

学位論文題名

An embryo-specific expressing TGF- $\beta$  family protein,  
growth-differentiation factor 3 (GDF3),  
augments progression of B16 melanoma

(胚性幹細胞特異的遺伝子の GDF3は  
マウス B16悪性黒色腫細胞の腫瘍形成を促進する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Growth-differentiation factor 3 (GDF3)は転写成長因子であるTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属し、GDF3の発現は、原発性の精巣生殖細胞腫瘍や、精上皮腫、そして乳癌でも認められている。しかしながら、GDF3の役割はいまだ明らかではない。通常組織において、GDF3は胚性幹細胞 (embryonic stem ; ES)細胞や早期胚でも発現している。また一方悪性腫瘍細胞は胚性抗原を発現していることが多く、ES細胞との共通抗原も多い。胚性抗原の多くが腫瘍形成や腫瘍増大に関係している。

今回われわれは癌と胚性幹細胞特異的遺伝子の関係を明らかにすべく実験系を形成し、それらを論ずるにあたり、(The cancer stem cell; CSC, The cancer stem cells ; CSCs) 仮説に着目した。

CSC仮説は最近の研究では固形癌もCSCに由来するという証拠が得られている。既出の論文ではヒト悪性黒色腫もCSCを含み、そしてCSCから分化した腫瘍がABCB5を発現していると報告されている。マウスの悪性黒色腫B16-F10細胞もCSC様の細胞を含んでおり、それらはCD133、CD44、そしてCD24を発現している。

数種の胚性幹細胞特異的遺伝子が腫瘍形成を誘導することをうけて、他の腫瘍形成を促進する胚性幹細胞特異的遺伝子を同定することを試みた。

また、CD24はがん患者において、低い予後を規定するパターン認識受容体なので、腫瘍増大におけるGDF3-CD24 pathwayの役割の可能性を論じることにした。

【材料と方法】 B16-F1 と B16-F10 悪性黒色腫細胞, G1 と G5 の肝細胞癌細胞は 10% fetal bovine serum を加えた RPMI1640 内で培養した。C57BL/6 と BALB/c mice (10-20 週齢)はホクドー株式会社から購入した(札幌、日本)。

数種の胚性幹細胞特異的遺伝子は腫瘍形成を誘導することが明らかになっているため、他の腫瘍形成を促進する胚性幹細胞特異的遺伝子を同定することを PCR により試み、それらを定量化するために qPCR を用いた。

腫瘍形成前後の遺伝子発現を調べるため、B16 悪性黒色腫細胞、G1、G5 肝細胞癌細胞を 10-cm dish 内で培養。マウスを麻酔し、腫瘍細胞は C57BL/6 もしくは BALB/c の皮下に注射した。腫瘍体積は計測器にて 1 日もしくは 2 日ごとに測定した。

タンパク発現の確認については、dish 中もしくは切除した腫瘍を適宜処理した細胞を用い、Flow cytometry や Western blot analysis を用いた。

【結果】 GDF3 の過剰発現はマウスの B16-F1 と B16-F10 による悪性黒色腫の腫瘍形成を促進するが、G1 と G5 による肝細胞癌では促進しなかった。さらに GDF3 過剰発現は B16-F1 と B16-F10 の両者において CD24 の発現を増加させた。

B16 サブラインにおける CD24 の発現分析は、GDF3 の分析と一致するが、肝癌細胞 G1 と G5 の細胞サブラインは GDF3 による CD24 発現を導く能力が欠陥していた。GDF3 による CD24 発現上昇のメカニズムは不明である。

【考察】 今回の実験では、上述した CSC マーカー全てを発現する細胞集団を単離することはできなかったが、これは一般に CSC が腫瘍中にごくわずかしか存在しないためではないかと推測される。しかしながら、B16 悪性黒色腫細胞における CSC マーカーの発現は、CSC 細胞が腫瘍形成中に増加することを示唆している。

CD24、CD44 とも陽性の細胞が GDF3 発現の B16-F10 における細胞群で、コントロール群の細胞よりも腫瘍形成中により多く観察できた。しかし、GDF3 が腫瘍形成を促進するメカニズムは未だ不明である。

最近の CSC 理論では、CSC は正常の幹細胞から発生することが報告されている。いくつかの論文はこのモデルを支持しているが、すべての CSC が正常の幹細胞から発生しているかどうかは不明である

腫瘍細胞で生じたゲノムの不安定性から、本来発現が抑制されている GDF3 の発現が上昇してしまうことで分化細胞の幹細胞化（脱分化）を引き起こす能力のある遺伝子の発現が上昇し、癌幹細胞が生じている可能性も推測される。

腫瘍表面の CD24 の欠落は、増殖反応を抑制し、腫瘍細胞内においてアポトーシスを誘導するという最近の報告があるので、腫瘍細胞における高い CD24 レベルは、担癌患者の予後の不良さを示しうる。我々は悪性黒色腫における GDF3 過剰発現が、腫瘍の増大を助長する高い CD24 発現と関連していることを示唆したが、まだ、未知の知見がある。

B16 サブラインにおける CD24 の発現分析は、GDF3 の分析と一致するが、肝癌細胞 G1 と G5 の細胞サブラインは GDF3 による CD24 発現を導く能力が欠陥している。GDF3 による CD24 発現上昇のメカニズムは不明である。われわれは、CD24 が腫瘍の微少環境中の damage associated molecular pattern(DAMP)の存在にシグナルを伝達し、それにより、GDF3-CD24 経路が機能する B16 F1/F10 では病理学的な腫瘍増大を促進して炎症反応を助長するが、その経路が機能しない G1/G5 細胞では、その炎症助長が起らないという推測をしている。

