

(A) TEM8-IHC, (A') 高倍率; 充実性増殖を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(B) CK19-IHC, (B') 高倍率; TEM8と同様に、腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(C) p63-IHC, (D) αSMA-IHC; 充実性増殖を示す腫瘍細胞において、陽性反応は認められない。  
Scale bars = 50μm

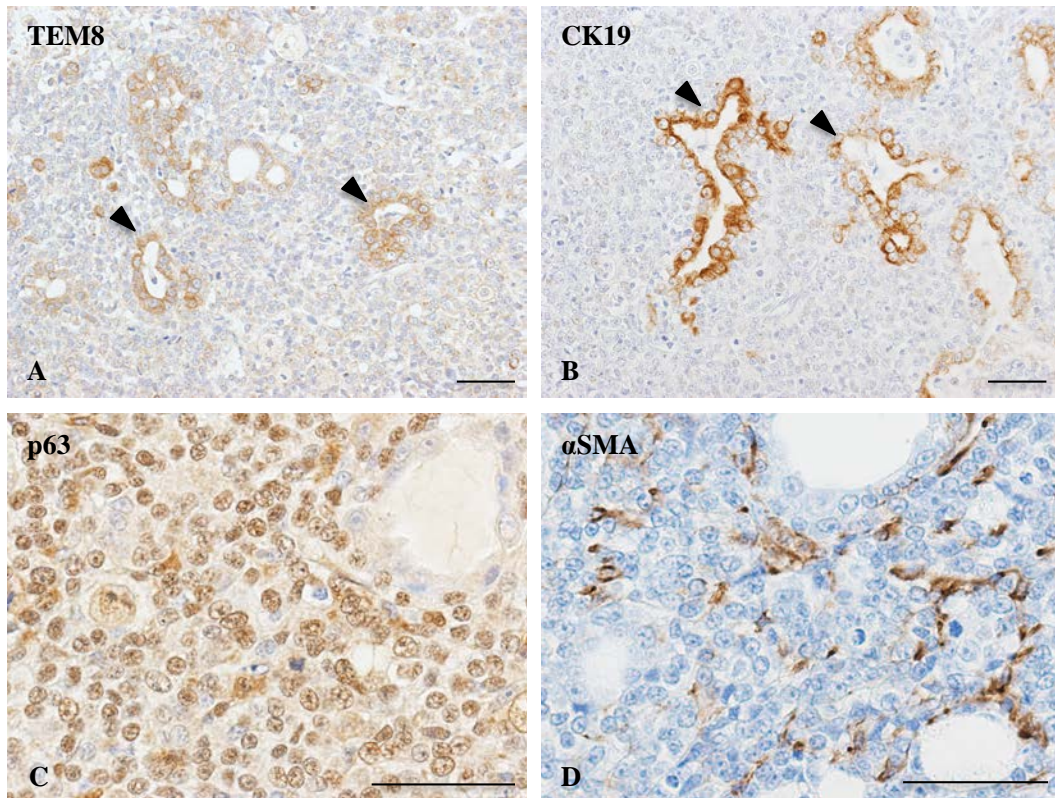


Fig. 4-4. TEM8-陰性 Carcinoma - solidにおける免疫組織化学 (IHC)

(A) TEM8-IHC; 充実性増殖を示す腫瘍細胞において、陽性反応は認められないが、充実性腫瘍包巢内に存在する管腔構造を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(B) CK19-IHC; TEM8と同様に、管腔構造を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(C) p63-IHC; 充実性増殖を示す腫瘍細胞の核において、陽性反応が認められる。(D)  $\alpha$ SMA-IHC; 腫瘍細胞において、陽性反応は認められない。  
Scale bars = 50 $\mu$ m

Table. 4-3. Expression of TEM8, CK19, p63,  $\alpha$ SMA in canine mammary gland tumor

<i>Histological type</i>	<i>TEM8 positive (%)</i>	<i>CK19<sup>†</sup> positive (%)</i>	<i>p63<sup>‡</sup> positive (%)</i>	<i><math>\alpha</math>SMA positive</i>	<i>Number of samples (%)</i>
Adenoma - simple	25* (100)	23 (92)	0	0	25 (27.5)
Carcinoma - simple	43* (100)	40 (93)	0	0	43 (47.2)
Tubular	14 (100)	11 (78.5)	0	0	14
Tubulopapillary	29 (100)	28 (96.5)	0	0	29
Carcinoma - micropapillary invasive	5* (100)	2 (40)	0	0	5 (5.5)
Carcinoma - solid					18 (19.8)
Solid structure	6 (33.3)	6 (33.3)	12 (66.7)	0	18
Luminal structure <sup>a)</sup>	12 (100)	12 (100)	0	0	12

a): luminal structures within the solid structures

TEM8<sup>+</sup> carcinoma cells were significantly more often present in simple adenomas, simple carcinomas and invasive micropapillary carcinomas compared with solid carcinomas (\*:  $p < 0.05$ ). TEM8 expression significantly correlated with CK19 expression (†:  $p < 0.05$ ) and absence of p63 expression (‡:  $p < 0.05$ ) in carcinoma cells.

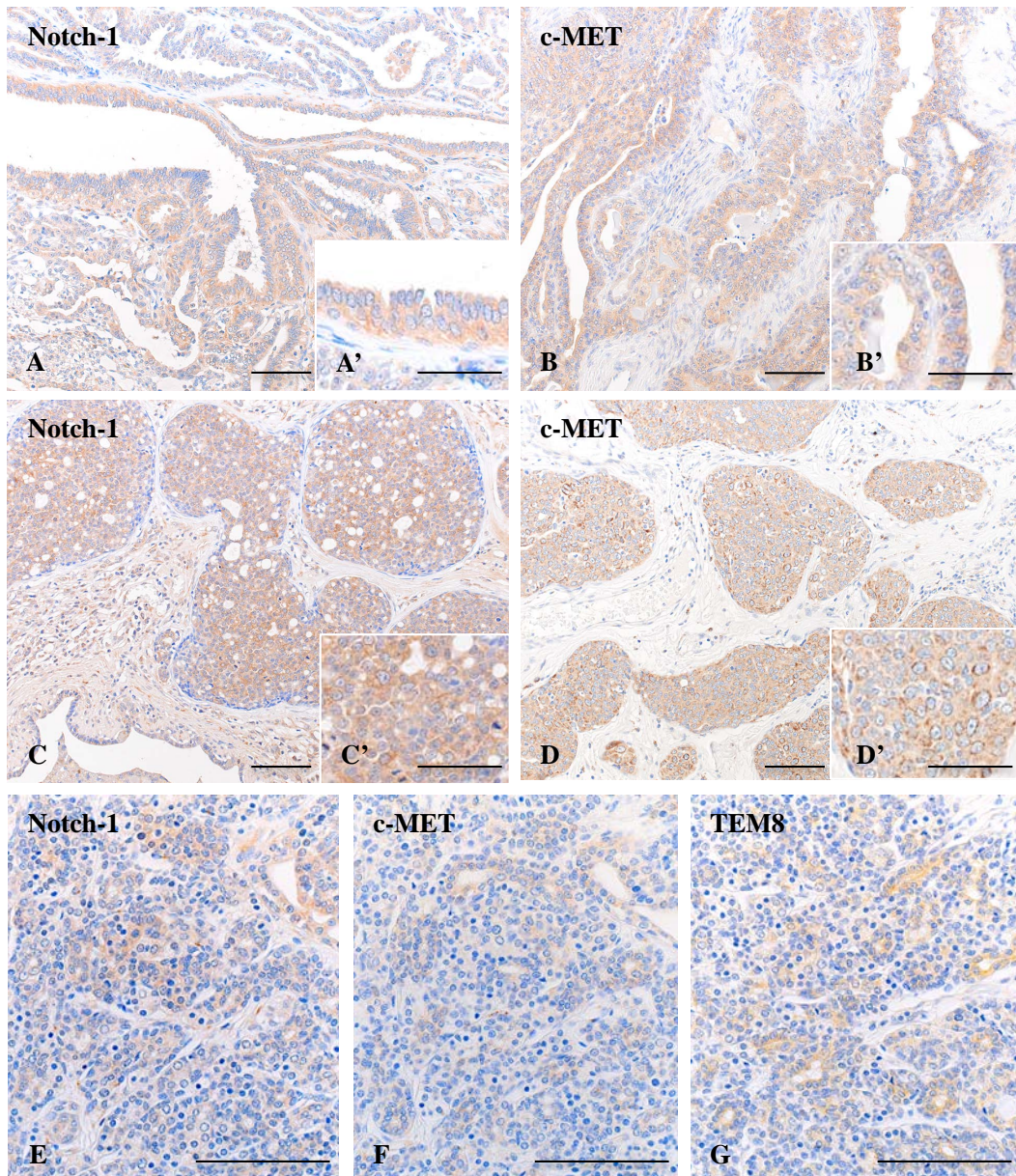


Fig. 4-5. イヌ乳腺腫瘍におけるNotch-1およびc-MET-免疫組織化学 (IHC)

(A) Notch-1-IHC, Carcinoma - simple (A') 高倍率; 管腔構造を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(B) c-MET-IHC, Carcinoma - simple (B') 高倍率; Notch-1と同様に、管腔構造を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(C) Notch-1-IHC, Carcinoma - solid (C') 高倍率; 充実性増殖を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(D) c-MET-IHC, Carcinoma - solid (D') 高倍率; Notch-1と同様に、充実性増殖を示す腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応が認められる。(E) Notch-1-IHC, Carcinoma - solid (F) c-MET-IHC, Carcinoma - solid (G) TEM8-IHC, Carcinoma - solid; 充実性増殖を示す腫瘍細胞において、陽性反応は認められず、腫瘍胞巣内において管腔を形成する腫瘍細胞で陽性反応が認められる。A, B, C, D, E, F, G: Scale bars = 50 $\mu$ m, A', B', C', D': Scale bars = 25 $\mu$ m

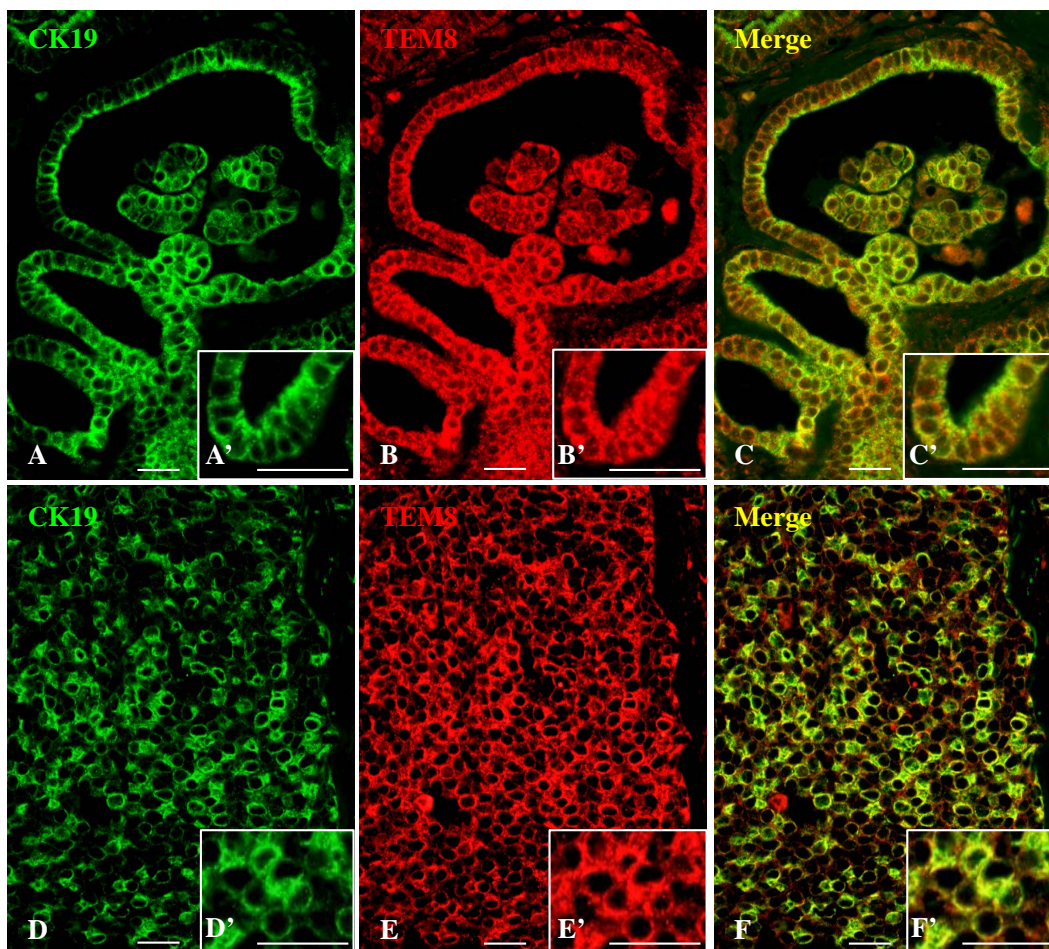


Fig. 4-6. Carcinoma - simpleおよびCarcinoma - solid における二重標識免疫組織化学

(A, B, C); Carcinoma - simpleにおけるCK19 (緑) とTEM8 (赤) に対する二重標識免疫組織化学によって、CK19-陽性腫瘍細胞がTEM8を発現していることを示す。(A', B', C'); 腫瘍細胞の高倍率像を示す。(D, E, F); Carcinoma - solidにおいても同様に、CK19-陽性腫瘍細胞がTEM8を発現していることを示す。(D', E', F'); 腫瘍細胞の高倍率像を示す。Scale bars = 20 $\mu$ m

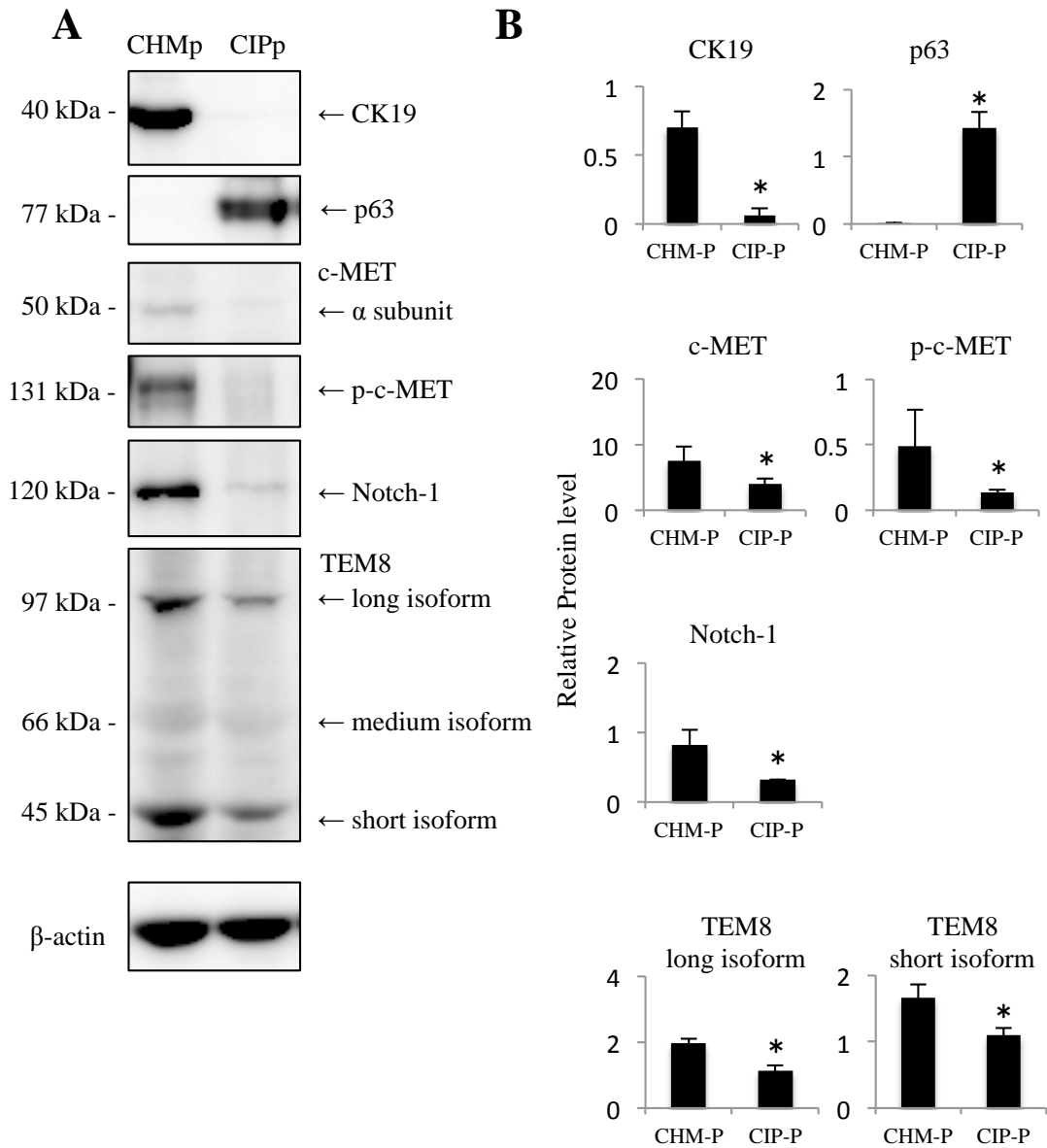


Fig. 4-7. luminalおよびbasal細胞由来イヌ乳癌細胞におけるWestern blot解析

A; CHMpはCK19 (40 kDa)、c-MET ( $\alpha$  subunit; 50 kDa)、p-c-MET (131 kDa)、Notch-1 (120 kDa) およびTEM8 (long isoform; 97 kDa、short isoform; 45 kDa) において、有意なバンドを示している。B;  $\beta$ -actinバンドによって、標準化したそれぞれのタンパク質の相対量を示す。データはすべて平均値  $\pm$ S.D. (n=10) で示し、統計解析はStudent's *t*-testを行った (\*  $p < 0.05$ )。

