

学 位 論 文 題 名

Intracellular estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 exerts *in vivo* tumor-promoting effects via its coiled-coil region

(腫瘍細胞内におけるestrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9の発現はcoiled-coil領域を介して悪性化に寄与する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 腫瘍悪性化の因子を解析することは、その因子による予後の検討や治療のターゲットとして臨床への応用という観点から重要なことである。最近、estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 (EBAG9)の腫瘍細胞での役割が解析されているが、未だ解明には至っていない。EBAG9はestrogen標的遺伝子として同定されたもので、estrogen受容体がestrogen応答配列に結合することにより転写活性を起こす。EBAG9はreceptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1)としても報告されており、RCAS1と腫瘍の悪性化の関係については、臨床検体を用いた解析により相関関係が報告されている。

本研究では、マウス腫瘍細胞に EBAG9 を強制発現させ、腫瘍細胞と同系のマウスを用いて腫瘍細胞悪性化に関する検討を行った。また、併せて coiled-coil 領域を欠損させた変異体を強制発現した腫瘍細胞も作製し、coiled-coil 領域の腫瘍悪性化に関わる解析も行った。

【材料と方法】 レトロウイルスベクターpGCDNを用い、全長のEBAG9(EBAG9-FL)、C末端のCC領域が欠損させたEBAG9(EBAG9-TR)をEG-7(C57Bl/6由来、OVA発現マウスリンパ腫細胞株)、MethA(BALBc由来、マウス肉腫細胞株)に強制発現させた細胞を作製し、以下の実験を行った。

- (1) 細胞内、細胞外のEBAG9の発現を、EBAG9抗体を用い、フローサイトメトリーで解析した。
- (2) MethAにおけるEBAG9-FL, EBAG9-TRの局在を、抗EBAG9抗体で染色し、共焦点顕微鏡を用いて解析した。
- (3) *in vitro*での細胞増殖能をMTTアッセイにより解析した。
- (4) 同系のマウス(C57Bl/6N, BALBc)に作製した腫瘍細胞を移植し、*in vivo*での腫瘍容積を解析した。
- (5) 強制発現後、細胞のMHC ClassIの発現、B7 homolog 1 (B7-H1), B7 homolog 4 (B7-H4)の発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。
- (6) T細胞に与える影響を作製した細胞の培養上清液を用い解析した。

統計学的有意差は、Tukey's test, one-way ANOVA, Kruskal-Wallis ANOVA, Dunn's test にて評価し、 $P<0.01$ を有意とした。

【結果】 (1) EG7の野生株では、細胞内、細胞表面でEBAG9が発現していたが、EBAG9-FL, EBAG9-TR強制発現細胞では、EBAG9は細胞内でのみ発現増強しており、細胞表面での強発現は認めなかった。MethAの野生株では、細胞表面、細胞内でEBAG9は発現しておらず、強制発現したEBAG9-FL, EBAG9-TRは細胞内でのみ認められた。

(2) 共焦点顕微鏡による観察では、MethAに強制発現したEBAG9-FL, EBAG9-TRは細胞内で認められたが、細胞内での局在は認めなかった。

- (3)EBAG9-FL強制発現細胞、EBAG9-TR強制発現細胞共に、*in vitro*での細胞増殖能の亢進は認められなかった。
- (4)*in vivo*での腫瘍の増大は、コントロール群と比較して、EBAG9-FL強制発現細胞で有意に亢進が認められた。
- (5)作製した細胞で、MHC ClassI, B7-H1, B7-H4の何れも発現の低下増強は認めなかった。
- (6)作製した細胞の、培養上清のT細胞の増殖に与える影響は、コントロール細胞の上清と比べて有意差は認められなかった。

【考察】レトロウイルスを用い、マウス腫瘍細胞にEBAG9-FL、EBAG9-TRを安定して強発現させた細胞を作製し、同系のマウスにその腫瘍細胞を移植することで、*in vitro*, *in vivo*においてEBAG9が腫瘍細胞悪性化に与える影響の解析を行った。

強制発現させたEBAG9-FL, EBAG9-TRは、細胞内で発現していることが確認され、*in vitro*での増殖には差が認められなかったことより、EBAG9は細胞増殖率そのものに影響を及ぼすものではないと考えられた。しかし、*in vivo*での同系マウスに対する細胞移植実験ではコントロール群と比較してEBAG9-FL強制発現細胞移植群での腫瘍容積増大率が有意に高かったことより、EBAG9-FLの発現が、生体内において腫瘍細胞周囲の環境に影響し、腫瘍を増大させていると考えられる。EBAG-9が22.1.1抗体を用いてRCAS1として報告された際、C末端にあるcoiled-coil領域が細胞表面にリガンドとして発現し、NK細胞やT細胞に存在するリセプターと結合することにより、免疫細胞にアポトーシスを起こすとされていたが、本実験結果では、22.1.1抗原の発現と悪性化は関連せず、それを支持しなかった。しかし、移植した細胞の生着時における宿主免疫細胞からの攻撃の回避に働いていることが予想されたため、MHC class I, B7-H1, B7-H4の発現についても解析したが、EBAG-9強制発現細胞において、MHC class Iの低下やB7-H1, B7-H4の発現増強は認めなかった。また、EBAG-9強制発現細胞の分泌物による免疫細胞への影響を調べるため、EBAG-9強制発現細胞の培養液を用い、T細胞に与える影響を解析したが、有意な差は認められなかった。