#### 【結論】

1. マウスの正常皮膚と比較し、マウス悪性黒色腫細胞 B16 における胚性幹細胞特異的遺伝子の発現を同定した。
2. 胚性幹細胞特異的遺伝子のうち GDF3 が腫瘍形成中に上昇することがわかった。
3. GDF3 の過剰発現はマウスの B16-F1 と B16-F10 による悪性黒色腫の腫瘍形成を促進するが、G1 と G5 による肝細胞癌では促進しなかった。
4. GDF3 過剰発現は B16-F1 と B16-F10 の両者において CD24 の発現を増加させた。
5. 移植した腫瘍細胞における強制発現させた GDF3 の発現レベルはトランスフェクション後、徐々に減少する。

# 学位論文審査の要旨

主査	准教授	濱田	淳一
副査	教授	田中	伸哉
副査	教授	佐邊	壽孝
副査	教授	志田	壽利
副査	教授	浅香	正博

## 学位論文題名

### An embryo-specific expressing TGF- $\beta$ family protein, growth-differentiation factor 3 (GDF3), augments progression of B16 melanoma

(胚性幹細胞特異的遺伝子の GDF3は

マウス B16悪性黒色腫細胞の腫瘍形成を促進する)

悪性腫瘍細胞は ES (embryonic stem) 細胞に特異的な抗原を含め胎児性抗原を発現していることが多い。これら悪性腫瘍中に観察される胚性抗原の多くが腫瘍形成や腫瘍の悪性化に関係している。Growth-differentiation factor 3 (GDF3) は転写成長因子である TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属し、胚性幹細胞や早期胚でも発現している。GDF3 の高発現は、ヒト精巣に発生した胚細胞性腫瘍である精巣上皮腫、ならびに乳癌で観察される。しかしながら、GDF3 の役割はいまだ明らかではない。

本研究では癌と胚性幹細胞特異的遺伝子の関係を明らかにすべく実験系が形成され、それらを論ずるにあたり、(The cancer stem cell; CSC, The cancer stem cells ; CSCs) 仮説に着目している。

CSC仮説は最近の研究では固形癌もCSCに由来するという証拠が得られている。既出の論文ではヒト悪性黒色腫もCSCを含み、そしてCSCから分化した腫瘍がABC5を発現していると報告されている。マウスの悪性黒色腫B16-F10細胞もCSC様の細胞を含んでおり、それらはCD133、CD44、そしてCD24を発現している。

実験結果では、GDF3の過剰発現はマウスのB16-F1とB16-F10による悪性黒色腫の腫瘍形成を促進するが、G1とG5による肝細胞癌では促進しなかった。またGDF3過剰発現はB16-F1とB16-F10の両者においてCD24の発現を増加させた。

B16 サブラインにおける CD24 の発現分析は、GDF3 の分析と一致するが、肝癌細胞 G1 と G5 の細胞サブラインは GDF3 による CD24 発現を導く能力が欠陥していた。GDF3 による CD24 発現上昇のメカニズムは不明である。

審査会で、副査の田中教授からは、今回なぜ悪性黒色細胞を固形がんのなかから選択したのか、という質問なされた。申請者は今までの論文で癌幹細胞の存在が示唆されていた固形癌のうちの一つであったこと、成長が早く、実験材料として扱いやすかったからであると回答した。また、幹細胞に特異的な sphere 形成などの確認はなされているか、GDF3 の免疫学的染色がなされているか、またヒトへの応用の全段階としてヒトの悪性黒色腫の使用は考えられなかったかという質問がなされた。申請者は sphere 形成実験や GDF3 の免疫学的染色は本研究ではなされておらず、ヒトの悪性黒色腫も研究過程で培養を試みたが発育が悪く、実験材料として不適切であった可能性があるかと回答した。

副査の佐邊教授からは、本研究の移植実験において、腫瘍細胞がマウスに皮下注射される際の、EMT 獲得についての考察がなされているかという質問があった。すなわち皮下注射そのものが炎症を惹起し、それによるサイトカインの誘導により EMT like な変化が起こった可能性を示唆され、それを確認するための少量の腫瘍細胞の導入などを試みているかとの質問であった。申請者は、今回、腫瘍細胞の少量移植はなされておらず、今後の課題として考えたいと回答した。副査の志田教授からは、本実験ではモノクローナルな腫瘍ではないのではないかと疑問を呈された。申請者は、本研究過程で GFP を発現する細胞クローンを樹立し、それによるモノクローナルな細胞集団を得ることを試みたこと、しかしそれらは今回確立し得なかったと回答した。また、本研究では癌幹細胞ではなくても腫瘍形成能があるように見受けられるので、その定義などについて質問があった。申請者は、過去の論文で様々な腫瘍全体における様々な癌幹細胞の割合が報告されていると回答した。主査の浜田准教授から癌幹細胞様の働きをする細胞を説明する語彙の使用が色々あること、またその言葉は各研究者がある範囲で定義しても良いが、その定義に従い実験系を組み立てることの助言があった。

副査の浅香教授から、GDF3 は ES 細胞に発現している遺伝子であることから、胎児性の細胞は使用しなかったのか、また他の癌種の使用についての質問があった。申請者は今回の実験では、それらの細胞の使用には至らなかったことの経緯を説明した。

最後に、主査の浜田准教授からは、論文記載の際の語彙の使用、また学位論文に関しての助言があり学位申請審査を終了した。

本研究は、GDF3 が腫瘍増殖を促進するとともに CD24 の発現を誘導することを示した最初の報告であり、今後、CD24-Siglec G 経路と腫瘍浸潤と腫瘍増殖中に構築される自然炎症反応の関連を明らかにする研究が期待される。

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