#### 4-4 考察

本研究において、腫瘍細胞における TEM8 発現とイヌ乳腺腫瘍のグレード分類による組織学的悪性度との関連性は認められなかった。過去に報告されている乳癌細胞を使用した *in vitro* 実験において、腫瘍細胞における TEM8 発現が浸潤や転移に必要であると示唆されており、Davies et al. (2006) は腫瘍での TEM8 発現量と予後不良に正の相関があると報告している。しかしながら、それらの研究は、腫瘍細胞のみならず血管内皮および間質を含んだ腫瘍領域全体での TEM8 発現を検索しており、腫瘍細胞に限局した TEM8 発現と悪性挙動に関する検索は行われていなかった。また、Gutwein et al. (2011) は TNBC の非腫瘍性間質細胞における TEM8 発現が正常乳腺よりも顕著に認められ、転移および腫瘍の進行と相関していることを報告している。以上のことから、腫瘍細胞よりも、むしろ腫瘍細胞周囲の間質における TEM8 の発現の有無が、腫瘍の悪性挙動に関与しているのではないかと考えられた。

次に我々は、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現と腫瘍組織型との関連を検索した。その結果、adenoma - simple、carcinoma - simple および carcinoma - micropapillary invasive の組織型において、TEM8 発現を示す腫瘍細胞が有意に認められた。一方で、多くの carcinoma - solid の組織型において、solid 構造を形成する腫瘍細胞での TEM8 発現は認められず、他の組織型と比較して有意に減少していた。さらに adenoma - simple、carcinoma - simple および carcinoma - micropapillary invasive で認められた TEM8 陽性腫瘍細胞の多くは CK19/p63/αSMA (+/-/-) luminal 様の形質を示し、carcinoma - solid で認められた TEM8 陽性腫瘍細胞も同様な形質を示していた。一方で、全ての組織型における TEM8 陰性腫瘍細胞は、CK19/p63/αSMA (-/+/-) basal 様の形質を示していた。この結果から、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現は luminal 様の形質を示す腫瘍細胞

胞でのみ認められ、basal 様の形質を示す腫瘍細胞では認められないことが明らかとなった。ヒト乳癌症例における TEM8 発現および局在に関する免疫組織学的研究は、TNBC でしか行われておらず、腫瘍細胞での TEM8 発現は認められていない (Gutwein et al., 2011)。ヒトおよびイヌの TNBC における多くの腫瘍細胞は、CK5/6、CK14、CK17 および p63 発現を示す basal 様の形質を呈している (Kim et al., 2013; Perou et al., 2000; Sotiriou et al., 2003; Sørlie et al., 2001)。以上より、ヒトおよびイヌ乳癌腫瘍において、p63 発現を示す basal 様腫瘍細胞では TEM8 発現が減少することが考えられた。

p63 発現は、正常乳腺において basal/myoepithelial 分画に局限している。また、p63 は発達した重層上皮細胞や乳癌における幹細胞の自己複製能維持に必要不可欠である (Candi et al., 2007; Senoo et al., 2007; Li et al., 2008; Memmi et al., 2015)。Yalcin-Ozuysal et al. (2010) は、Notch シグナルの活性化と p63 のダウンレギュレーションが乳腺における luminal 細胞への分化および維持に必要であることを示している。さらに、p63 発現によって、乳腺の胎生期の発育における luminal 細胞マーカーの減少と basal 細胞マーカーの増加が引き起こされることが報告されている (Wuidart et al., 2018)。本研究において、Western blot 解析の結果、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞 CHMp は、basal 細胞由来イヌ乳癌細胞 CIPp と比較して、有意に TEM8 および Notch-1 の発現量が高く、さらに p63 を発現しないことが明らかとなった。また、イヌ乳癌腫瘍組織においては、TEM8 と Notch-1 は共発現する傾向を示し、TEM8 と Notch-1 を発現している症例の大部分では、p63 の発現が認められなかった。このことから、第 3 章で正常乳腺上皮の分化・成熟段階の解析結果と同様に、乳腺腫瘍細胞においても、Notch シグナルによって p63 のダウンレギュレーションが生じていることが示唆され、luminal 細胞の形質が維持された乳腺腫瘍細胞で、TEM8 の発現が亢進しているものと考えられた。

今回、多くの TEM8 陽性腫瘍細胞は、腫瘍胞巣内で管腔を形成していた。また、



TEM8 高発現を示す luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞 CHMp において、c-MET および p-c-MET 発現が有意に増加し、さらに乳腺腫瘍組織において TEM8 と c-MET は共発現する傾向を示していた。我々は、第 3 章において、乳腺の成熟過程での TEM8 および c-MET の共発現を明らかにすることで、TEM8 の乳腺における管腔構造の形成への関与を示唆している。本章の *in vitro* および *in vivo* の結果から、イヌ乳腺腫瘍においても、MET シグナルによって管腔形成が誘導・維持されている乳腺腫瘍細胞に TEM8 が発現していることが示唆された。また、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞株が、受容体として機能している膜結合型 TEM8 long isoform を発現していたことから、イヌ乳腺腫瘍細胞においても TEM8 が Col-I や Col-VI と接着することによって細胞内のシグナリングを惹起し、細胞の機能を制御している可能性が示唆される。TEM8 と同様に vWA ドメインを持つ  $\beta 1$  integrin は、乳腺上皮において、vWA ドメインを介した Col-I との接着によって、成熟した luminal 細胞の形質の発現や管腔構造の維持に関与していることが報告されている (Del Buono et al., 1991; Klekotka PA et al., 2001; Saelman et al., 1995; Zutter et al., 1995)。さらに、 $\beta 1$ -integrin を介したシグナリングは c-MET の活性化を誘導することが明らかとなっている (Mitra et al, 2011)。これらのことから、イヌ乳腺腫瘍細胞においても、膜結合型 TEM8 が vWA ドメインを介して Col-I や Col-VI と接着し、その結果誘導されるシグナリングが c-MET の活性化をもたらすことによって、luminal 細胞の分化・成熟や管腔構造の形成・維持を制御しているのかもしれない。

興味深いことに、多くの carcinoma - solid 腫瘍胞巣においては、TEM8 発現の heterogeneity を示していた。すなわち、同一腫瘍胞巣内において、TEM8 陰性腫瘍細胞で構成された solid 構造と TEM8 陽性腫瘍細胞で構成された luminal 構造が混在していた。luminal 構造を形成する TEM8 陽性腫瘍細胞は CK19/p63/ $\alpha$ SMA (+/+/-) luminal 様の形質を示し、solid 構造を形成する TEM8 陰性腫瘍細胞は CK19/p63/ $\alpha$ SMA (-/+/-) basal 様の形質を示していた。腫瘍細胞の heterogeneity

は、ヒトおよびイヌ乳腺腫瘍に関するいくつかの研究において報告されている (Yoshimura et al., 2014; Skibinski & Kuperwasser, 2015)。Molyneux et al. (2010) は、ヒトの乳癌における多くの basal 様腫瘍細胞は、basal 前駆細胞よりもむしろ luminal 前駆細胞から派生することを示している。さらに近年、luminal 前駆細胞は luminal または basal 細胞の両方への分化能を有することが報告されており、luminal 前駆細胞の中には多彩な乳腺腫瘍の腫瘍細胞における細胞起源としての機能を持つ細胞が存在することを明らかにしている (Tao et al., 2014)。このため、solid 構造を呈するイヌ乳腺腫瘍においては、luminal 前駆細胞から luminal および basal 細胞への二相性の分化が生じている可能性が示唆される。この分化過程の中で、周囲微小環境における Col-I、Col-VI あるいは ETP と膜結合型 TEM8 との接着が生じた部位では、luminal 前駆細胞から luminal 細胞への分化制御に関与しているのかもしれない (Fig. 4-8.)。

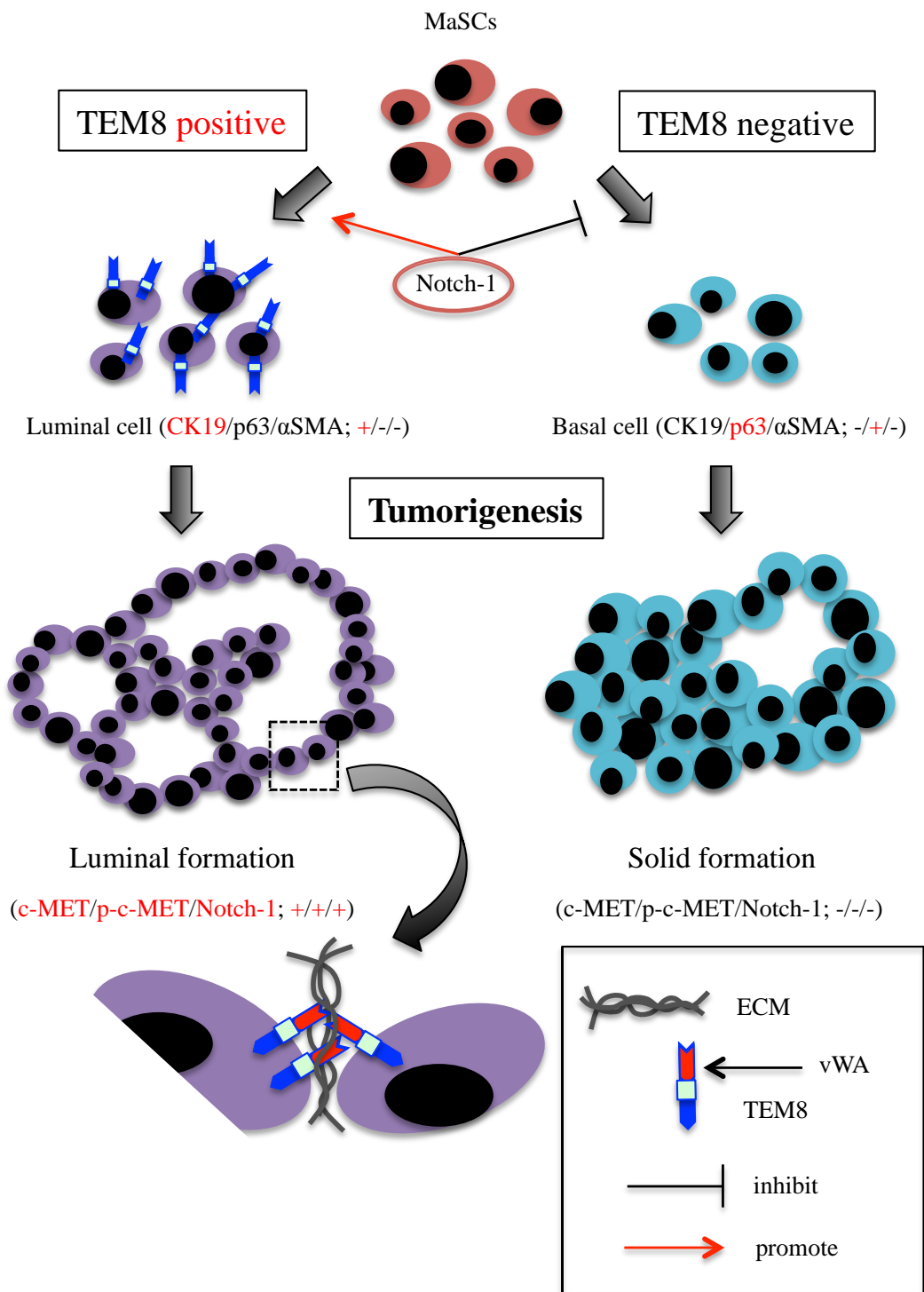


Fig. 4-8. イヌ乳腺腫瘍におけるTEM8発現および組織型との関係

イヌ乳腺腫瘍において、TEM8発現はNotch-1およびc-METタンパクを有意に発現するluminal細胞様腫瘍細胞 (CK19/p63/αSMA; +/-/-) において認められる。TEM8陽性腫瘍細胞はvWAドメインにおいて細胞外マトリックス (ECM) と相互作用を示すことで、乳腺の形態維持 (特に管腔形成) に関与していることが考えられる。

## 第 5 章

### イヌ乳腺腫瘍における Col-VI $\alpha$ 3 鎖 C5-domain 発現と

#### Endotrophin のイヌ乳癌細胞に与える影響

#### および腫瘍細胞の TEM8 発現調節に対する HIF-1 $\alpha$ の作用

##### 5-1 小序

VI 型コラーゲン (Col-VI) は、多くの組織の細胞外マトリックスに存在する微小線維コラーゲンであり、組織構造の維持や間質構造のアンカーとして機能していると考えられている。Col-VIは、多くの分子内および分子間に含まれるとされる von Willebrand Factor A (vWA) ドメインにより大部分の分子が構成された short triple helical 構造を有しており、コラーゲンファミリーの中では稀な構造となっている (Cescon et al., 2015)。Col-VIには、6 つの  $\alpha$  鎖 ( $\alpha$ 1~ $\alpha$ 6) が存在し、最初に  $\alpha$ 1~ $\alpha$ 3 鎖が特定された。その後、配列相同性に基づき、 $\alpha$ 4~ $\alpha$ 6 鎖が特定され、それらは  $\alpha$ 3 鎖に置きかわる構造物であることがわかった (Gara et al., 2008; Fitzgerald et al., 2008; Maaß et al., 2016)。また、Col-VI $\alpha$ 3 鎖 ( $\alpha$ 3) は時期および組織特異的にタンパク分解を受けることがわかっている (Fitzgerald et al., 2001; Aigner et al., 2002; Beecher et al., 2011; Park et al., 2012)。 $\alpha$ 3 の C 末端部位は、2 つの vWA ドメイン (C1、C2)、特異的ドメイン (C3)、フィブロネクチン type III 繰り返し配列 (C4)、そして最末端の Kunitz ドメイン (C5) から構成されている (Fig. 5-1.)。C5-domain は Col-VIの 3 量体微小線維の形成に必要であり、3 量体線維の形成後は Col-VIから分解され、遊離し、Endotrophin (ETP) となる (Aigner et al., 2002; Lamandé et al., 2006; Beecher et al., 2011)。また、ETP および

C5-domain は TEM8 の生理的リガンドであることが明らかとなっている (Nanda et al., 2004)。本章では、まず始めに乳腺腫瘍組織において TEM8 のリガンドである ETP の産生部位を明らかにし、さらに TEM8 を発現する腫瘍細胞と ETP 産生部位との関係性を明らかにするために、イヌ乳腺腫瘍における Col-VI、 $\alpha 3$  および C5-domain の発現および局在を免疫組織化学的に検索した。

次に、我々は TEM8 のリガンドである ETP のイヌ乳癌細胞に与える影響を検索した。ETP は受容体型 TEM8 を活性化し、Wnt シグナルを介した腫瘍幹細胞の自己複製や腫瘍の浸潤・転移および上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) の促進あるいは腫瘍細胞の化学療法抵抗性を引き起こすことがわかっている (Park et al., 2012; Chen et al., 2013; Sun et al., 2014)。また、ETP は、腫瘍周囲の組織の線維化やマクロファージ誘導を引き起こされることも明らかとなっている (Fig. 5-2.) (Park & Scherer et al., 2013)。しかしながら、乳腺腫瘍細胞に対する ETP の作用に関しては、未だ不明な点が多い。また、イヌ乳腺腫瘍細胞に対する ETP の作用は不明である。近年、乳腺上皮細胞の分化過程において、両能性乳腺幹細胞から luminal 前駆細胞あるいは basal 前駆細胞へと分化し、その後、それぞれが成熟した luminal あるいは basal 細胞へと分化することが明らかとなっている。さらに、luminal 前駆細胞は luminal または basal 細胞の両方への分化能を有することが報告されており、luminal 前駆細胞の中には多彩な乳腺腫瘍の腫瘍細胞における細胞起源としての機能を持つ細胞が存在することが明らかにされている (Tao et al., 2014)。我々は、第 4 章において、TEM8 が luminal 細胞への分化や特徴的な形質の維持に関与している可能性を示唆した。そこで、本章では、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞 (CHMp) を用いて、細胞増殖に対する作用を検索した後、ETP のイヌ乳癌細胞の分化に対する作用を検索した。

最後に、我々は腫瘍血管新生に重要である低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; HIF-1 $\alpha$ ) がイヌ乳腺腫瘍細胞の TEM8 発現調節に与える影響を検索し

た。HIF-1 は、低酸素誘導性遺伝子応答のマスター遺伝子であり、腫瘍細胞において様々な標的遺伝子の発現誘導を介して生存シグナルを活性することが示されているが、その作用は生存・増殖のみならず、浸潤、転移および薬剤耐性など多岐に亘ることが知られている (Zagórska & Dulak, 2004)。HIF-1 は、HIF-1 $\alpha$  および HIF-1 $\beta$ /Aryl hydrocarbon receptor-nuclear translocator (ARNT) からなるヘテロ 2 量体であり、これらは Basic helix-loop-helix perid (Per)/Arnt/single-minded (Sim) (bHLH-PAS) 型転写因子ファミリーに属し、それぞれ 826 個 (分子量 120kDa) および 789 個 (分子量 91~94kDa) のアミノ酸で構成されている (Wang & Semenza, 1995; Wang et al., 1995)。正常酸素状態では、HIF-1 $\alpha$  の Oxygen-dependent degradation (ODD) ドメイン内に存在するプロリン残基が Prolyl-hydroxylase (PHD)-2 より水酸化修飾を受ける。その結果、HIF-1 $\alpha$  はユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解される (Maxwell et al., 1999)。低酸素状態では PHD-2 の酵素活性は抑制され、その結果、HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化が生じず、分解されずに核に移行し、HIF-1 $\beta$  と 2 量体形成することでエリスロポエチンや血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) などの標的遺伝子に対する転写活性を示すようになる (Sharp & Bernaudin, 2004)。また、低酸素刺激の代わりに、Deferoxamine (DFO) や塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) の作用によっても HIF-1 $\alpha$  の安定化が誘導されることがわかっている (Maxwell et al., 1999; Prass et al., 2002)。

