

主論文の要旨

**CD109 regulates *in vivo* tumor invasion in lung  
adenocarcinoma through TGF- $\beta$  signaling**

〔 CD109 は TGF $\beta$  シグナル制御により肺腺癌の浸潤を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病理病態学講座 腫瘍病理学分野

(指導: 榎本 篤 教授)

滝 哲郎

## 【緒言】

肺腺癌の間質浸潤及びそれに伴う癌間質の形成は最も重要な予後規定因子の一つであるが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。当教室では GPI アンカー型膜タンパク質 CD109 が様々な悪性腫瘍に発現しており、予後規定因子であることを報告してきたが、近年 CD109 が肺腺癌においても予後不良に関わることが報告された。しかしながら、その分子機構については解明されておらず、組織学的な検討もなされていない。今回我々は、肺腺癌における CD109 の機能解析を行った。

## 【方法】

免疫組織化学染色を行ってヒト肺腺癌組織における CD109 発現を評価し、臨床病理学的解析を行った。Cre recombinase の経気道投与によって肺胞上皮特異的に K-Ras と p53 遺伝子の変異を誘導する肺腺癌自然発症マウスモデル(KP マウス)と CD109 ノックアウトマウスを掛け合わせ、CD109 ノックアウトマウスと野生型マウスで形成される腫瘍の組織学的評価及び予後観察を行った。ヒト肺癌細胞株 A549、H1299 細胞の CD109 ノックアウト細胞/強制発現細胞を作成し、in vitro での CD109 の機能解析を行った。免疫沈降及び質量分析を用いた CD109 結合分子の網羅的検索を行い、さらに下流シグナルの解析を行った。

## 【結果】

ヒト肺腺癌切除材料において、CD109 は正常肺胞上皮あるいは腺癌の非浸潤性病変では陰性である一方、浸潤性病変、特に組織学的に高悪性度と判定される部位では陽性になることを発見した(Figure.1A)。また、CD109 発現により自験例を CD109 低発現群・高発現群の 2 群に分類し検討した所、CD109 高発現群は低発現群と比較して浸潤径が大きい・組織学的悪性度が高い・脈管侵襲が多いなどの特徴を示し、有意に予後不良であった(Figure.1B-D, Table.1)。さらに、多変量解析にて CD109 高発現が独立した予後不良因子であることも示された(Table.2)。

肺腺癌モデルマウスでは、野生型マウスと比較して CD109 ノックアウトマウスで腫瘍面積が小さく、間質浸潤の乏しい低悪性度の腫瘍が形成されており、予後は有意に良好であった(Figure.2A-G)。

続いて、ヒト肺癌細胞株 A549 にて CD109 ノックアウト細胞を、H1299 にて CD109 強制発現細胞を作成し(Figure.3A,B)、CD109 が肺癌細胞の浸潤能・移動能を亢進することを見出した(Figure.3C-F)。また、H1299 で organotypic culture 法を用いて浸潤能を評価したところ、CD109 強制発現により浸潤能が増強されることが明らかとなった(Figure.3G,H)。

以上の結果から、CD109 が肺腺癌の間質浸潤を促進することが示された。肺腺癌の間質浸潤にはしばしば線維性の癌間質の形成を伴い、それが重要な予後規定因子であることが知られているため、ヒト・マウスの肺腺癌組織の癌間質に着目し解析を追加して行った。ヒト肺腺癌では、CD109 高発現群にて scar grade で表される膠原線維性

癌間質の形成が促進されていることが明らかになった(Figure.4A,B)。さらに、肺腺癌マウスモデルでは野生型マウスにて、CD109 ノックアウトマウスと比較して活性化した癌関連線維芽細胞マーカーである  $\alpha$ SMA 陽性領域の増加を認めた(Figure.4C,D)。

続いて、分子機構の解析のため、CD109 を強制発現させた H1299 及び HEK293 を用いて、免疫沈降及び質量分析を組み合わせた CD109 結合分子の網羅的な検索を行った(Figure.5A-C)。その結果、CD109 結合分子として間質タンパク質 latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1)を同定し、HEK293 及び肺癌細胞株 H460 において免疫沈降を行い CD109 と LTBP1 の結合を確認した(Figure.5D-G)。LTBP1 は活性のない潜在型 TGF $\beta$  に結合するタンパク質で、他のタンパク質との相互作用により TGF $\beta$  を活性型として放出する機能を有している。そのため、活性型 TGF $\beta$  を定量する Luciferase アッセイを行うと、CD109 が LTBP1 存在下で TGF $\beta$  活性化を促進することが明らかになった(Figure.6A-D)。また、ヒト肺癌組織において、CD109 及び LTBP1 が共に高発現する領域において間質における Smad2 のリン酸化が亢進していることを見出した(Figure.6E,F)。これらの結果により、CD109 による間質浸潤制御の機序として、LTBP1 を介する TGF $\beta$  活性化機構が関わっていることが示唆された。

#### 【考察】

本研究は、CD109 が肺腺癌における癌の間質浸潤を促進する重要な因子であり、肺腺癌の予後不良に大きく関わっていることを明らかにした。また、興味深いことに CD109 はヒト・マウス肺腺癌組織における間質反応に強い関係があり、これらの機序として CD109 と LTBP1 の相互作用による TGF $\beta$  シグナル制御機構を見出した。癌細胞の間質浸潤には癌細胞・癌間質の相互作用が重要であり、TGF $\beta$  はその中で中心的な役割を果たすことが知られているため、本研究結果は肺腺癌の間質浸潤のメカニズムの解明の重要な手がかりになる可能性がある。

しかしながら、特に皮膚扁平上皮を含む上皮細胞においては、CD109 は TGF $\beta$  シグナルを抑制的に制御していることが報告されており、癌細胞・癌間質それぞれにおける CD109 の TGF $\beta$  シグナルに対する挙動の違い及び詳細な分子機構については、さらなる解析が必要であると考えられる。

#### 【結語】

CD109 は肺腺癌の間質浸潤制御因子である。その機序として、LTBP1 を介した TGF $\beta$  活性化制御機構を見出した。