

主論文の要旨

**Detection of a soluble form of CD109 in serum of
CD109 transgenic and tumor xenografted mice**

〔 CD109トランスジェニックマウスおよび腫瘍移植マウス血清中に
おける分泌型CD109の検出 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：高橋 雅英 教授)

坂倉 寛紀

【緒言】

CD109は α 2マクログロブリン/C3,C4,C5ファミリーに属するGPIアンカー型膜糖タンパク質である。正常組織においては皮膚や精巣など限られた組織で発現が確認されている。我々はこれまでにCD109が肺・食道・子宮頸部・口腔の扁平上皮癌，膀胱尿路上皮癌などの癌組織において高発現となることを報告してきた。またCD109は*in vitro*において，*furin*により180kDaのN末側フラグメントと25kDaのC末側フラグメントに切断され，N末側フラグメントが培養上清中に分泌されることが明らかとなっている(Fig.1A)。分泌型タンパク質であるCD109は腫瘍組織から分泌され血液，尿などの体液中にも存在している可能性があり，腫瘍由来のものを検出することができれば新規腫瘍マーカーとして利用できる可能性がある。

今回我々は，マウスCD109を全身に発現するトランスジェニックマウスおよびヒトCD109高発現細胞株を用いた腫瘍移植マウスを作成し，その体液中からCD109を検出できるかどうかを検討，腫瘍マーカーとしての有用性について考察した。

【方法】

CAGプロモーターによりマウスCD109を全身に発現するトランスジェニックマウス(mCD109-TGマウス)を作成(Fig.1B)。その血清および尿をサンプルとして，ウェスタンブロッティング法(WB法)により分泌型CD109を体液中から検出できるかどうか測定した。

次にヒトCD109を過剰発現させたHEK293細胞(HEK293-FLAG-hCD109)をBALB/cヌードマウスに移植し腫瘍移植マウスを作成(HEK293腫瘍移植マウス)。移植後42日目になるまで7日ごとに採血を行い，腫瘍由来のCD109を血清中から検出できるかどうかをWB法およびCD109ELISAにて測定した。移植後42日目に腫瘍摘出術を施行。その後も採血を行い血清中CD109の変化を測定した。以上の結果より新規腫瘍マーカーとしての可能性について検討した。

【結果】

野生型マウスでは精巣，皮膚で内因性のCD109の発現を確認できた一方で，mCD109-TGマウスでは心臓，肺，食道，胃，大腸，脾臓，膵臓，膀胱，精巣，卵巣，子宮，皮膚など全身の各臓器においてCD109が過剰に発現していた(Fig.2A)。また同マウスの血清中および尿中からCD109を検出することが可能であった(Fig.2B, 2C)。特に尿中のCD109はその発現パターンが膀胱の発現パターンと類似していた(Fig.2C)。

HEK293腫瘍移植マウス作成に用いたHEK293-FLAG-hCD109ではCD109が過剰に発現しており，その培養上清中にCD109が分泌されていることが確認できた(Fig.3A)。細胞の増殖能ではコントロール細胞(HEK293-VC)と差を認めなかった(Fig.3B)。

HEK293腫瘍移植マウスでの実験スケジュールをFigure 4Aに示す。HEK293細

胞は BALB/c ノードマウスに生着し腫瘍塊を形成することが可能であった。移植後も HEK293-FLAG-hCD109 は CD109 の発現を保っていた。CD109 の発現以外では HEK293-FLAG-hCD109 の腫瘍と HEK293-VC の腫瘍との間に肉眼的所見，組織病理学的所見，増殖能の差を認めなかった(Fig.4B, 4C, 4D, 4E)。

HEK293-FLAG-hCD109 腫瘍移植マウスでは血清中から腫瘍由来の CD109 を検出することができた(Fig.5A)。また，腫瘍サイズの増加に伴い血清中 CD109 濃度は増加した。一方 HEK293-VC 腫瘍移植マウスでは血清中から CD109 を検出することはできなかった(Fig.5B, 5C, 5D)。

HEK293-FLAG-hCD109 腫瘍移植マウスでは腫瘍塊の摘出により血清中 CD109 の濃度は著しく減少した。摘出 17 時間後には腫瘍由来の CD109 濃度は 1/7~1/8 程度に減少し，48 時間後にはほぼ完全に消失した(Fig.6A, 6B)。その半減期は約 5.86 ± 0.17 時間であった。

【考察】

mCD109-TG マウスにおいて血清中および尿中より CD109 を検出することができた。*in vitro*において CD109 が培養上清中に分泌されることは過去に報告されてきたが，本研究により *in vivo*においても分泌型タンパク質として存在することが証明された。腫瘍移植マウスでは尿中から CD109 を検出することはできなかったため，mCD109-TG マウスの尿中から検出された CD109 は膀胱組織由来であると考えられた。

腫瘍移植マウスにおいて血清中から腫瘍由来の CD109 を検出することができ，腫瘍体積と血清中 CD109 濃度の間には正の相関関係が認められた。また腫瘍摘出術後は速やかに減少・消失し，その半減期は 5.86 ± 0.17 時間と比較的短いことが証明された。半減期を他の腫瘍マーカーと比較すると，SCC, CYFRA がそれぞれ 2.2 時間，1.5 時間で CD109 よりやや短く，CEA, CA19-9 がそれぞれ 1.5 日，12 時間でやや長い。したがって CD109 は腫瘍の進行だけでなく術後の経過を測る腫瘍マーカーとしても利用できる可能性が示唆された。

CD109 は口腔をはじめ肺，食道，子宮頸部の扁平上皮癌や膀胱尿路上皮癌などの悪性腫瘍において発現が高くなることが報告されている。これらの悪性腫瘍を持つ患者の血清中や尿中に腫瘍由来の CD109 が分泌されている可能性がある。本研究では 2 種類のマウスモデルを用いて CD109 の腫瘍マーカーとしての有用性について検討したが，今後は臨床応用を進めるために CD109 を発現する悪性腫瘍を持つ患者の血清や尿を用いて検討する必要があると考えられる。

【結論】

mCD109-TG マウスにおいて CD109 は *in vitro*と同様に分泌型タンパク質として血清中および尿中に存在し，検出することが可能であった。HEK293 腫瘍移植マウスにおいて腫瘍由来の CD109 は血清中に分泌され，その血清中濃度は腫瘍サイズの増

減に伴い変化した。以上の結果から CD109 を新規腫瘍マーカーとして利用できる可能性が示唆された。