膜結合型 TEM8 は血管内皮細胞増殖因子受容体 (Vascular endothelial growth factor receptor 2; VEGFR2) と相互作用することで VEGF の下流シグナルを調節し、血管新生に関与することが示唆されている (Jinnin et al., 2008; Verma et al., 2011)。腫瘍の成長には酸素と栄養が必須であり、そのために腫瘍は自身で新血管形成を行っている (Kerbel et al., 2008)。この腫瘍血管新生が、腫瘍原発巣の成長や転移に重要であると考えられている。また、Høye et al. (2018) は TEM8-KO

MDA-MB-231 乳癌細胞株を使用した実験により、可溶型 TEM8 が血管内皮細胞の遊走および腫瘍細胞の浸潤を引き起こすことを明らかにしており、その結果、腫瘍細胞が血管内へ溢出し、転移を促進させることを示唆している。そのため、腫瘍の転移には可溶型 TEM8 発現の増加が重要であると考えられているが、可溶型 TEM8 を含めた TEM8 の発現制御に関しては不明なことが多く、それぞれの TEM8-isoform 発現の調節を明らかにすることが要求されている。今回、腫瘍血管新生に重要な因子である HIF-1 $\alpha$  が、腫瘍細胞における TEM8 発現調節に与える影響を検索するために、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞 (CHMp) に対して DFO および CoCl<sub>2</sub> 処理を行うことで HIF-1 $\alpha$  を誘導させた後、それぞれの腫瘍細胞における TEM8-isoform 発現の変化を Western blot 法により解析した。また同時に、HIF-1 $\alpha$  が TEM8 に対する生理的リガンドの供給源である Col VI ( $\alpha$ 3) および C5-domain 発現に与える影響を検索した。

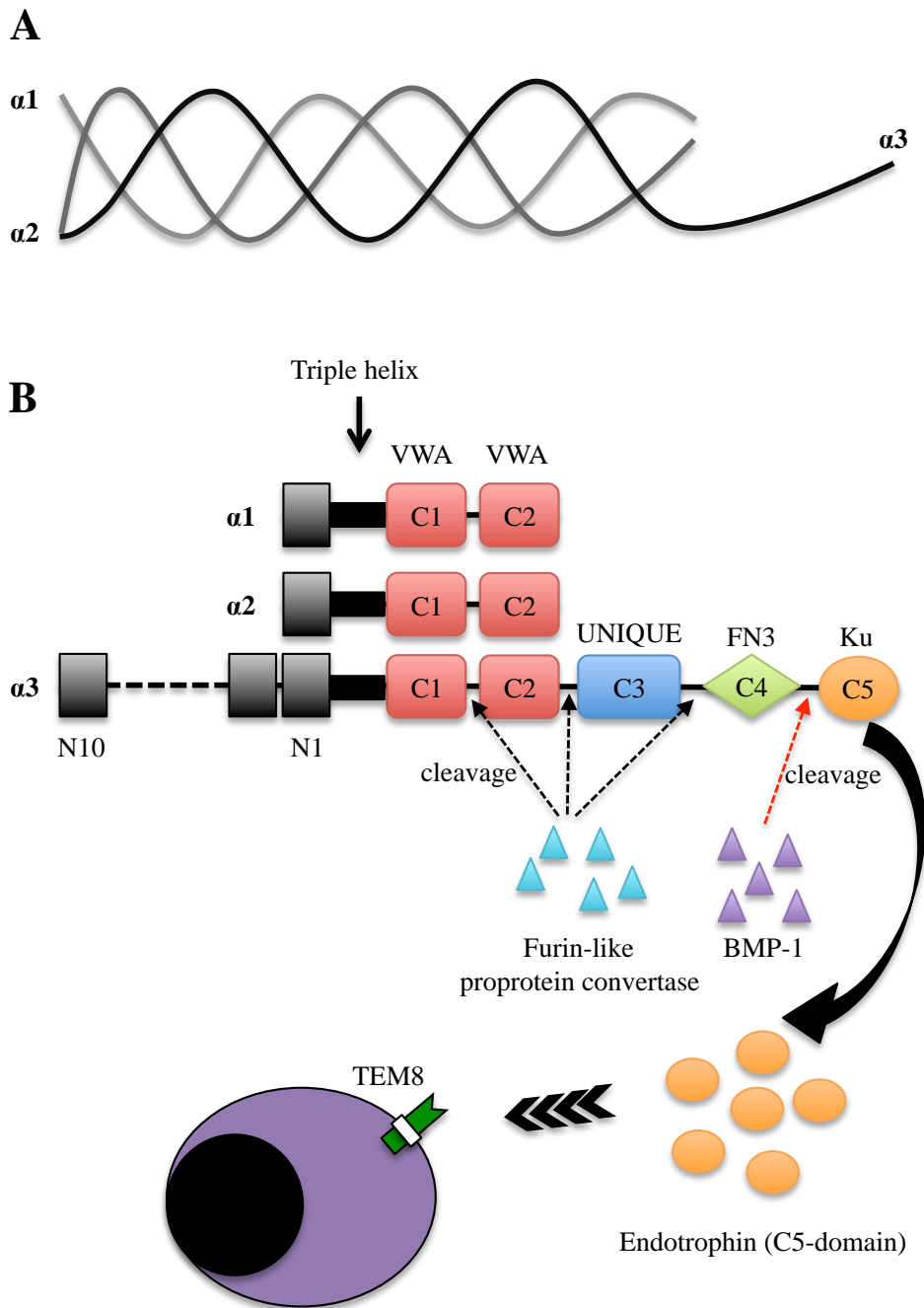


Fig. 5-1. Col-VIの構造およびEndotrophin産生過程

A;  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ および $\alpha 3$ 鎖で構成されたshort triple helical構造を示す。B;  $\alpha 3$ 鎖のC末端部位は2つのvWAドメイン (C1, C2)、特異的ドメイン (C3)、フィブロネクチン type III繰り返し配列 (C4) およびKunitzドメイン (C5) から構成されている。 $\alpha 3$ はFurin様前駆タンパク質転換酵素によりC5-flagment (C2 - C5) へと分解され、さらにBMP-1によりEndotrophin (ETP; C5-domain) が産生される。



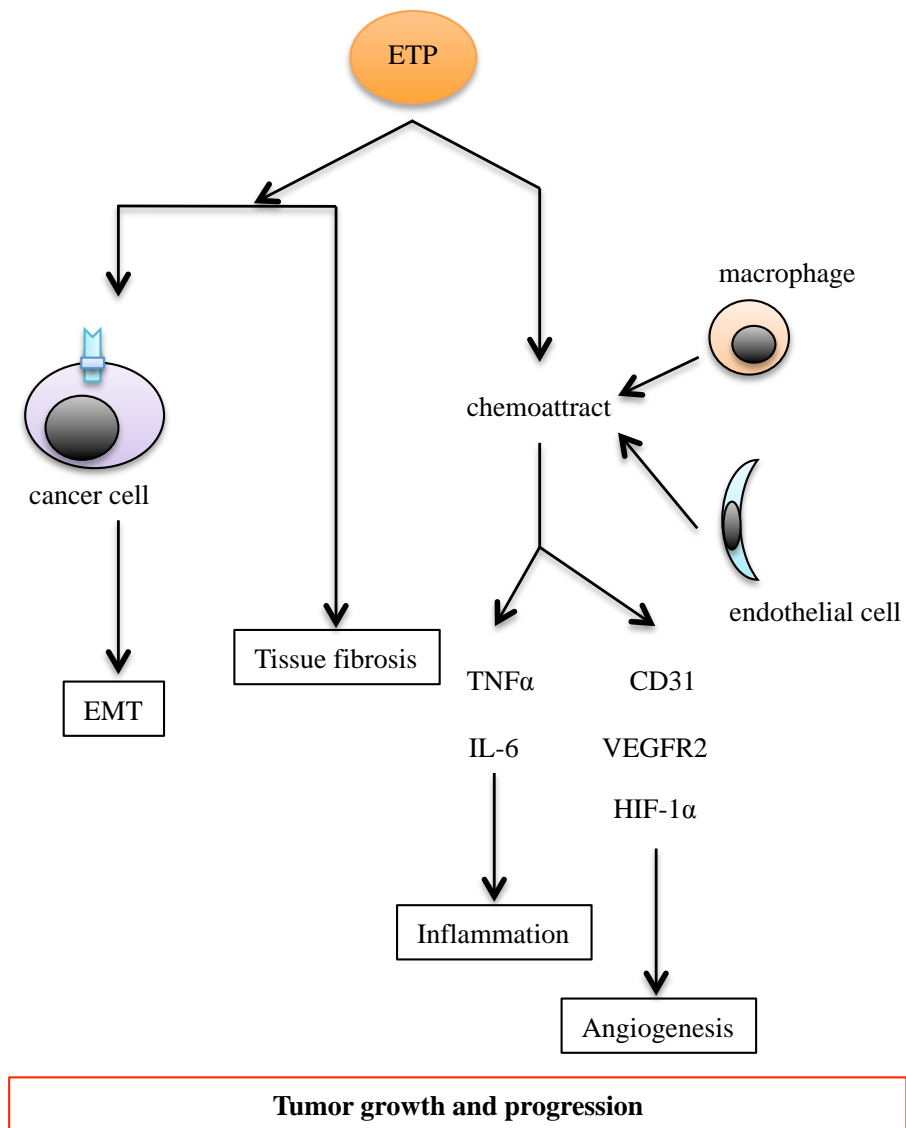


Fig. 5-2. ETPの腫瘍細胞および腫瘍微小環境への作用

ETPは腫瘍細胞の上皮間葉移行 (EMT) を促進させ、周囲組織の線維化やマクロファージ・血管内皮細胞の誘導を引き起こすことで、炎症および血管新生に関与している。

Chen P et al., (2013) から一部改変

## 5-2 材料と方法

### 5-2-1 試供動物

本研究におけるイヌ乳腺腫瘍検体は 2013 年から 2018 年にかけて、日本獣医生命科学大学附属動物医療センターおよび当研究室関連動物病院において、外科的切除を受けた 89 症例を飼い主の同意を得た後、使用した。切除された検体は 10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温、24 時間固定した後、定法に従いパラフィン包埋し、3  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。作製した切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学的検索に用いた。

### 5-2-2 病理組織学的診断

第 4 章と同様に行った。

### 5-2-3 抗体作製

Canine Col- VI  $\alpha 3$  鎖 C5-domain (ペプチドシーケンス; [H] TEPLAGDICKLPKEEGTCRKFMLKWYYDVETKSCMRFWYGGCSGNENRFD SQKECETVCTPALVNPGVIAAMGT [OH]) に対するウサギポリクローナル抗体 (anti-C5-domain Ab) を Sigma custom antibody service (Sigma-Aldrich) にて作製した。

### 5-2-4 免疫組織化学

内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を 60°C にて 60 分間反応させた。次に抗体の非特異的結合を防ぐため、10%正常ヤギ血清 (Dako) (for TEM8,  $\alpha 3$ , C5-domain)、Block Ace (Snow Brand Milk Products Co.) (for Col-VI) を室温で 60 分間反応させた。次に抗 TEM8 ウサギポリクローナ

ル抗体 (1:2,000、Abcam)、抗 C5-domain ウサギポリクローナル抗体 (1:200、Sigma-Aldrich)、抗 Col-VI ウサギポリクローナル抗体 (1:10,000、LB-1697、LSL、Tokyo, Japan) 抗  $\alpha$ 3 ウサギポリクローナル抗体 (1:100、orb223257、Biorbyt Ltd.、Cambridgeshire、UK) を 4°C にて一晩反応させた。続いて、ヒストファイニン プルシステイン MAX-PO (Nichirei Biosciences) を室温にて 30 分間反応させた。最後に、DAB solution (EnVision™+, Dako) で発色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。これら免疫染色の評価として、TEM8 および C5-domain は細胞質において陽性反応が検出された腫瘍細胞の割合が 60%以上であった場合、その組織検体は陽性と判断した。

#### 5-2-5 細胞培養

第 4 章と同様に、Uyama et al. (2006) により樹立されたイヌ乳癌由来細胞株 CHMp を使用した。細胞は  $4.0 \times 10^4$  cells/ml で Dish に播種し、100  $\mu$ g/ml streptomycin (Meiji) と 1,000 U/ml Penicillin G (Sigma-Aldrich) を添加した RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich)/10% fetal bovine serum (FBS、HyClone)、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で増殖させた。

#### 5-2-6 WST-1 細胞増殖試験

腫瘍細胞における ETP の細胞増殖能力を検索するために、96-well/plate に CHM-P イヌ乳癌細胞を  $1.5 \times 10^3$  cells/well (100  $\mu$ l) で播種し、播種後 6 時間後にマウス ETP 合成ペプチド (Phoenix pharmaceuticals Inc., Burlingame, USA) を 10 ng/ml、100 ng/ml および 1  $\mu$ g/ml (PBS (-) により希釈) となるように添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で培養した。また、ETP の代わりに PBS (-) を添加したものをコントロールとして使用した。12 時間培養した後、メーカーが推奨するプロトコールに従って、Premix WST-1 (Takara Bio Inc.) を用いて Cell proliferation

assay を行った。すなわち、播種後 12 時間後に 100  $\mu$ l/well に対して 10  $\mu$ l の Premix WST-1 を添加し、2 時間反応させた後、iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad、Hercules、CA) を用いてバックグラウンドコントロールに対するサンプルの吸光度 (450 nm-750 nm) を測定した。

#### 5-2-7 *in vitro* 創傷治癒 (wound healing) 試験

Muniandy et al. (2018) と Nakasaki et al. (2008) の方法に従って、*in vitro* 創傷治癒試験を行った。すなわち、コンフルエント後に CHMp イヌ乳癌細胞株の上清を回収し、1ml pipette tip で引っかき傷を作った。剥がれた細胞を除去するために PBS (-) で 3 回洗浄した後、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)/ETP (1  $\mu$ g/ml、Phoenix pharmaceuticals Inc.) に変更した。その後、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で 0 時間、あるいは 24 時間培養し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、ヘマトキシリン染色を行ったものを低倍 (対物  $\times$ 5) で撮影し、Image J software (National Institutes of Health) を用いて創傷部位の面積を測定した。

#### 5-2-8 Endotorophin 添加処理、Total RNA 抽出および定量的 real time RT-PCR 解析

CHMp イヌ乳癌細胞は  $4.0 \times 10^4$  cells/ml で Dish に播種し、100  $\mu$ g/ml streptomycin (Meiji) と 1,000 U/ml Penicillin G (Sigma-Aldrich) を添加した RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich)/10% fetal bovine serum (FBS、HyClone)、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で増殖させた。80%コンフルエント時に培養上清を回収した後、PBS (-) で 2 回洗浄し、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)/ETP (1  $\mu$ g/ml) に変更した。その後、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で 24 時間培養し、培養細胞を回収した。採取した培養細胞の細胞層の Total RNA は酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム法 (Chomczynski & Sacchi, 1987) を用いて抽出した。逆転写 (RT) は

ReverTra Dash RT-PCR Kit (Toyobo) を用いて、メーカーが推奨するプロトコールに従って行った。それぞれの反応には 1  $\mu$ g の total RNA を使用した。定量的 real-time RT-PCR は TB Green™ Fast qPCR Mix (Takara Bio Inc.) と Takara Thermal Cycler Dice TP800 (Takara Bio Inc.) を用いて行った。定量的 real time RT-PCR に使用したプライマーは Table. 5-1. に示した。Thermal cycling parameter は Activation; 95°C 30 秒間、続いて Denature; 95°C 5 秒間、Anneal/Extend; 60°C 30 秒間を 40 cycle 繰り返し (2 Step PCR); Dissociation は 95°C 15 秒間、60°C 30 秒間、95°C 15 秒間で行った。内因性コントロールとして GAPDH をおき、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法で定量化した。

#### 5-2-9 HIF-1 $\alpha$ 誘導

5-2-1 で示した方法で細胞培養を行い、70% confluence の段階で培養上清を回収した後、PBS (-) で 2 回洗浄し、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)/100  $\mu$ M deferoxamine (DFO, Sigma-Aldrich) あるいは 150  $\mu$ M Cobalt (CoCl<sub>2</sub>, Wako) に変更した。その後、37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿状態で 24 時間培養した。(Nakamura et al., 2009)

#### 5-2-10 Western blot 解析

培養細胞の細胞層を 0.9% NaCl で洗浄し、10% トリクロロ酢酸/0.9% NaCl を用いて 30 分間 0°C で固定し、8M 尿素/1% ジチオトレイトールおよび 2% Triton X-100 で溶解した (Frischholz et al., 1998)。タンパク質濃度は Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いた Lowry 法で測定し、10  $\mu$ g の total protein を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて分離し、ポリフッ化ビニリデン・メンブラン (Millipore Corp) に転写した。メンブランを Tris 緩衝生理食塩水/0.2% Tween 20 (TBST) で洗浄し、抗体の非特異的結合を阻害するために 1% ECL blocking reagent (GE Healthcare)/TBST を 4°C で一晩反応

