

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 野口 隼矢

## 【結論】

Tumor endothelial marker 8 (TEM8) は腫瘍内の血管内皮で高度に発現する TEM 遺伝子ファミリーの 1 つであり、ANTXR1 (炭疽菌毒素受容体) としても知られている。TEM8 は腫瘍内の血管新生に関与していると考えられており、腫瘍における発現と腫瘍の悪性度には関連性があることが示唆されている。現在までに alternative splicing による 3 つの isoforms (long、medium、short) が確認されている。しかしながら、腫瘍細胞自体における TEM8 の発現に関しては報告がなく、その機能に関して不明な点が多い。さらに、イヌにおける TEM8 の発現および局在は明らかになっていない。これらの研究動向から、本研究では、イヌ乳腺腫瘍細胞における TEM8 の発現とその意義を明らかにするために、正常組織の局在および発現している isoform のタイプ (第 2 章)、乳腺の成熟過程における TEM8 発現の変化 (第 3 章) を検索した。また、イヌ乳腺腫瘍症例およびイヌ乳癌細胞株における TEM8 発現腫瘍細胞の形質を解析した (第 4 章)。さらに、TEM8 の生理的リガンドである VI 型コラーゲン  $\alpha 3$  鎖の分解産物である Endotrophin (ETP) が乳腺腫瘍細胞に与える影響および腫瘍細胞における TEM8 発現調節に対する HIF-1 $\alpha$  の作用を解析した (第 5 章)。

## 【実験の概要】

始めに (第 2 章)、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現を調査するための研究として、イヌ正常組織における TEM8 の発現および局在を免疫組織化学および RT-PCR 法によって検索した。さらに、各組織における TEM8-isoforms の発現を明らかにするために、western blot 法を実施した。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。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可能性が示唆された。

次に (第3章)、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。この結果、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。このことから、発生段階の乳腺上皮において、TEM8 は乳腺上皮 luminal 細胞への分化と管腔形成の制御に重要な因子である可能性が示唆された。

第4章として、イヌ乳腺の腫瘍化に伴う TEM8 の発現と腫瘍細胞の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 (MGT) 91 症例および2種類のイヌ乳癌細胞株 (luminal 細胞および basal 細胞由来) における TEM8 の発現を解析した。イヌ乳腺腫瘍において、simple adenoma、simple carcinoma および invasive micropapillary carcinoma において、TEM8 陽性腫瘍細胞が有意に認められたが、solid carcinoma などの充実性構造を構成している腫瘍細胞には有意に減少していた。また、TEM8 陽性腫瘍細胞の多くは管腔形成性を呈し、CK19/p63/ $\alpha$  SMA (+/-/-) の luminal 様の形質を示していたが、CK19/p63/ $\alpha$  SMA (-/+/-) の basal 様腫瘍細胞では TEM8 の発現は認められなかった。さらに、TEM8 陽性腫瘍細胞の多くは Notch-1 と c-MET 陽性であった。イヌ MGT 細胞株を用いた検索においては、luminal 細胞由来細胞株は basal 細胞由来細胞株と比較し

て、TEM8、Notch-1、c-MET および p-c-MET の発現が有意に増加していた。以上の結果から、イヌ MGT 細胞において TEM8 は、Notch-1 シグナルを介した p63 の発現抑制による luminal 細胞への分化誘導と MET シグナルによる乳腺上皮細胞の管腔形成の過程に関連した機能を有している可能性が示唆された。このため、乳腺腫瘍における TEM8 発現は luminal 細胞への分化能を有した腫瘍細胞を特定するのに有用であることが考えられた。

最後に（第 5 章）、イヌ乳腺腫瘍における Col-VI  $\alpha$  3 鎖 C5-domain の発現と Endotrophin のイヌ乳癌細胞に与える影響、および乳腺腫瘍細胞の TEM8 発現に対する HIF-1 $\alpha$  の作用に研究を行った。本章では、イヌ乳腺腫瘍において、膜結合型 TEM8 のリガンドである ETP の供給源である collagen-VI (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、TEM8 陽性腫瘍細胞は有意に C5-domain を発現していた。次に、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、腫瘍細胞の細胞増殖能が増加し、さらに CD49b および CD44 mRNA 発現の有意な増加、および EpCAM および CD133 mRNA 発現の有意な減少が認められた。CD49b は luminal 前駆細胞マーカーであり、さらに CD44 を発現する luminal 前駆細胞は高い増殖能を持つことが明らかとなっている。また、CD133 は乳癌幹細胞で高い発現を示し、EpCAM は luminal 細胞への成熟過程で発現が増加することから、ETP/TEM8 シグナリングは、イヌ MGT 細胞において、高度な増殖能を持つ luminal 前駆細胞様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。

TEM8 は腫瘍内の血管新生を促進することから、血管新生の主要な誘導因子である Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が TEM8 の発現調整に関与している可能性が推測される。このため、イヌ MGT 細胞株を用いて HIF-1 $\alpha$  の誘導による TEM8 の発現の変化を解析した。この結果、HIF-1 $\alpha$  誘導によって相対的な TEM8 long isoform の発現の減少と short isoform の発現の増加が認められた。また、Col-VI  $\alpha$  3 鎖および C5-domain 発現は減少傾向を示した。このことから、HIF-1 $\alpha$  は MGT 細胞において ETP と膜結合型 TEM8 による作用を抑制し、可溶性 TEM8 発現の割合を増加させるものと考えられた。

## 【総括】

本研究において、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、イヌ乳腺腫瘍における TEM8 発現とその意義を明らかにした。乳腺腫瘍において TEM8 は、luminal 細胞様腫瘍細胞で発現し、Notch-1 および c-MET の発現と関連性を示すことで luminal 細胞への分化および管腔構造の形成に重要な因子であることが強く示唆された。さらに、TEM8 陽性の腫瘍細胞は Col VI ( $\alpha 3$ ) C5-domain を共に発現することで、高度な増殖能の持つ luminal 前駆細胞の形質を維持している可能性が示された。加えて、腫瘍細胞における TEM8 および C5-domain 発現には、HIF-1 $\alpha$  を介した調整機構が存在することで、複雑な腫瘍形態学的変化に影響をもたらすことが予想された。乳腺腫瘍で認められる多彩な腫瘍細胞および組織の形態学的変化には、様々な因子が関与していると考えられ、本研究で示した TEM8 の発現および ETP の作用は、乳腺腫瘍症例の生物学的、臨床学的な特徴を推測する上での重要な指標になり得るものと考えられる。今後より詳細に TEM8 の variants 発現解析および機能解析を行うことで、獣医療における腫瘍形態機能の包括的な解明に繋がると期待される。

以上のように、本論文は、TEM8 とそのリガンドである Endotrophin の発現パターンから、イヌ乳腺腫瘍細胞の生物学的挙動状態を評価することが出来ることを初めて示した研究である。これらの成果は、獣医学における基礎研究として、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。