本研究では、C末端に存在するcoiled-coil領域を欠損させた変異体を強制発現させた腫瘍細胞も作製し、*in vitro*, *in vivo*でcoiled-coil領域の検討も行ったが、欠損変異体強制発現の場合、*in vitro*での腫瘍増殖率、*in vivo*での腫瘍容積増大率の亢進は認められなかった。このため、このcoiled-coil領域が細胞内で働くことにより腫瘍悪性化に寄与しているものと推察された。

【結語】

生体における腫瘍増殖促進は、ひとつの遺伝子や蛋白によって起こるものではないが、EBAG9はcoiled-coil領域を通じて細胞内で腫瘍の悪性化に寄与するもののひとつであることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 平 野 聡

副 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 田 中 伸 哉

学 位 論 文 題 名

Intracellular estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 exerts *in vivo* tumor-promoting effects via its coiled-coil region

(腫瘍細胞内におけるestrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9の発現はcoiled-coil領域を介して悪性化に寄与する)

腫瘍悪性化の因子を解析することは、その因子による予後の検討や治療のターゲットとして臨床へ応用するという観点から重要なことである。最近、estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 (EBAG9)の腫瘍細胞における役割が解析されているが、未だその機序は明らかになっていない。EBAG9はestrogen 標的遺伝子として同定されたもので、estrogen 受容体がestrogen 応答配列 (estrogen-responsive element) に結合することにより転写活性を起こす。EBAG9と腫瘍の悪性化の関係については、臨床検体を用いた解析により相関関係が報告されている。

本研究では、2種類のマウス腫瘍細胞株 (EG7 : c57BL/6 lymphoma、MethA : BALBc fobrosarcoma) に EBAG9 の全長を過剰発現させた細胞株 (EBAG9-FL) を作製し、*in vivo* で腫瘍細胞株を同系のマウスに移植し増殖能、*in vitro* で EBAG9 の発現および増殖能を検討し、EBAG9 の腫瘍細胞悪性化に関する検討を行った。また、EBAG9 の C 末端に存在する coiled-coil 領域を欠損させた変異体 (EBAG9-TR) を過剰発現した腫瘍細胞も併せて作製し、同部位の腫瘍悪性化に関わる解析も行った。

過剰発現させたEBAG9-FL、EBAG9-TRは、*in vitro*での増殖に影響しなかったが、*in vivo*ではコントロール群と比較してEBAG9-FL過剰発現細胞移植群での腫瘍増大が亢進していたため、EBAG9-FLの発現が、生体内において腫瘍細胞周囲の環境に影響し、腫瘍を増大させていると考えられた。移植した細胞の増殖時における宿主免疫細胞からの攻撃の回避に働いていることが予想されたため、MHC class I、B7-H1、B7-H4の発現について解析したが、EBAG9過剰発現細胞において、何れも変化はなかった。また、分泌物による免疫細胞への影響を調べるため、EBAG-9過剰発現細胞の培養液を用い、T細胞に与える影響を解析したが、有意な差は認められなかった。過剰発現させたEBAG9-FL、EBAG9-TRは細胞内で発現しており腫瘍悪性化を誘導していることから、細胞内の介在分子の働きにより免疫回避を惹起させる可能性が示唆された。本研究では、C末端に存在するcoiled-coil領域を欠損させた変異体を過剰発現させた腫瘍細胞も作製し、*in vitro*、*in vivo*でcoiled-coil領域の検討も行ったが、欠損変異体過剰発現の場合、*in vitro*での腫瘍細胞増殖、*in vivo*での腫瘍容積増大の亢進は認められなかった。このため、同部位が細胞内で働くことにより腫瘍悪性化に寄与しているものと推察された。

口頭発表に続き、副査田中伸哉教授より1) EBAG9発現と癌の悪性化についての臨床からの報

告、2)免疫染色などでの検討、3)細胞内での発現する部分、4)結果から得られる情報で考えられる機序について、副査有賀正教授より5)EG7細胞株での細胞表面での発現、6)腫瘍悪性化に際してestrogen-responsive elementでのmutationの可能性について、主査平野聡准教授より7)共焦点レーザー顕微鏡を用いた撮像の、従来のwide-field顕微鏡との相違、8)報告されているEBAG9発現細胞での進展様式について、9)estrogen-responsive elementの下流にあることによる、発現細胞の臨床フォローアップ上の注意点、10)EBAG9ノックアウトマウスを用いた正常細胞での機能検討について質問があった。いずれの質問に対しても、発表者は主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を交えて適切に回答した。

この論文は、未だ機序不明だが腫瘍悪性化と関連しているとの報告がある因子を、生体内で検討し、免疫回避の可能性を示した点で高く評価され、手法を含め今後の機序解明に応用されることを期待される。

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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。