させた。メンブランを3回TBSTで洗浄し、抗HIF-1 $\alpha$ ウサギポリクローナル抗体(1:5,000、Abcam)、抗TEM8ウサギポリクローナル抗体(1:5,000、Abcam)、抗C5-domainウサギポリクローナル抗体(1:1,000、Sigma-Aldrich)、あるいは抗 $\beta$ -actinマウスモノクローナル抗体(1:500、Santa Cruz Bio.)を2時間室温で反応させた。洗浄後、メンブランをHRP-標識抗ウサギIgGロバ抗体(1:5,000、GE Healthcare Bio-Sciences AB)、あるいは、HRP-標識抗マウスIgGヒツジ抗体(1:5,000、GE Healthcare Bio-Sciences AB)を室温で30分間反応させた。ブロットはECL prime detection reagents (GE Healthcare Bio-Sciences AB)を用いた化学発光によって検出した。Band densityはImage J software (National Institutes of Health)を用いて評価した。

#### 5-2-11 統計解析

腫瘍細胞におけるC5-domain発現とTEM8発現および組織型分類との統計学的解析は、Pearson's testあるいはone-way ANOVAの後、Tukey *post hoc* testを行った。

その他の結果は平均値 $\pm$ S.D.で示した。統計学的有意差はStudent's *t*-testを使用して評価した。

Table. 5-1. 本章で使用した定量 real time RT-PCR用プライマー

<i>Name</i>	<i>Sequence (5'-3')</i>	<i>Product (bp)</i>	<i>Accession #</i>
<i>TEM8</i>	Forward, CGTCTTAAGCGGGA	423	BC012074
	Reverse, TTCCCGCTTAAG		
<i>CD49f</i>	Forward, TCAGACCCTTAACTGCAGCA	102	XM003640176
	Reverse, CATAACCTCGAGCGCAGAA		
<i>CD49b</i>	Forward, TCTGATGCTGGGTGCAGTAG	483	XM005619334
	Reverse, AACCGAGCATTTTCAACACC		
<i>CD61</i>	Forward, GAGCCCATTTTCTTCTCCCG	143	XM011240600
	Reverse, GCAACACCATGAATCCATCCC		
<i>EpCAM</i>	Forward, TGCTTCGTTCCATCAGGCTT	136	XM005626238
	Reverse, ATCGGAAAAGGCGTGGAAGT		
<i>CD133</i>	Forward, CTTTCTCATGGTCGGAGTTGG	135	NM001314109
	Reverse, TGGAATAGTTTCCTGTTCTGGTAAG		
<i>CD44</i>	Forward, AATGCTTCAGCTCCACCTG	92	NM001197022
	Reverse, CGGTTAACGATGGTTATGGTAATT		

### 5-3 結果

#### 5-3-1 免疫組織化学

イヌ乳腺腫瘍において、Col-VIは間質および線維芽細胞で陽性反応が認められたが、腫瘍細胞での発現は認められなかった (Fig. 5-3A)。しかしながら、Col-VIの構成成分である  $\alpha 3$  および C5-domain は、腫瘍細胞で陽性反応が認められた (Fig. 5-3B,C)。C5-domain 発現に関して、adenoma - simple (19/21 症例)、carcinoma - simple (45/45 症例) および carcinoma - micropapillary invasive (3/3 症例) において、腫瘍細胞で陽性反応が認められた (Table. 5-2.)。これら組織型における C5-domain 発現は、carcinoma - solid よりも統計学的に有意に認められ (Table. 5-2.  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )、また TEM8 発現と有意に相関していた (Table. 5-2.  $p < 0.05$ , Fig. 5-3D)。carcinoma - solid (8/20 症例) において、腫瘍細胞で C5-domain-陽性反応が認められ、他の組織型と同様に TEM8 発現と有意に相関していた (Table. 5-2.  $p < 0.05$ )。

#### 5-3-2 ETP はイヌ乳癌細胞の細胞増殖を促進する

ETP の腫瘍細胞に対する細胞増殖作用を検索するために、CHMp イヌ乳癌細胞に対して ETP を添加した後、WST-1 増殖試薬を用いて吸光度測定を行った結果、濃度依存的に細胞増殖能は増加傾向を示していた (Fig. 5-4、Control 群 vs. ETP-100ng/ml 群;  $p < 0.05$ 、Control 群 vs. ETP-1 $\mu$ g/ml 群;  $p < 0.05$ )。次に、ETP の腫瘍細胞に対する細胞増殖および運動活性を検索するため、*in vitro* 創傷治癒試験を行った。その結果、Control 群と比較して、ETP-1 $\mu$ g/ml 群では創傷面積 (wound area) が有意に減少していた (Fig. 5-5、24h、Control 群 vs. ETP-1 $\mu$ g/ml 群;  $p < 0.05$ )。



### 5-3-3 ETP は luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞の形質を変化させる

ETP の腫瘍細胞の表現型に対する影響を検索するために、ETP-1 $\mu$ g/ml で 24 時間処理を行った CHMp 乳癌細胞において、乳癌幹細胞マーカーである CD49f (Integrin alpha 6)、EpCAM、CD133 および CD44、また、luminal 前駆細胞マーカーである CD49b (Integrin alpha 2) および CD61 の mRNA 発現を定量的 real time RT-PCR によって解析した (Fig. 5-6)。その結果、ETP-1 $\mu$ g/ml 群は Control 群に比較して、乳癌幹細胞マーカーである CD44 および luminal 前駆細胞マーカーである CD49b mRNA 発現を有意に増加させていた (CD44;  $p < 0.05$ 、CD49b;  $p < 0.01$ )。また、ETP の TEM8 mRNA 発現に対する影響を検索した結果、ETP-1 $\mu$ g/ml 群は Control 群に比較して、TEM8 mRNA 発現を有意に増加させていた ( $p < 0.05$ )。

### 5-3-4 HIF-1 $\alpha$ 誘導により、TEM8-short isoform 発現は増加する

DFO および CoCl<sub>2</sub> 処理により HIF-1 $\alpha$  誘導を受けた CK19/p63 (+/-) luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞; CHMp (HIF-1 $\alpha$ -induced 群) と、通常培養した CHMp (Control 群) において、TEM8-isoform 発現を Western blot 法により検索した結果、HIF-1 $\alpha$ -induced 群における long isoform 発現が有意に低下しており、short isoform 発現に変化は認められなかった (Fig. 5-7.  $p < 0.05$ )。しかしながら、total TEM8 発現に対するそれぞれの TEM8-isoform 発現を相対的に解析した結果、HIF-1 $\alpha$ -induced 群における short isoform 発現の割合は有意に増加していた (Fig. 5-7.  $p < 0.05$ )。

### 5-3-5 HIF-1 $\alpha$ 誘導により、Col-VI $\alpha$ 3 発現は減少する

HIF-1 $\alpha$ -induced 群と Control 群において、 $\alpha$ 3 および C5-domain のタンパク発現を Western blot 法により検索した結果、HIF-1 $\alpha$ -induced 群における  $\alpha$ 3 発現は有意に減少していた (Fig. 5-8.  $p < 0.05$ )。また、HIF-1 $\alpha$ -induced 群における

C5-domain 発現も減少傾向を示していた (Fig. 5-8. Control 群 vs. DFO 処理群; n.s., Control 群 vs. CoCl<sub>2</sub> 処理群;  $p < 0.05$ )。

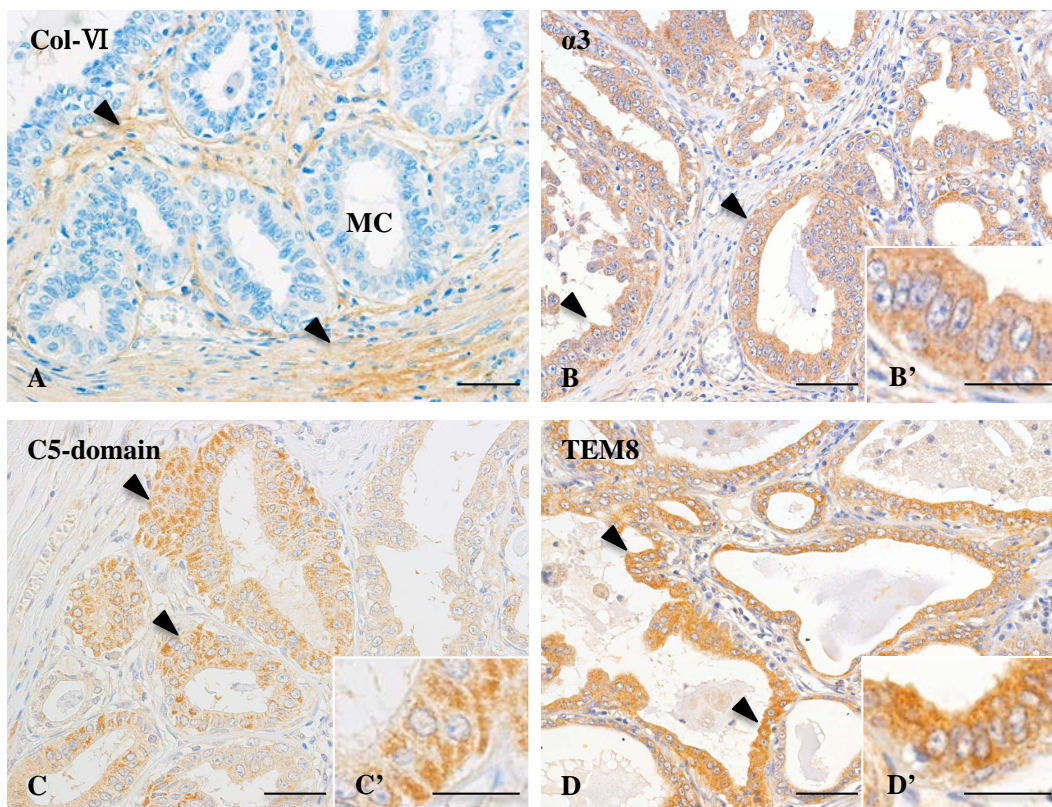


Fig. 5-3. イヌ乳腺腫瘍におけるCol-VI、 $\alpha 3$ 、C5-domain  
およびTEM8-免疫組織化学 (IHC)

(A) Col-VI-IHC; 乳腺上皮 (MC) の周囲の間質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。腫瘍細胞において、陽性反応は認められない。(B)  $\alpha 3$ -IHC, (B') 高倍率; 腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(C) C5-domain-IHC, (C') 高倍率; 腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。(D) TEM8-IHC, (D') 高倍率; 腫瘍細胞の細胞質において、陽性反応 (矢頭) が認められる。A, B, C, D: Scale bars = 50 $\mu$ m、B', C', D': Scale bars = 25 $\mu$ m

Table. 5-2. Expression of C5-domain and TEM8 in canine mammary gland tumor

<i>Histological type</i>	<i>C5-domain / TEM8<sup>†</sup> positive (%)</i>	<i>Number of samples</i>
Adenoma - simple	19** (90.5)	21
Carcinoma - simple	45** (100)	45
Carcinoma - micropapillary invasive	3* (100)	3
Carcinoma - solid	8 (40)	20

C5-domain carcinoma cells were significantly more often present in simple adenomas, simple carcinomas and invasive micropapillary carcinomas compared with solid carcinomas (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ). C5-domain expression significantly correlated with TEM8 (†:  $p < 0.05$ ).

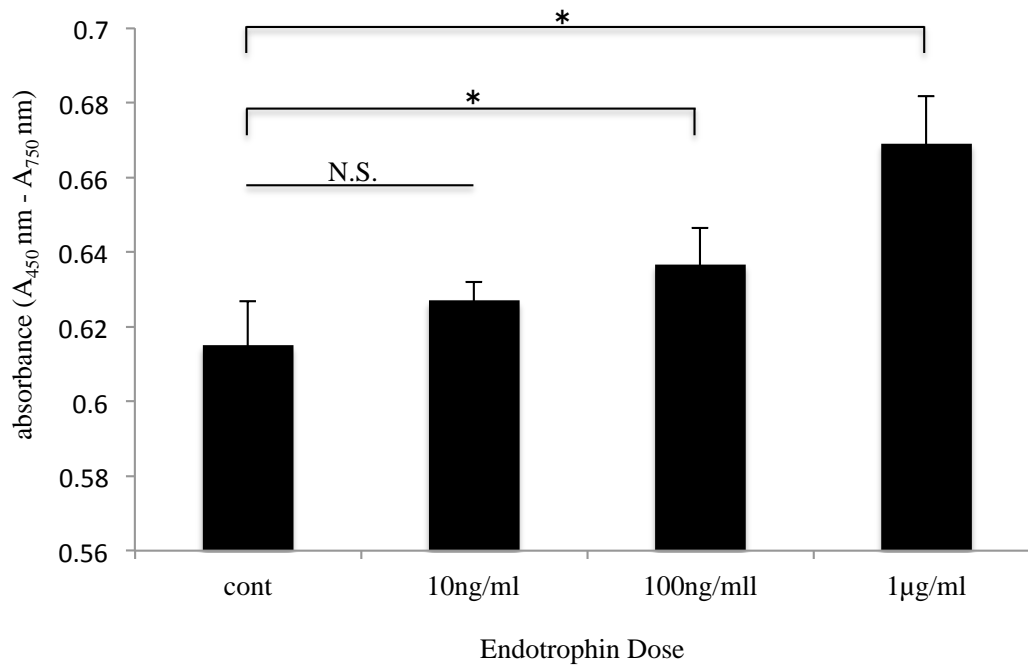


Fig. 5-4. イヌ乳癌細胞の細胞増殖に対するETPの作用

CHMpに対するETPの細胞増殖能力を検索するために、細胞を播種した6時間後にマウスETP合成ペプチドを10 ng/ml, 100ng/ml, 1µg/mlおよびControl (PBS) を添加し、12時間培養した。ETP濃度依存的に細胞増殖能が増加していることを示す (Control群 vs. ETP-100ng/ml群、Control群 vs. ETP-1µg/ml群; \*  $p < 0.05$ )。データはすべて平均値 ± S.D. (n=3) で示し、統計解析はStudent's *t*-testを行った。

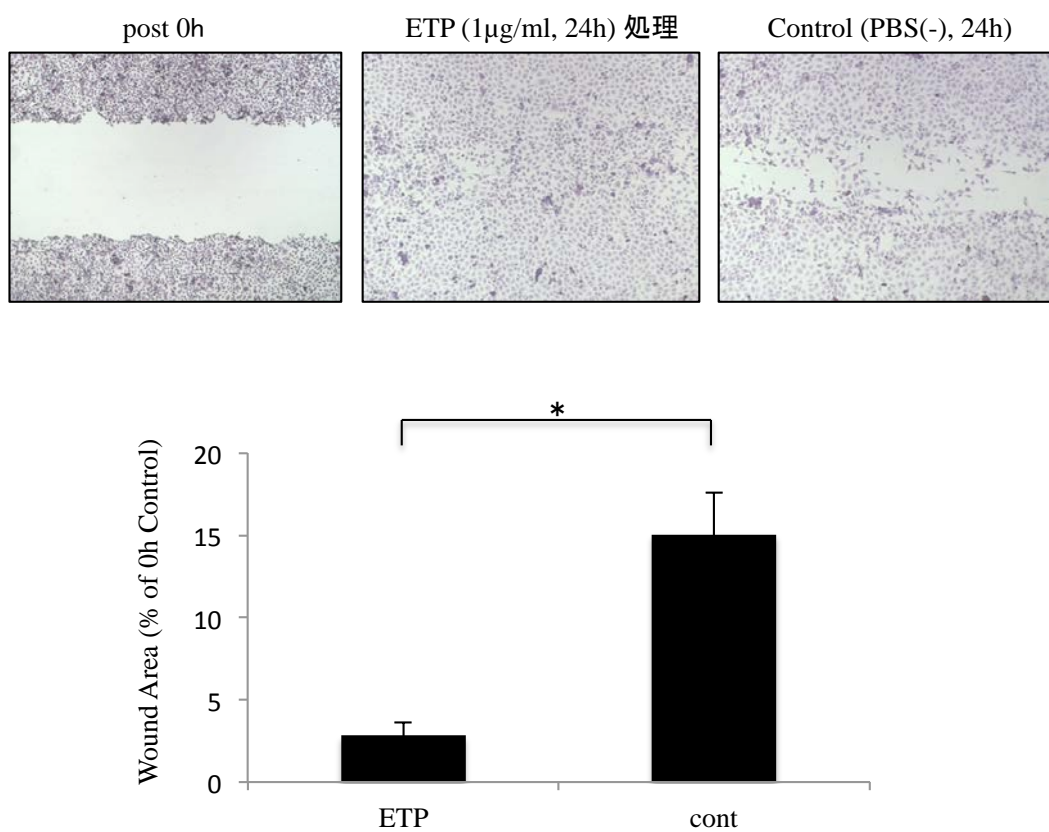


Fig. 5-5. ETPを用いたイヌ乳癌細胞における*in vitro* 創傷治癒試験

ETPを添加していないCHMp (Control)、あるいは1µg/ml ETPを添加したCHMp (ETP) をそれぞれ培養し、コンフルエント後に引っかき傷をつくり、24時間後の創傷領域を測定した。  
 データはすべて平均値 ± S.D. (n=3) で示し、統計解析はStudent's *t*-testを行った (Control群 vs. ETP-1µg/ml群; \*  $p < 0.05$ )。

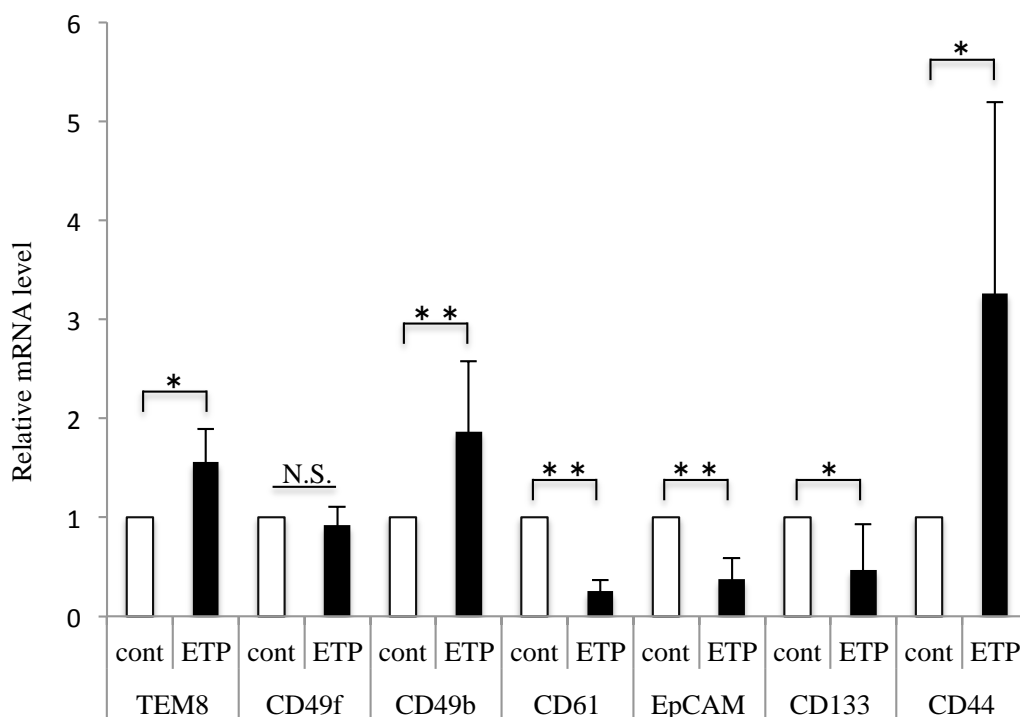


Fig. 5-6. ETPのイヌ乳癌細胞における *TEM8* および細胞表面マーカー mRNA 発現に対する作用

CHMpを80%コンフルエントまで培養した後、RPMI-1640/ETP (1 $\mu$ g/ml) あるいはRPMI-1640/PBS (Control) に変更し、24時間培養した。その後、total RNAを抽出し、定量real time RT-PCRを行った。ETPは*TEM8* mRNA発現を増加させることを示す。また、乳癌幹細胞マーカーである*EpCAM*および*CD133* mRNA発現を有意に低下させ、*CD44* mRNA発現を有意に増加させることを示す。さらに、luminal前駆細胞マーカーである*CD49b* mRNA発現を有意に増加させ、*CD61* mRNA発現を有意に低下させることを示す。データはすべて平均値 $\pm$ S.D. (n=3) で示し、統計解析はStudent's *t*-testを行った (Control vs. ETP; N.S. 有意差なし. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ )。

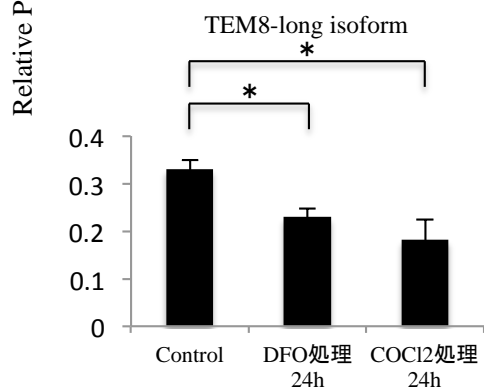
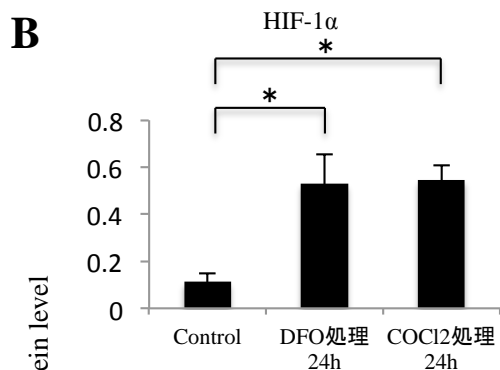
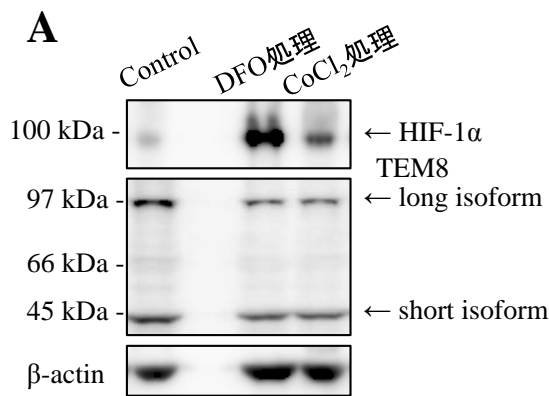
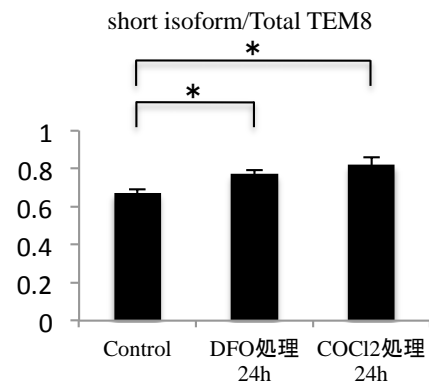
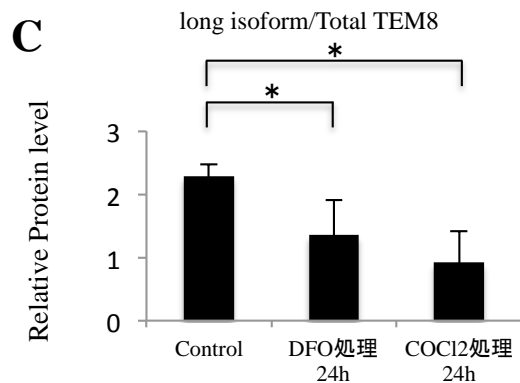
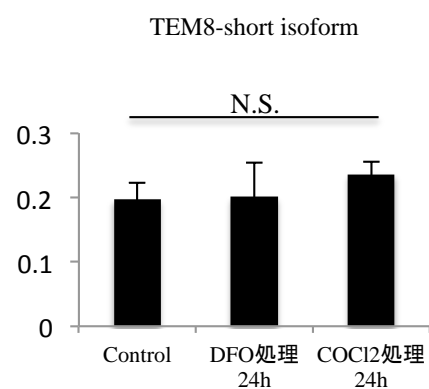


Fig. 5-7. HIF-1αによるTEM8-isoform発現に対する影響

A; DFOおよびCoCl<sub>2</sub>処理によりHIF-1α誘導されたCHMpにおいて、TEM8-pAbを用いてwestern blot解析を行った。B; β-actinバンドによって、ノーマライズしたHIF-1α、TEM8-long isoformおよびTEM8-short isoformタンパク質の相対量を示す。C; 同一メンブロンにおけるtotal TEM8 (long isoformおよびshort isoform) に対するTEM8-long isoformおよびTEM8-short isoformタンパク質の占める割合を示す。データはすべて平均値 ± S.D. (n = 5) で示し、統計解析はStudent's *t*-testを行った (Control vs. DFOおよびCoCl<sub>2</sub>; N.S. 有意差なし。\* *p* < 0.05)。





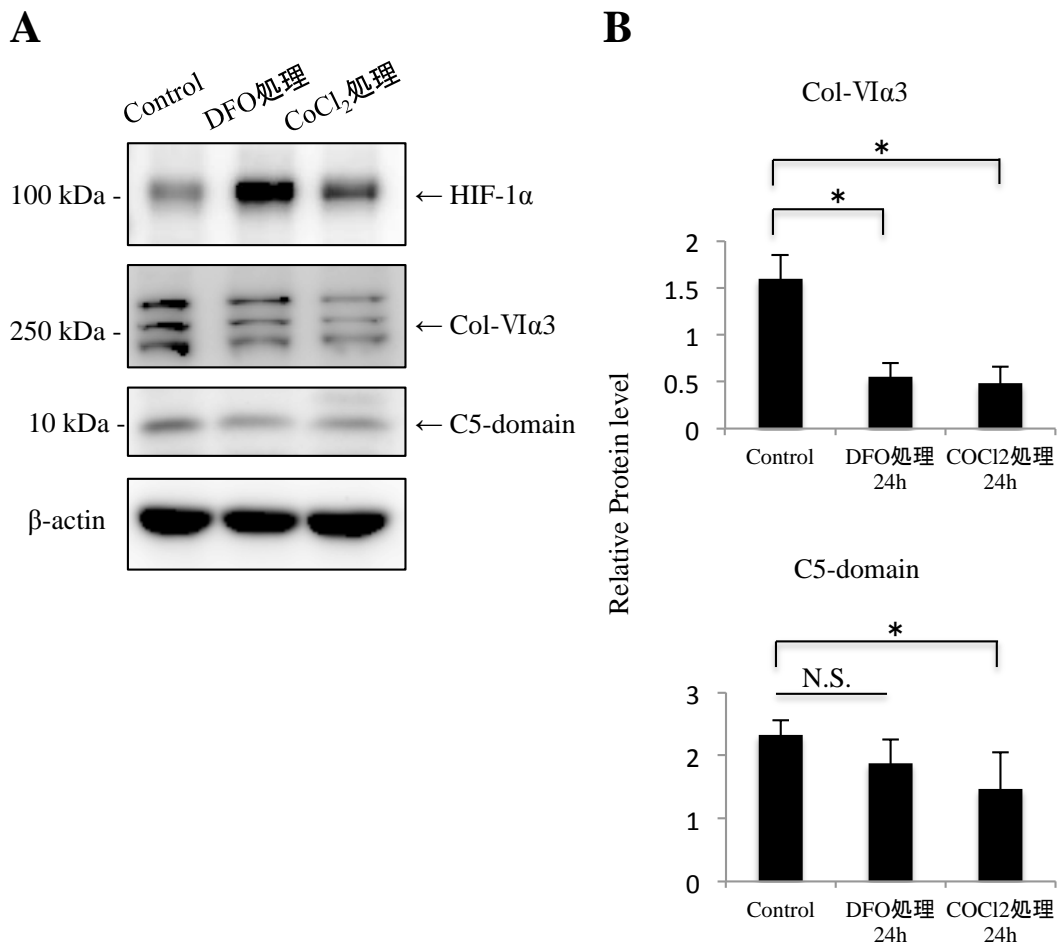


Fig. 5-8. HIF-1αによるCol-VIα3およびC5-domain発現に対する影響

A; DFOおよびCoCl<sub>2</sub>処理によりHIF-1α誘導されたCHMpにおいて、抗C5-domain抗体を用いてwestern blot解析を行った。B; β-actinバンドによって、ノーマライズしたCol-VIα3およびC5-domainタンパク質の相対量を示す。データはすべて平均値 ± S.D. (n = 5) で示し、統計解析はStudent's *t*-testを行った (Control vs. DFOおよびCoCl<sub>2</sub>; N.S. 有意差なし。\* *p* < 0.05)。

#### 5-4 考察

始めに、我々はイヌ乳腺腫瘍における TEM8 および C5-domain の関係性を明らかにするために、イヌ乳腺腫瘍 89 症例を用いて、TEM8、Col-VI、 $\alpha 3$  および C5-domain の発現を免疫組織化学的に検索した。その結果、TEM8 と C5-domain の発現は有意に相関していた ( $p < 0.05$ )。また同様に、 $\alpha 3$  の発現は腫瘍細胞においても認められた。高次構造を形成する Col-VI は間質組織に局在していたが、腫瘍細胞での発現は認められなかった。このことから、TEM8 を発現する腫瘍細胞は、そのリガンド ETP の供給源である  $\alpha 3$  および C5-domain を発現することが明らかとなった。 $\alpha 3$  および C5-domain は Col-VI の 3 量体微小線維の形成過程に必要であり、形成後は Col-VI から分解され、C5-domain を欠いた Col-VI の 3 量体線維は間質に沈着し、細胞外基質として機能する (Aigner et al., 2002; Lamandé et al., 2006)。また、細胞内で Col-VI  $\alpha 3$  は Furin 様前駆タンパク質転換酵素によって分解され、C5-fragment (C5-domain を含んだ断片) が生成される (Heumüller et al., 2019)。さらに、遊離した C5-fragment は Bone morphogenetic protein 1 (BMP-1) によって分解され、最終的に C5-domain のみで形成された ETP となる (Fig. 5-1.)。今回の免疫組織化学において、腫瘍細胞で  $\alpha 3$  および C5-domain の発現が顕著に認められた。このため、腫瘍細胞は C5-domain を持つ Col-VI  $\alpha 3$  を産生することで、間質組織における Col-VI の形成に関与しているものと考えられた。さらに、腫瘍細胞は TEM8 のリガンドである ETP の前駆体を産生していることが明らかとなった。腫瘍細胞における TEM8 の発現と C5-domain の発現は有意に相関していたことから、イヌ乳腺腫瘍細胞においては、ETP/TEM8 のオートクライン/パラクラインループが存在し、これによって誘導された細胞内シグナリングが腫瘍細胞の動態を制御している可能性が考えられた。

ETP は、Park & Scherer, (2012a) によって初めて同定されたペプチドであり、

腫瘍の成長、転移促進および周囲組織の線維化に重要であることが明らかとなっている (Park & Scherer, 2012b)。また、腫瘍細胞以外では、ETP は、マクロファージの化学走化性因子、血管内皮細胞の遊走性増強、EMT 刺激などの機能を持つことが報告されている (Bu et al., 2019)。本研究において、我々は ETP のイヌ乳癌細胞に対する作用を明らかにするために、イヌ乳癌細胞株を用いて、ETP 刺激を実施した結果、WST-1 増殖試験および *in vitro* 創傷治癒試験において、ETP はイヌ乳癌細胞に対して細胞増殖を促進させることが明らかとなった。また、real time RT-PCR 解析の結果では、Control 群と比較して ETP 処理群における *TEM8* mRNA 発現が有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。このことから、イヌ乳癌細胞において、ETP は受容体である *TEM8* の発現を促進することによって、ETP/*TEM8* シグナリングを亢進させているものと考えられた。

次に、ETP の腫瘍細胞の分化に対する作用を明らかにするために、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞株を用いて、ETP 刺激による乳癌幹細胞および luminal 前駆細胞のマーカーの発現の変化を real time RT-PCR 法によって検索した。これまでのいくつかの研究の結果から、*CD49f*、*CD133* および *CD44* は乳癌幹細胞で、*CD49b* (*Integrin alpha 2*) および *CD61* は luminal 前駆細胞で発現が亢進していることが報告されている。さらに *EpCAM* は luminal 細胞への成熟過程で発現が亢進するが、basal 前駆細胞および basal 細胞では発現が減少している (Stingl et al., 2006; Shackleton et al., 2006; Sleeman et al., 2006; Sleeman et al., 2007; Asselin-Labat et al., 2007; Asselin-Labat et al., 2011; Shehata et al., 2012)。本研究の結果、luminal 前駆細胞のマーカーである *CD49b* mRNA の発現の増加、乳癌幹細胞で高い発現を示す *CD133* mRNA の減少、および luminal 細胞への成熟過程で増加する *EpCAM* mRNA の減少が認められた。これらの結果から、ETP はイヌ乳癌細胞において、luminal 前駆細胞の形質の発現を促進し、乳癌幹細胞や成熟 luminal 細胞の形質の発現を抑制することが示唆された。また、乳癌を含めた様々

な腫瘍における幹細胞マーカーとして知られている CD44 発現を同時に検索した結果、ETP 刺激によって *CD44* mRNA 発現が有意に増加した (CD44:  $p < 0.05$ )。luminal 前駆細胞の中で、CD44+ luminal 前駆細胞は CD44- luminal 前駆細胞と比較して、高い増殖能を持つことが明らかとなっている (Knapp et al., 2017)。さらに、今回、ETP 刺激によって、*CD61* mRNA の有意な減少が認められた。CD61 は、luminal 前駆細胞に高発現することが知られているが (Stingl et al., 2006; Shackleton et al., 2006; Sleeman et al., 2006; Sleeman et al., 2007; Asselin-Labat et al., 2007; Asselin-Labat et al., 2011; Shehata et al., 2012)、近年、Zhang et al. (2016) は、成熟した luminal 細胞は CD61 low の形質を示す細胞集団であることを示している。このため、CD61 を発現している luminal 前駆細胞から成熟 luminal 細胞への分化の過程で CD61 の減少が生じているものと考えられる。従って、ETP 刺激によって誘導された CD49b 発現の亢進と CD61 発現の減少は、luminal 前駆細胞から luminal 細胞への分化過程にある細胞の形質を反映しているのかもしれない。以上の結果から、イヌ乳腺腫瘍細胞において、ETP/TEM8 シグナリングは、高い増殖能を有する luminal 前駆細胞への分化を促進し、さらに成熟 luminal 細胞への最終分化を抑制することによって、イヌ乳腺腫瘍細胞を EpCAM-/CD49b+/CD61- の形質を示す luminal 前駆細胞の分化段階に維持している可能性が示唆された。しかしながら、CD61 の分化マーカーとしての特異性に関しては不明な点が多く、また乳腺上皮細胞や乳腺腫瘍細胞における CD61 の機能も明らかではない。このため、今回認められた *CD61* mRNA 発現の減少の意義を明らかにするためには、さらに詳細な検索を行う必要があるものと考えられる。

細胞表面タンパクである CD44 は、EMT の過程において重要な因子であると考えられている (Al-Hajj et al., 2003; Jin et al., 2006; Dalerba et al., 2007; Fillmore & Kuperwasser, 2007; Li et al., 2008; Liu et al., 2007; Prince et al., 2007; Brown et al., 2011; Reinke et al., 2012)。また、CD44 には多くの splicing variants が存

在し、exon 配列の発現変化に伴い腫瘍細胞の増殖、生存、浸潤および転移が促進されることが報告されている (Ouhtit et al., 2007; Mima et al., 2012; Hiraga et al., 2013; Zhao et al., 2016)。このため、本研究で認められた ETP 刺激による細胞増殖の亢進は、CD44 の発現の増加に起因している可能性も示唆された。しかしながら、Rogez et al. (2018) は、イヌ乳腺腫瘍における組織化学的な検索において、CD44 は管腔構造を示す腫瘍細胞に有意に多く発現し、組織学および臨床学的な悪性度との関連性は認められないことを明らかにしている。このため、イヌ乳腺腫瘍における CD44 の機能を明らかにし、ETP による CD44 発現の亢進の重要性を明らかにするためには、さらに詳細な検索が必要であると考えられた。

最後に我々は、腫瘍細胞における HIF-1 $\alpha$  の TEM8 発現調整に対する作用を検索した。一般的に、固形癌の組織において、腫瘍細胞は非常に活発な増殖を示すのに対し、腫瘍内部における血管形成速度は遅く、形成された腫瘍血管は極めて脆弱で蛇行している。そのため、形成された腫瘍血管は閉塞や血液の逆流を容易に引き起こすとされている。それに伴い、腫瘍への酸素供給が不十分となることで低酸素領域が生じ、HIF が活性化することがわかっている (Brown et al., 2004)。腫瘍における HIF 発現の増加と予後不良に正の相関が認められていることから、HIF は癌研究において大きな注目を集めている。これまでに、転移と HIF の関係が明らかになってきており、HIF-1 は Lysyl oxidase (LOX) および LOX 様タンパクを誘導することで腫瘍細胞の浸潤を促進させ、腫瘍細胞生着に適した pre-metastatic niche を形成し、転移を誘発することが明らかとなっている (Wong et al., 2012)。

今回、DFO および CoCl<sub>2</sub> 処理により HIF-1 $\alpha$  を誘導したイヌ乳癌細胞における TEM8、 $\alpha$ 3 および C5-domain 発現に対する影響を検索した。その結果、HIF-1 $\alpha$  誘導されたイヌ乳癌細胞における TEM8-long isoform 発現は有意に減少し ( $p < 0.05$ )、TEM8-short isoform 発現は相対的に増加していた ( $p < 0.05$ )。TEM8-short isoform は可溶性因子として機能する V3 および V5 を認識していることから、

HIF-1 $\alpha$  は可溶性 TEM8 発現の増加を引き起こす可能性が示唆された。Høye et al. (2018) は、可溶性 TEM8 が血管内皮細胞の遊走と腫瘍細胞の浸潤を誘発することで癌転移に関与し、この作用が転移には重要であることを明らかにしている。このため、HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞に対して可溶性 TEM8 発現を相対的に増加させることで、転移効率を上昇させている可能性が考えられた。また、Control 群と比較して、HIF-1 $\alpha$ -induced 群における  $\alpha 3$  発現および C5-domain 発現は減少していた ( $\alpha 3$ ;  $p < 0.05$ 、C5-flagment; n.s.)。腫瘍における Col VI の発現および局在に関する研究は、いくつか報告されており、膠芽腫、メラノーマ、卵巣癌および乳癌などの様々な腫瘍において発現していることがわかっている (Paulus et al., 1988; Burchardt et al., 2003; Sherman-Baust et al., 2003; Iyengar et al., 2005; Motrescu et al., 2008)。また、膵臓癌や乳癌の間質組織において、 $\alpha 3$  が発現していることも報告されている (Iyengar et al., 2005; Arafat et al., 2011)。これら腫瘍組織において合成・分泌された Col VI あるいは Col VI 分解産物である ETP が、腫瘍細胞の遊走および浸潤を促進させることで転移に関与することが明らかにされている (Han & Daniel, 1995; Wright et al., 2008; Park & Scherer, 2012b)。Park & Scherer (2012b) は、ETP トランスジェニックマウスから採取した腫瘍組織における *HIF-1 $\alpha$*  mRNA 発現が増加していることを明らかにしており、このことから ETP は HIF-1 $\alpha$  を介することで血管新生を促進する可能性が示唆されている。興味深いことに、今回、イヌ乳癌細胞において HIF-1 $\alpha$  誘導を行ったところ、腫瘍細胞での  $\alpha 3$  および C5-domain 発現が減少することが明らかとなった。これは、HIF-1 $\alpha$  が腫瘍細胞に対してネガティブフィードバック様調節を示すことで、ETP 産生・分泌を抑制している可能性が考えられた。以上より、HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞に対して、可溶性 TEM8 発現を増加させることで腫瘍血管新生を促進させ、転移を増強させると同時に、Col-VI  $\alpha 3$  鎖および C5-domain 発現を減少させることで腫瘍組織内における ETP の作用を減弱させているのかもしれない。つまり HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞に

における ETP の受容体型 TEM8 に対する作用経路よりもむしろ、腫瘍細胞による可溶型 TEM8 の作用を増強させることで悪性挙動を可塑性に変化させることが予想された (Fig. 5-9)。

以上より、本章における *in vivo* および *in vitro* で示された結果から、イヌ乳腺腫瘍細胞は ETP の供給源である C5-domain およびその受容体である TEM8 を発現することで、luminal 前駆細胞の形質を維持し、その結果、乳腺腫瘍における多彩な細胞・組織の形態学的変化を引き起こしているのかもしれない (Fig. 5-10)。また、それら TEM8 陽性腫瘍細胞の細胞運命は HIF-1 $\alpha$  によって左右されることが予想された。

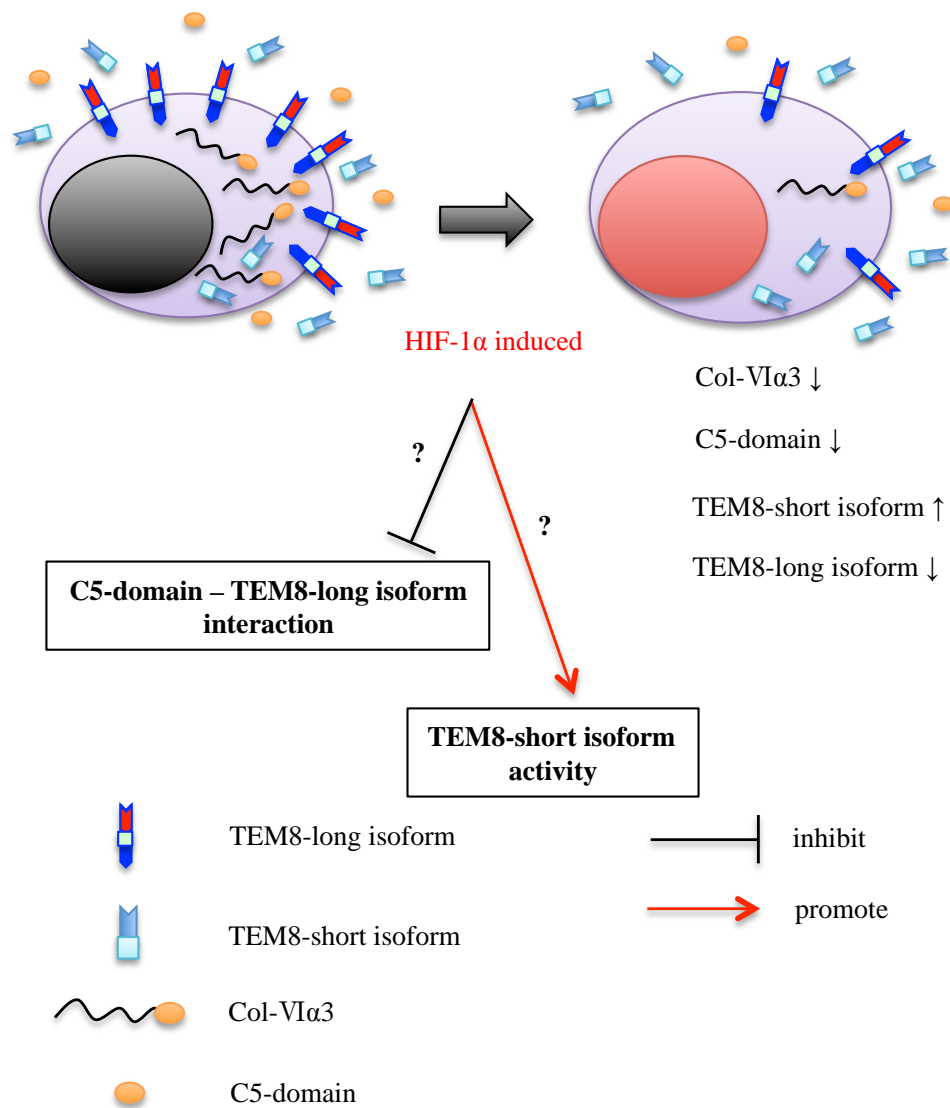


Fig. 5-9. イヌ乳癌細胞におけるHIF-1 $\alpha$ のTEM8およびC5-domain発現調節



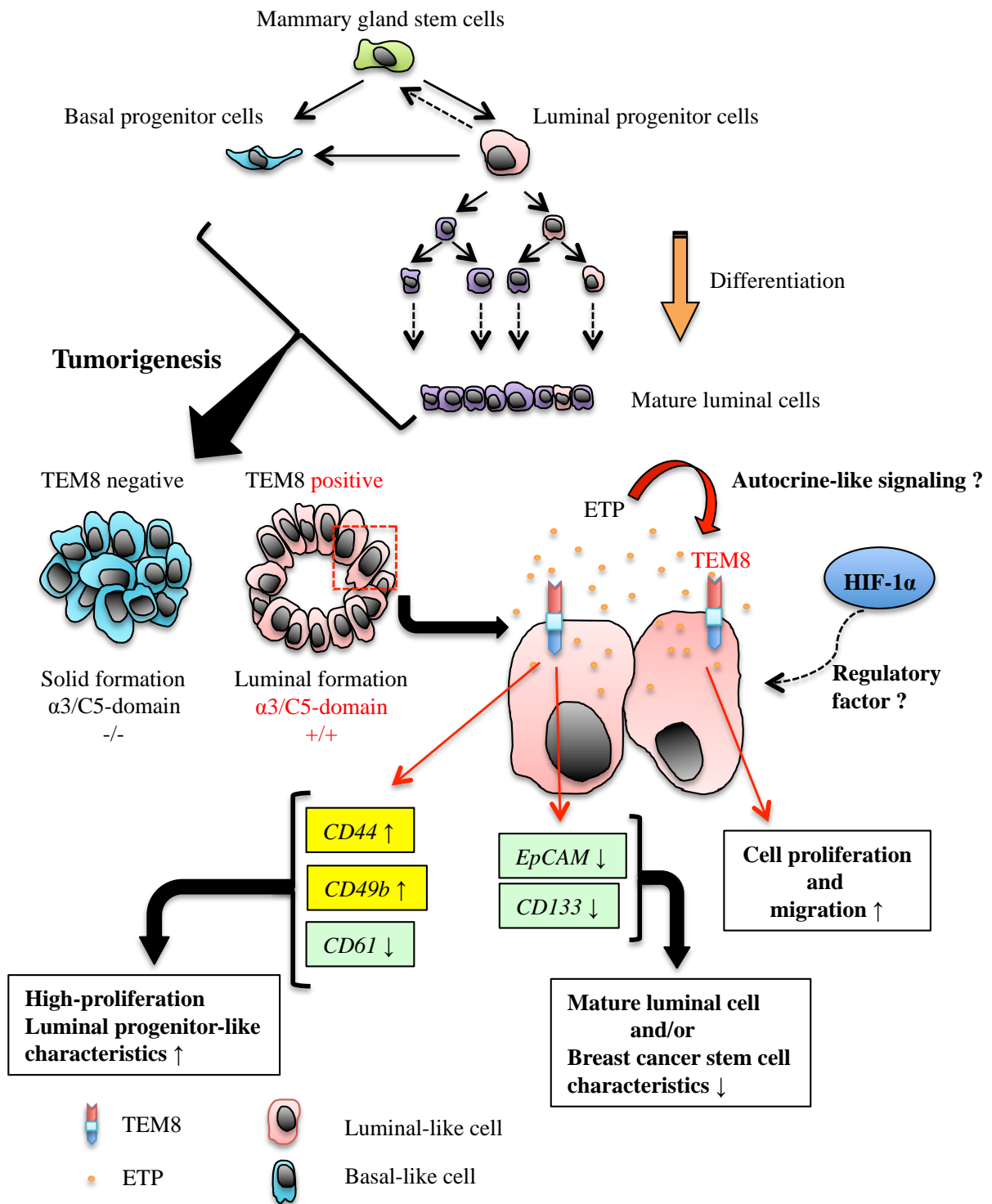


Fig. 5-10. イヌ乳癌細胞におけるTEM8およびETPの作用に関する仮説

イヌ乳腺腫瘍細胞において、TEM8はluminal様腫瘍細胞で発現している。また、TEM8陽性腫瘍細胞はC5-domain発現を発現することで、高い増殖能を持ったluminal前駆細胞の形質を維持していることが示唆される。また、腫瘍細胞におけるTEM8およびC5-domain発現はHIF-1 $\alpha$ により調節されている可能性が考えられる。

## 第 6 章

### 総括

Tumor endothelial marker 8 (TEM8) は、腫瘍内の血管内皮細胞に高度に発現する TEM 遺伝子ファミリーの 1 つであり、Anthrax toxin receptor (炭疽菌毒素受容体、ANTXR1) としても知られている。TEM8 は腫瘍内の血管内皮で高度に発現しており、腫瘍内の血管新生を促進することによって腫瘍の増大を引き起こすものと考えられている。

ヒトおよびマウスの正常な組織においては、TEM8 は広範囲にわたって発現していることが明らかとなっており、さらに TEM8 knock out マウスを用いた研究結果から、TEM8 は結合組織における細胞外基質の恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。これまでに、TEM8 mRNA には 5 つの splicing variants が存在し、分子の構造から、3 種類の膜結合型 (V1、V2、V4) と 2 種類の可溶型 (V3、V5) が同定されている。また、TEM8 タンパクは、分子量の違いから 3 種類 (long、medium、short isoforms) に分類されている。さらに、組織によって TEM8-isoform 発現パターンが異なることが報告されている。TEM8 は、細胞外ドメインを構成する von Willebrand factor type A (vWA) ドメインを介して、I 型コラーゲン (Col-I)、VI 型コラーゲン (Col-VI)  $\alpha 3$  鎖 C5-domain、および C5-domain の分解・遊離によって産生された Endotrophin と結合することが知られており、膜結合型 TEM8 とこれらのリガンドが結合することによって、細胞内骨格の変化が生ずることが報告されている。近年、TEM8 はいくつかのタイプの腫瘍細胞に発現していることが明らかとなっており、腫瘍細胞の動態を制御する重要な因子である可能性が示唆されている。しかしながら、腫瘍症例において、腫瘍細胞における TEM8 の発現に関しては、ほとんど報告がなく、その機能に関しては

未だ不明な点が多い。さらにイヌにおける TEM8 の発現および局在は明らかにされていない。しかしながら、腫瘍症例において、腫瘍細胞における TEM8 の発現に関しては、ほとんど報告がなく、その機能に関しては未だ不明な点が多い。さらにイヌにおける TEM8 の発現および局在は明らかにされていない。

本研究は、イヌの正常組織および乳腺腫瘍における TEM8 の発現と TEM8 陽性腫瘍細胞の形質的特徴、TEM8 のリガンドである Endotrophin (ETP) のイヌ乳腺腫瘍細胞に対する作用、およびイヌ乳腺腫瘍細胞における TEM8 発現の調節機構を明らかにすることを目的とした。

まず始めに、第 2 章において、我々はイヌ正常組織における TEM8 発現・局在を明らかにすることを目的とし、免疫組織化学および RT-PCR 法による検索を行った。さらに、各組織における各 TEM8-isoforms の発現パターンを明らかにするために、TEM8 の共通領域を認識するポリクローナル抗体と、V1 および V4 に特異的に存在する細胞内ドメインを認識するモノクローナル抗体を使用した Western blot 解析を実施した。その結果、TEM8 は乳腺をはじめ広範囲な組織で発現し、組織によって優位に発現する isoform が異なっていた。乳腺において、TEM8 は乳腺上皮細胞に限局して発現し、乳腺の上皮形態維持に関与している可能性が示唆された。さらに乳腺では受容体として機能する膜結合型 (long, medium isoforms) と可溶性因子として機能する可溶型 (short isoform) がともに発現していることが明らかとなった。また、管腔型の器官では膜結合型 TEM8 が優位に、充実型の器官では可溶型 TEM8 が優位に発現する傾向が認められた。現在、可溶型 TEM8 の機能は明らかではないが、可溶型 TEM8 は膜結合型 TEM8 の細胞外ドメインと同じ構造を持つことから、デコイ受容体として機能している可能性が推測される。このため、各組織において、可溶型と膜結合型の割合を変化させることによって膜結合型 TEM8 の受容体としての機能を制御しているのかもしれない。本研究において、TEM8-isoform のそれぞれの機能を明らかにすることはできなかったが、膜結

合型と可溶型 isoforms の発現量の違いに応じて、各組織において TEM8 の機能として発現する現象も結果的に異なってくるものと考えられ、各 isoforms の発現パターンが組織形態の制御において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

次に我々は、第 3 章において、乳腺の成熟過程における TEM8 発現の変化を明らかにするために、生後 1 日目から性成熟後まで、および出産後 1 日目、2、4 週目の授乳期のラットを用いて乳腺組織における TEM8 の発現の変化を免疫組織化学的に検索した。さらに、乳腺上皮の形態形成を制御している Notch-1 および c-MET の発現と TEM8 の発現の関連性を調査した。その結果、ラット乳腺の成熟過程の検索において、1 日齢から 1 ヶ月齢までの未分化段階の乳腺では、TEM8、Notch-1 および c-MET の発現は認められなかった。しかしながら、春機発動時の乳腺上皮発育過程にある 2 ヶ月齢において、これらの発現が乳腺上皮細胞に認められた。これらの結果から、Notch および MET シグナルによって生ずる ductal/alveolar 細胞への分化および管腔形成の誘導と同時に、TEM8 の発現が開始されることが示唆された。膜結合型 TEM8 は、integrin 様の接着分子として機能し、Col-I や Col-VI と接着することによって、細胞内骨格を変化させ、細胞の migration を誘導することが明らかにされている。TEM8 と同様に vWA ドメインを持つ  $\beta 1$  integrin は乳腺上皮の luminal 細胞に高度に発現し、vWA ドメインを介して Col-I と接着することによって、成熟した luminal 細胞の形質発現や管腔構造の維持に関与していることが報告されている。このため、乳腺上皮の分化過程において、TEM8 も Col-I や Col-VI との接着によって luminal 細胞の分化・成熟や管腔構造の形成や維持に関与している可能性が示唆された。また、Notch-1 が  $\beta 1$  integrin の発現を促進することが報告されており、さらに、 $\alpha 5\beta 1$ -integrin を介したシグナリングがリガンド非依存性に c-MET の活性化を誘導することが報告されている。このため、乳腺上皮細胞の分化過程において、TEM8 の発現も Notch シグナリングによって誘導され、さらに TEM8 の活性化が c-MET シグナルの増加をもたらすことによって、MaSCs

から luminal 細胞への分化の制御に関与しているのかもしれない。以上のことから、乳腺の成熟過程において、TEM8 は Notch-1 および c-MET とともに、乳腺の発育・分化および管腔形成に関与している可能性が示唆された。

第 4 章において、乳腺の腫瘍化に伴う TEM8 の発現および組織学的特徴との関連性を調査するために、イヌ乳腺腫瘍 91 症例における TEM8 発現と luminal 細胞および basal/myoepithelial 細胞マーカーを免疫組織化学により検索した。また、TEM8 は乳腺の成熟過程において、luminal 細胞への分化および管腔形成との関連性が示されたことから、TEM8 陽性腫瘍細胞の形質を明らかにするために、luminal 細胞由来および basal 細胞由来の 2 種類のイヌ乳癌細胞株における TEM8、Notch-1、c-MET および p-c-MET 発現を検索した。イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現と腫瘍組織型との関連を検索した結果、adenoma - simple、carcinoma - simple および carcinoma - micropapillary invasive の組織型において、TEM8 発現を示す腫瘍細胞が有意に認められ、多くは管腔構造を形成していた。一方で、carcinoma - solid などの充実構造を形成する腫瘍細胞における TEM8 発現は有意に減少していた。TEM8 発現を示す腫瘍細胞の多くは、CK19/p63/αSMA (+/-/-) luminal 様表現型を示し、CK19/p63/αSMA (-/+/-) basal 様腫瘍細胞における TEM8 発現は認められなかった。これまでに、Notch シグナルの活性化と p63 のダウンレギュレーションが乳腺における luminal 細胞への分化および維持に必要であることが報告されている。本研究において、Western blot 解析の結果、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞 CHMp は、basal 細胞由来イヌ乳癌細胞 CIPp と比較して、有意に TEM8 および Notch-1 の発現量が高く、さらに p63 を発現しないことが明らかとなった。また、イヌ乳腺腫瘍組織においては、TEM8 と Notch-1 は共発現する傾向を示し、TEM8 と Notch-1 を発現している症例の大部分では、p63 の発現が認められなかった。このことから、第 3 章で正常乳腺上皮の分化・成熟段階の解析結果と同様に、乳腺腫瘍細胞においても、Notch シグナルによって p63 のダウンレギュレーションが生じ

ていることが示唆され、luminal 細胞の形質が維持された乳腺腫瘍細胞で、TEM8 の発現が亢進しているものと考えられた。今回、多くの TEM8 陽性腫瘍細胞は、腫瘍胞巣内で管腔を形成していた。また、TEM8 高発現を示す luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞 CHMp において、c-MET および p-c-MET 発現が有意に増加し、さらに乳腺腫瘍組織において TEM8 と c-MET は共発現する傾向を示していた。我々は、第 3 章において、乳腺の成熟過程での TEM8 および c-MET の共発現を明らかにすることで、TEM8 の乳腺における管腔構造の形成への関与を示唆している。本章の *in vitro* および *in vivo* の結果から、イヌ乳腺腫瘍においても、MET シグナルによって管腔形成が誘導・維持されている乳腺腫瘍細胞に TEM8 が発現していることが示唆された。また、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞株が、受容体として機能している膜結合型 TEM8 long isoform を発現していたことから、イヌ乳腺腫瘍細胞においても TEM8 が Col-I や Col-VI と接着することによって細胞内のシグナリングを惹起し、細胞の機能を制御している可能性が示唆される。また、TEM8 と同様に vWA ドメインを持つ  $\beta 1$ -integrin は乳腺における成熟した luminal 細胞の形質の発現や管腔構造の維持に関与し、さらには c-MET の活性化を誘導することが明らかとなっている。これらのことから、イヌ乳腺腫瘍細胞においても、膜結合型 TEM8 が vWA ドメインを介して Col-I や Col-VI と接着し、その結果誘導されるシグナリングが c-MET の活性化をもたらすことによって、luminal 細胞の分化・成熟や管腔構造の形成・維持を制御しているのかもしれない。興味深いことに、多くの carcinoma - solid 腫瘍胞巣においては、TEM8 発現の heterogeneity を示していた。すなわち、同一腫瘍胞巣内において、TEM8 陰性腫瘍細胞 CK19/p63/ $\alpha$ SMA (-/+/-) で構成された solid 構造と TEM8 陽性腫瘍細胞 CK19/p63/ $\alpha$ SMA (+/-/-) で構成された luminal 構造が混在していた。近年、luminal 前駆細胞は luminal または basal 細胞の両方への分化能を有することが報告されており、luminal 前駆細胞の中には多彩な乳腺腫瘍の腫瘍細胞における細胞起源としての機能を持つ細胞が存在する

ことが明らかにされている。このため、solid 構造を呈するイヌ乳腺腫瘍においては、luminal 前駆細胞から luminal および basal 細胞への二相性の分化が生じている可能性が示唆される。この分化過程の中で、周囲微小環境における Col-I、Col-VI あるいは ETP と膜結合型 TEM8 との接着が生じた部位では、luminal 前駆細胞から luminal 細胞への分化制御に関与しているのかもしれない。

Col-VIは、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  および  $\alpha 3$  (または  $\alpha 4 \sim \alpha 6$ ) 鎖からなる微小線維コラーゲンであり、多くの組織の細胞外マトリックスに存在する。 $\alpha 3$  の C 末端部位に存在する C5-domain は、Col-VIシグナルの主要なメディエーターであると考えられており、Endotrophin (ETP) と呼ばれ、TEM8 の生理的リガンドと考えられている。そこで、第 5 章において、イヌ乳腺腫瘍症例を用いて、膜結合型 TEM8 のリガンドである ETP の供給源である Col-VI  $\alpha 3$  鎖 C5-domain の発現を免疫組織化学的に検索した結果、Col-VIは腫瘍間質組織で発現していた。また、 $\alpha 3$  および C5-domain は腫瘍細胞で発現し、腫瘍細胞における C5-domain および TEM8 発現は有意な相関を示し、Col-VI発現領域と異なる局在を示していた。このため、腫瘍細胞は C5-domain を持つ Col-VI  $\alpha 3$  を産生することで、間質組織における Col-VIの形成に関与しているものと考えられた。さらに、腫瘍細胞は TEM8 のリガンドである ETP の前駆体を産生していることが明らかとなった。腫瘍細胞における TEM8 の発現と C5-domain の発現は有意に相関していたことから、イヌ乳腺腫瘍細胞においては、ETP/TEM8 のオートクライン/パラクラインループが存在し、これによって誘導された細胞内シグナリングが腫瘍細胞の動態を制御している可能性が考えられた。

次に、我々は、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞に対して ETP 刺激を実施した結果、WST-1 増殖試験および *in vitro* 創傷治癒試験において、ETP はイヌ乳癌細胞に対して細胞増殖を促進させることが明らかとなった。また、TEM8 mRNA 発現が有意に増加していたことから、イヌ乳腺癌細胞において、ETP は受容体である

TEM8 の発現を促進することによって、ETP/TEM8 シグナリングを亢進させているものと考えられた。さらに、ETP 刺激に伴い、luminal 前駆細胞のマーカーである *CD49b* mRNA の発現の増加、乳癌幹細胞で高い発現を示す *CD133* mRNA の減少、および luminal 細胞への成熟過程で増加する *EpCAM* mRNA の減少が認められた。これらの結果から、ETP はイヌ乳癌細胞において、luminal 前駆細胞の形質の発現を促進し、乳癌幹細胞や成熟 luminal 細胞の形質の発現を抑制することが示唆された。この時、乳癌を含めた様々な腫瘍における幹細胞マーカーである *CD44* mRNA 発現が有意に増加していた。luminal 前駆細胞の中で、CD44+ luminal 前駆細胞は CD44- luminal 前駆細胞と比較して、高い増殖能を持つことが明らかとなっていることから、本研究で認められた ETP 刺激による細胞増殖の亢進は、CD44 の発現の増加に起因している可能性も示唆された。

従来、TEM8 は腫瘍血管新生に関与することが示唆されており、可溶性 TEM8 により血管内皮細胞および腫瘍細胞の浸潤が誘導されることで転移を促進することが明らかになっている。そのため、腫瘍の転移には可溶性 TEM8 発現の増加が重要であると考えられているが、可溶性 TEM8 を含めた TEM8 の発現制御に関しては不明なことが多く、それぞれの TEM8-isoform 発現の調節を明らかにすることが要求されている。最後に我々は、腫瘍血管新生に重要である HIF-1 $\alpha$  発現が、腫瘍細胞における TEM8 発現に与える影響を検索するために、luminal 細胞由来イヌ乳癌細胞に対して HIF-1 $\alpha$  を誘導させた後、腫瘍細胞における TEM8-isoform 発現の変化を検索した。また同時に、TEM8 に対する生理的リガンドの供給源である  $\alpha 3$  および C5-domain 発現の変化を検索した。その結果、HIF-1 $\alpha$  誘導により TEM8-isoform 発現が変化することが明らかとなった。つまり、HIF-1 $\alpha$  誘導を行った腫瘍細胞は long isoform 発現を有意に減少させ、相対的に short isoform 発現を増加させることが明らかになった。また、ETP の供給源である  $\alpha 3$  および C5-domain 発現は減少していた。これまでの報告において、ETP は腫瘍細胞での



HIF-1 $\alpha$  をアップレギュレーションすることで血管新生を促進させることが示唆されている。このことから、HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞においてネガティブフィードバック様調節を示すことで、ETP 産生・分泌には抑制的に働いていることが考えられた。以上より、HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞に対して、可溶型 TEM8 発現を増加させることで腫瘍血管新生を促進させ、転移を増強させると同時に、 $\alpha 3$  および C5-domain 発現を減少させることで腫瘍組織内における ETP の作用を減弱させているのかもしれない。つまり HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞における ETP の受容体型 TEM8 に対する作用経路よりもむしろ、腫瘍細胞による可溶型 TEM8 の作用を増強させることで悪性挙動を可塑性に変化させることが予想された。

結論として、本研究において、我々は免疫組織化学および分子生物学的手法を用いた解析を実施することで、イヌにおける TEM8 の発現と局在を明らかにするとともに、イヌ腫瘍腫瘍における TEM8 発現とその意義、および ETP が腫瘍細胞に与える影響を明らかにした。正常乳腺上皮細胞において、TEM8 は受容体として機能する膜結合型 isoform と可溶性因子として機能する可溶型 isoform を発現し、これらの作用によって luminal 細胞の分化および特徴的な形質の維持を制御している可能性が示唆された。また、イヌ乳腺腫瘍においては、腫瘍細胞が TEM8 と共にリガンドである ETP を発現し、ETP/TEM8 オートクラインループによるシグナリングが luminal 前駆細胞への分化およびその形質の維持、管腔構造形成の誘導あるいは維持に関与しているものと考えられた。さらにイヌ乳腺腫瘍細胞における TEM8 の膜結合型 isoform と可溶型 isoform および ETP 産生は、腫瘍細胞周囲の微小環境における酸素濃度によって制御されている可能性が示唆された。以上のことから、本研究で示された TEM8 の発現および ETP の作用は、イヌ乳腺腫瘍の組織形態学的特徴の形成に深く関与し、生物学的な特徴を推測する上で重要な指標になり得るものと考えられた。

## 謝辞

本博士論文は、筆者が日本獣医生命科学大学大学院 獣医生命科学研究科 獣医学専攻博士課程在学中に比較動物医学および獣医解剖学教室において行った研究をまとめたものです。本研究を終えるにあたり、終始あたたかくご指導ご鞭撻を頂きました本学 比較動物医学教室 横須賀誠教授に心より感謝致します。また、本論文をご精読頂き有益なご示唆を頂きました本学 獣医生化学教室 新井敏郎教授、獣医放射線学教室 藤田道郎教授、獣医病理学教室 道下正貴准教授、獣医保健看護学病態病理学教室 山本昌美准教授に深謝いたします。論文の執筆にあたって具体的に親身にご指導頂きました本学 獣医解剖学教室 添田聡准教授に深謝致します。

第2章および第5章の Western blot 解析および細胞形態撮影をご教授頂いた獣医衛生学教室 田中良和教授に深謝致します。また、第4章の免疫組織化学的検索にご協力頂いた獣医保健看護学部門 吉村久志博士、病理組織検体の提供にご協力頂いた日本獣医生命科学大学附属動物医療センター 安田暁子氏、久保喜昭氏、第5章の細胞増殖試験をご教授頂いた獣医臨床病理学教室 盆子原誠教授、田村恭一博士、谷浩由輝氏に心より感謝しております。

最後に、本研究に対し多大にご協力頂きました本学 獣医保健看護学高次機能学教室 神谷新司教授、獣医解剖学教室 大塚裕忠博士、荒木真美氏に深く感謝の意を表します。

## 参考文献

Aigner T, Hambach L, Söder S, Schlötzer-Schrehardt U, Pöschl E (2002) The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. *Biochem Biophys Res Commun.*, 290(2), 743-748.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988.

Arafat H, Lazar M, Salem K, Chipitsyna G, Gong Q, Pan TC, Zhang RZ, Yeo CJ, Chu ML (2011) Tumor-specific expression and alternative splicing of the COL6A3 gene in pancreatic cancer. *Surgery*, 150(2), 306-315.

Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE (2007) Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol*, 9(2), 201-209.

Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Vaillant F, Gyorki DE, Wu D, Holroyd S, Breslin K, Ward T, Shi W, Bath ML, Deb S, Fox SB, Smyth GK, Lindeman GJ, Visvader JE (2011) Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14. *Mol Cell Biol*, 31(22), 4609-4622.

Beecher N, Roseman AM, Jowitt TA, Berry R, Troilo H, Kammerer RA, Shuttleworth CA, Kielty CM, Baldock C (2011) Collagen VI, conformation of A-domain arrays and microfibril architecture. *J Biol Chem*, 286(46), 40266-40275.

Besschetnova TY, Ichimura T, Katebi N, St Croix B, Bonventre JV, Olsen BR (2015) Regulatory mechanisms of anthrax toxin receptor 1-dependent vascular and connective tissue homeostasis. *Matrix Biol*, 42, 56-73.

Bonuccelli G, Sotgia F, Frank PG, Williams TM, de Almeida CJ, Tanowitz HB, Scherer PE, Hotchkiss KA, Terman BI, Rollman B, Alileche A, Brojatsch J, Lisanti MP (2005) ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining *Bacillus anthracis*' three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(6), C1402-C1410.

Bouras T, Pal B, Vaillant F, Harburg G, Asselin-Labat ML, Oakes SR, Lindeman GJ, Visvader JE (2008) Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell*, 3(4), 429-441.

Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, 414(6860), 225-229.

Brown JM, Wilson WR (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 4(6), 437-447.

Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J, Cheng C (2011) CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest*, 121(3), 1064-1074.

Brisken C (2002) Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(1), 39-48.

Bu D, Crewe C, Kusminski CM, Gordillo R, Ghaben AL, Kim M, Park J, Deng H, Xiong W, Liu XZ, Lønning PE, Halberg N, Rios A, Chang Y, Gonzalez A, Zhang N, An Z, Scherer PE (2019) Human endotrophin as a driver of malignant tumor growth. *JCI Insight*, 5, pii:125094.

Burchardt ER, Hein R, Bosserhoff AK (2003) Laminin, hyaluronan, tenascin-C and type VI collagen levels in sera from patients with malignant melanoma. *Clin Exp Dermatol*, 28(5), 515-520.

Byrd TT, Fousek K, Pignata A, Szot C, Samaha H, Seaman S, Dobrolecki L, Salsman VS, Oo HZ, Bielałowicz K, Landi D, Rainusso N, Hicks J, Powell S, Baker ML, Wels WS, Koch J, Sorensen PH, Deneen B, Ellis MJ, Lewis MT, Hegde M, Fletcher BS, St Croix B, Ahmed N (2018) TEM8/ANTXR1-Specific CAR T Cells as a Targeted Therapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res*, 78(2), 489-500.

Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Giamboi-Miraglia A, Lena AM, Mantovani R,

Knight R, Melino G (2007) DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of FgfR2 and Jag2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), 11999-12004.

Cao C, Wang Z, Huang L, Bai L, Wang Y, Liang Y, Dou C, Wang L (2016) Down-regulation of tumor endothelial marker 8 suppresses cell proliferation mediated by ERK1/2 activity. *Sci Rep*, 6, 23419.

Carson-Walter EB, Watkins DN, Nanda A, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B (2001) Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res*, 61(18), 6649-6655.

Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P (2015) Collagen VI at a glance. *J Cell Sci*, 128(19), 3525-3531.

Chen D, Bhat-Nakshatri P, Goswami C, Badve S, Nakshatri H (2013) ANTXR1, a stem cell-enriched functional biomarker, connects collagen signaling to cancer stem-like cells and metastasis in breast cancer. *Cancer Res*, 73(18), 5821-5833.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.

Cullen M, Seaman S, Chaudhary A, Yang MY, Hilton MB, Logsdon D, Haines DC, Tessarollo L, St Croix B (2009) Host-derived tumor endothelial marker 8

promotes the growth of melanoma. *Cancer Res*, 69(15), 6021-6026.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10158-10163.

Davies G, Rmali KA, Watkins G, Mansel RE, Mason MD, Jiang WG (2006) Elevated levels of tumour endothelial marker-8 in human breast cancer and its clinical significance. *Int J Oncol*, 29(5), 1311-1317.

Deuquet J, Lausch E, Superti-Furga A, van der Goot FG (2012) The dark sides of capillary morphogenesis gene 2. *EMBO J*, 31(1), 3-13.

Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS (2004) Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, 6(6), R605-615.

Eguchi Y (2006) 動物発生学; 文永堂出版, 4(15), 178-180.

Fillmore C, Kuperwasser C (2007) Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res*, 9(3), 303.

Fitzgerald J, Mörgelin M, Selan C, Wiberg C, Keene DR, Lamandé SR, Bateman

JF (2001) The N-terminal N5 subdomain of the alpha 3(VI) chain is important for collagen VI microfibril formation. *J Biol Chem*, 276(1), 187-193.

Fitzgerald J, Rich C, Zhou FH, Hansen U (2008) Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *J Biol Chem*, 283(29), 20170-20180.

Forsyth IA. *J Dairy* (1986) Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *Sci*, 69(3), 886-903.

Friebe S, van der Goot FG, Bürgi J (2016) The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins (Basel)*, 8(3), pii: E69.

Frischholz S, Beier F, Girkontaite I, Wagner K, Pöschl E, Turnay J, Mayer U, von der Mark K (1998). Characterization of human type X procollagen and its NC-1 domain expressed as recombinant proteins in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 4547-4555.

Gama A, Alves A, Schmitt F (2008) Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 453(2), 123-132.

Gara SK, Grumati P, Urciuolo A, Bonaldo P, Kobbe B, Koch M, Paulsson M, Wagener R (2008) Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *J Biol Chem*, 283(16), 10658-10670.



Garner OB, Bush KT, Nigam KB, Yamaguchi Y, Xu D, Esko JD, Nigam SK (2011) Stage-dependent regulation of mammary ductal branching by heparan sulfate and HGF-cMet signaling. *Dev Biol*, 355(2), 394-403.

Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V (2011) Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 48(1), 117-131.

Gong Q, Liu C, Wang C, Zhuang L, Zhang L, Wang X (2018) Effect of silencing TEM8 gene on proliferation, apoptosis, migration and invasion of XWLC-05 lung cancer cells. *Mol Med Rep*, 17(1), 911-917.

Gutwein LG, Al-Quran SZ, Fernando S, Fletcher BS, Copeland EM, Grobmyer SR (2011) Tumor endothelial marker 8 expression in triple-negative breast cancer. *Anticancer Res*, 31(10), 3417-3422.

Han J, Daniel JC (1995) Biosynthesis of type VI collagen by glioblastoma cells and possible function in cell invasion of three-dimensional matrices. *Connect Tissue Res*, 31(2), 161-170.

Haslam SZ, Drolet A, Smith K, Tan M, Aupperlee M (2008) Progestin-regulated luminal cell and myoepithelial cell-specific responses in mammary organoid culture. *Endocrinology*, 149(5), 2098-2107.

Heumüller SE, Talantikite M, Napoli M, Armengaud J, Mörgelin M, Hartmann U, Sengle G, Paulsson M, Moali C, Wagener R (2019) C-terminal proteolysis of

the collagen VI  $\alpha 3$  chain by BMP-1 and proprotein convertase(s) releases endotrophin in fragments of different sizes. *J Biol Chem*, 294(37), 13769-13780.

Hiraga T, Ito S, Nakamura H (2013) Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res*, 73(13), 4112-422.

Hodkinson PS, Elliott PA, Lad Y, McHugh BJ, MacKinnon AC, Haslett C, Sethi T (2007) Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras. *J Biol Chem*, 282(39), 28991-29001.

Hotchkiss KA, Basile CM, Spring SC, Bonuccelli G, Lisanti MP, Terman BI (2005) TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp Cell Res*, 305(1), 133-144.

Howlin J, McBryan J, Martin F (2006) Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 11(3-4), 283-297.

Høye AM, Tolstrup SD, Horton ER, Nicolau M, Frost H, Woo JH, Mauldin JP, Frankel AE, Cox TR, Erler JT (2018) Tumor endothelial marker 8 promotes cancer progression and metastasis. *Oncotarget*, 9(53), 30173-30188.

Hughes CM, Rudland PS (1990) Appearance of myoepithelial cells in developing rat mammary glands identified with the lectins Griffonia simplicifolia-1 and pokeweed mitogen. *J Histochem Cytochem*, 38(11), 1647-1657.

Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH (2014) Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol*, 51(3), 549-559.

Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J, Zhang H (2002) Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80(2), 213-230.

Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, Lee H, Temple K, Graves R, Pollard J, Chopra N, Russell RG, Sasisekharan R, Trock BJ, Lippman M, Calvert VS, Petricoin EF 3rd, Liotta L, Dadachova E, Pestell RG, Lisanti MP, Bonaldo P, Scherer PE (2005) Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest*, 115(5), 1163-1176.

Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE (2006) Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*, 12(10), 1167-1174.

Jinnin M, Medici D, Park L, Limaye N, Liu Y, Boscolo E, Bischoff J, Vikkula M, Boye E, Olsen BR (2008) Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nat Med*, 14(11), 1236-1246.

Kerbel RS, Benezra R, Lyden DC, Hattori K, Heissig B, Nolan DJ, Mittal V, Shaked Y, Dias S, Bertolini F, Rafii S (2008) Endothelial progenitor cells are cellular hubs essential for neoangiogenesis of certain aggressive adenocarcinomas and metastatic transition but not adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), E54.

Kim NH, Lim HY, Im KS, Kim JH, Sur JH (2013) Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Pathol*, 148(4), 298-306.

Knapp DJHF, Kannan N, Pellacani D, Eaves CJ (2017) Mass Cytometric Analysis Reveals Viable Activated Caspase-3+ Luminal Progenitors in the Normal Adult Human Mammary Gland. *Cell Rep*, 21(4), 1116-1126.

Lamandé SR, Mörgelin M, Adams NE, Selan C, Allen JM (2006) The C5 domain of the collagen VI alpha3(VI) chain is critical for extracellular microfibril formation and is present in the extracellular matrix of cultured cells. *J Biol Chem*, 281(24), 16607-16614.

Li H, Zhou J, Miki J, Furusato B, Gu Y, Srivastava S, McLeod DG, Vogel JC, Rhim JS (2008) Telomerase-immortalized non-malignant human prostate epithelial cells retain the properties of multipotent stem cells. *Exp Cell Res*, 314(1), 92-102.

Li N, Singh S, Cherukuri P, Li H, Yuan Z, Ellisen LW, Wang B, Robbins D,

DiRenzo J (2008) Reciprocal intraepithelial interactions between TP63 and hedgehog signaling regulate quiescence and activation of progenitor elaboration by mammary stem cells. *Stem Cells*, 26(5), 1253-1264.

Liu K, Hua CG, Wen YM, Pan J, Chen SW, Gao QH (2007) Cancer stem cells: its existence, proliferation and differentiation in an adenoid cystic carcinoma cell line. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 42(5), 284-287.

Liu S, Leppla SH (2003) Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization. *J Biol Chem*, 278(7), 5227-5234.

Maaß T, Bayley CP, Mörgelin M, Lettmann S, Bonaldo P, Paulsson M, Baldock C, Wagener R (2016) Heterogeneity of Collagen VI Microfibrils: STRUCTURAL ANALYSIS OF NON-COLLAGENOUS REGIONS. *J Biol Chem*, 291(10), 5247-5258.

Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM (2000) A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(2), 165-185.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275.

McManaman JL, Neville MC (2003) Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(5), 629-641.

Memmi EM, Sanarico AG, Giacobbe A, Peschiaroli A, Frezza V, Cicalese A, Pisati F, Tosoni D, Zhou H, Tonon G, Antonov A, Melino G, Pelicci PG, Bernassola F (2015) p63 Sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(11), 3499-3504.

Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Miyake K, Takamori H, Beppu T, Baba H (2012) The expression levels of CD44v6 are correlated with the invasiveness of hepatocellular carcinoma in vitro, but do not appear to be clinically significant. *Oncol Lett*, 3(5), 1047-1051.

Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E (2011) Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 30(13), 1566-1576.

Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, McCarthy A, Kendrick H, Natrajan R, Mackay A, Grigoriadis A, Tutt A, Ashworth A, Reis-Filho JS, Smalley MJ (2010) BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(3), 403-417.

Monks J, Rosner D, Geske FJ, Lehman L, Hanson L, Neville MC, Fadok VA

(2005) Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ*, 12(2), 107-114.

Monks J, Smith-Steinhart C, Kruk ER, Fadok VA, Henson PM (2008) Epithelial cells remove apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biol Reprod*, 78(4), 586-594.

Motrescu ER, Blaise S, Etique N, Messaddeq N, Chenard MP, Stoll I, Tomasetto C, Rio MC (2008) Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene*, 27(49), 6347-6355.

Muniandy K, Gothai S, Tan WS, Kumar SS, Mohd Esa N, Chandramohan G, Al-Numair KS, Arulselvan P (2018) In Vitro Wound Healing Potential of Stem Extract of *Alternanthera sessilis*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 3142073.

Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA (2009) Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 $\alpha$  by human papillomaviruses. *Virology*, 387(2), 442-448.

Nakasaki M, Yoshioka K, Miyamoto Y, Sasaki T, Yoshikawa H, Itoh K (2008) IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone*, 43(5), 869-879.

Nanda A, Carson-Walter EB, Seaman S, Barber TD, Stampfl J, Singh S, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B (2004) TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI). *Cancer Res*, 64(3), 817-820.

Oakes SR, Rogers RL, Naylor MJ, Ormandy CJ (2008) Prolactin regulation of mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13(1), 13-28.

Ouhtit A, Abd Elmageed ZY, Abdraboh ME, Lioe TF, Raj MH (2007) In vivo evidence for the role of CD44s in promoting breast cancer metastasis to the liver. *Am J Pathol*, 171(6), 2033-2039.

Paine IS, Lewis MT (2017) The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 22(2), 93-108.

Park J, Scherer PE (2012a) Endotrophin - a novel factor linking obesity with aggressive tumor growth. *Oncotarget*, 3(12), 1487-1488.

Park J, Scherer PE (2012b) Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J Clin Invest*, 122(11), 4243-4256.

Park J, Scherer PE (2013) Endotrophin in the tumor stroma: a new therapeutic target for breast cancer? *Expert Rev Anticancer Ther*, 13(2), 111-113.

Paulus W, Roggendorf W, Schuppan D (1988) Immunohistochemical



investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 413(4), 325-332.

Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Díez L, Gärtner F, Hellmén E, Kiupel M, Millán Y, Miller MA, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, de las Mulas JM (2014) Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 51(1), 127-145.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752.

Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Megow D, Priller J, Scharff A, Dirnagl U, Meisel A (2002) Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(5), 520-525.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 973-978.

Rasotto R, Goldschmidt MH, Castagnaro M, Carnier P, Caliarì D, Zappulli V

(2014) The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J Comp Pathol*, 151(2-3), 166-180.

Reinke LM, Xu Y, Cheng C (2012) Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 287(43), 36435-36442.

Rmali KA, Watkins G, Harrison G, Parr C, Puntis MC, Jiang WG (2004) Tumour endothelial marker 8 (TEM-8) in human colon cancer and its association with tumour progression. *Eur J Surg Oncol*, 30(9), 948-953.

Rogez B1, Pascal Q, Bobillier A, Machuron F, Lagadec C, Tierny D, Le Bourhis X, Chopin V (2019) CD44 and CD24 expression and prognostic significance in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, 56(3), 377-388.

Russo IH, Russo J (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, 104(9), 938-967.

Russo IH, Russo J (2000) Hormonal approach to breast cancer prevention. *J Cell Biochem Suppl*, 34, 1-6.

Sakai Y, Goodison S, Kusmartsev S, Fletcher B, Eruslanov E, Cao W, Porvasnik S, Namiki K, Anai S, Rosser CJ (2009) Bcl-2 mediated modulation of vascularization in prostate cancer xenografts. *Prostate*, 69(5), 459-470.

Sakakura T, Suzuki Y, Shiurba R (2013) Mammary stroma in development and carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 18(2), 189-197.

Santoro A, Vlachou T, Carminati M, Pelicci PG, Mapelli M (2016) Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. *EMBO Rep*, 17(12), 1700-1720.

Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G (2010) Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet Res*, 6, 5.

Scobie HM, Rainey GJ, Bradley KA, Young JA (2003) Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5170-5174.

Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F (2007) p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell*, 129(3), 523-536.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072), 84-88.

Sharp FR, Bernaudin M (2004) HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci*, 5(6), 437-448.

Shehata M, Teschendorff A, Sharp G, Novcic N, Russell IA, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ, Stingl J (2012) Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res*, 14(5), R134.

Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ (2003) Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*, 3(4), 377-386.

Skibinski A, Kuperwasser C (2015) The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*, 34(42), 5309-5316.

Sleeckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJ, Van Ginneken C, Van Brantegem L (2011) Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim*, 46(6), 1112-1131.

Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ (2006) CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res*, 8(1), R7.

Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, Isacke CM, Ashworth A, Smalley MJ (2007) Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol*, 176(1), 19-26.

Sorenmo K (2003) Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33(3), 573-596.

Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH (2011) Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*, 48(1), 85-97.

Soriano JV, Pepper MS, Nakamura T, Orci L, Montesano R (1995) Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 2), 413-430.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10393-10398.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874.

St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW (2000) Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*, 289(5482), 1197-1202.

Stingl J, Raouf A, Eirew P, Eaves CJ (2006) Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy. *Cell Cycle*, 5(14), 1519-1522.

Sun K, Park J, Gupta OT, Holland WL, Auerbach P, Zhang N, Goncalves Marangoni R, Nicoloro SM, Czech MP, Varga J, Ploug T, An Z, Scherer PE (2014) Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nat Commun*, 5, 3485.

Tao L, van Bragt MP, Laudadio E, Li Z (2014) Lineage tracing of mammary epithelial cells using cell-type-specific cre-expressing adenoviruses. *Stem Cell Reports*, 2(6), 770-779.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM (2010) MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(12), 834-848.

Uyama R, Nakagawa T, Hong SH, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N (2006) Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines derived from primary and metastatic origin and their E-cadherin expression. *Vet Comp Oncol*, 4(2), 104-113.

Vargas M, Karamsetty R, Leppla SH, Chaudry GJ (2012) Broad expression analysis of human ANTXR1/TEM8 transcripts reveals differential expression and novel splice variants. *PLoS One*, 7(8), e43174.

Verma K, Gu J, Werner E (2011) Tumor endothelial marker 8 amplifies canonical Wnt signaling in blood vessels. *PLoS One*, 6(8), e22334.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514.

Wang GL, Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3), 1230-1237.

Werner E, Kowalczyk AP, Faundez V (2006) Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 281(32), 23227-23236.

Wong CC, Zhang H, Gilkes DM, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, Hubbi ME, Semenza GL (2012) Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis. *J Mol Med (Berl)*, 90(7), 803-815.

Wright A, Li YH, Zhu C (2008) The differential effect of endothelial cell factors on in vitro motility of malignant and non-malignant cells. *Ann Biomed Eng*,

36(6), 958-969.

Wuidart A, Sifrim A, Fioramonti M, Matsumura S, Brisebarre A, Brown D, Centonze A, Dannau A, Dubois C, Van Keymeulen A, Voet T, Blanpain C (2018) Early lineage segregation of multipotent embryonic mammary gland progenitors. *Nat Cell Biol*, 20(6), 666-676.

Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W, Brisken C (2010) Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ*, 17(10), 1600-1612.

Yang XM, Park M (1995) Expression of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor tyrosine kinase is localized to epithelia in the adult mouse. *Lab Invest*, 73(4), 483-491.

Yang Y, Jin G, Liu H, Liu K, Zhao J, Chen X, Wang D, Bai R, Li X, Jang Y, Lu J, Xing Y, Dong Z (2017) Metformin inhibits esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis by suppressing JAK/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, 8(43), 74673-74687.

Yoshimura H, Nakahira R, Kishimoto TE, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K (2014) Differences in indicators of malignancy between luminal epithelial cell type and myoepithelial cell type of simple solid carcinoma in the canine mammary gland. *Vet Pathol*, 51(6), 1090-1095.



Zagórska A, Dulak J (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol*, 51(3), 563-585.

Zhang Z, Christin JR, Wang C, Ge K, Oktay MH, Guo W (2016) Mammary-stem-cell-based somatic mouse models reveal breast cancer drivers causing cell fate dysregulation. *Cell Reports*, 16(12), 3146–3156.

Zhao P, Xu Y, Wei Y, Qiu Q, Chew TL, Kang Y, Cheng C (2016) The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity. *J Cell Sci*, 129(7), 1355-1365.