



Bex1 significantly contributes to the proliferation and invasiveness of malignant tumor cells

Doi, Takefumi

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8026号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008026>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Bex1 significantly contributes to the proliferation and invasiveness of malignant tumor cells

Bex1 は悪性腫瘍細胞の増殖能と浸潤能に大きく関与する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

呼吸器外科学

(指導教員：眞庭 謙昌教授)

土井 健史

【背景】

原発性肺癌は癌死の原因として世界的にも重要な疾患であり、発見された段階ですでにリンパ節転移や他臓器への遠隔転移を伴っていることもあるため、依然として予後不良な癌である。悪性胸膜中皮腫は呼吸器外科領域の癌の中でもまれな腫瘍で、遠隔転移をきたす頻度は少ないが浸潤傾向が非常に強いため局所進行が早く、極めて予後不良な癌と言える。

癌細胞が転移を起こすにはいくつもの段階を経る必要があるとわかっており、その中でも浸潤という過程は癌が周囲臓器への直接浸潤・遠隔転移をきたすのに非常に重要な機構である。浸潤能の強さが癌の悪性度を反映しており、原発性肺癌・悪性胸膜中皮腫いずれにおいても浸潤を抑えることが癌の進行を制御することに効果的な可能性がある。

癌浸潤のメカニズムを研究するにあたり、我々は癌浸潤能を評価する手法として 3 次元 *in vitro* モデルの 2 層化コラーゲンゲル半球(double-layered collagen gel hemisphere;DL-CGH)法を開発した。また DL-CGH 法を用いた先行研究において、悪性胸膜中皮腫細胞株の中に浸潤能を示すものと示さないものがあることが判明した。

今回の研究において、この DL-CGH 法を複数の癌細胞株に応用して比較検討することにより、癌細胞の浸潤に関わる候補遺伝子の同定を試みた。

【方法】

細胞株として肺腺癌・悪性胸膜中皮腫の細胞株をそれぞれ複数用いて DL-CGH 法を行い、浸潤能の違いを比較検討した。浸潤能の有無で細胞株を分類・選別し、cDNA マイクロアレイ法にて浸潤能の有無による遺伝子発現の違いを網羅的に調べた。その中でも浸潤能の高い細胞株で共通して発現亢進している遺伝子に標的を絞った。

選別した遺伝子に対して、western blotting によりタンパク質発現の状態を確認した。その上で RNA 干渉法によりその遺伝子の発現を抑制することで肺腺癌・悪性胸膜中

皮腫細胞株の浸潤能や増殖能がどう変化するかを評価した。

【結果】

DL-CGH 法を用いた浸潤能の検討において、肺腺癌細胞株の A549・A110L、そして悪性胸膜中皮腫細胞株の NCI-H28・MSTO-211H がそれぞれ浸潤能のないもの・あるものとして選別できた。浸潤傾向を示す細胞については樹状突起を伸ばして周囲へ浸潤する様子が観察できた。

肺腺癌・悪性胸膜中皮腫のそれぞれの細胞株間の遺伝子発現の違いを cDNA マイクロアレイ法により網羅的に調べた。その結果から A110L・MSTO-211H に共通して発現が亢進している遺伝子を絞り込み、中でも浸潤能のない細胞株と比べて発現亢進の度合いがより高い遺伝子を検索した結果、*Bex1* という遺伝子が候補として選別できた。

選別した *Bex1* について A110L・MSTO-211H に対して RNA 干渉法による *Bex1* のノックダウンを行い、その細胞株を用いた DL-CGH 法による浸潤能の評価を行った。いずれの細胞株においても、*Bex1* の発現抑制により外殻に樹状突起を伸ばして浸潤する細胞がほぼ見られなくなり、浸潤能が抑制されていることが観察できた。さらに内殻における細胞密度が減少している様子も観察できたため、細胞数カウントによる細胞増殖能も評価したところ、*Bex1* のノックダウンにより A110L・MSTO-211H とともに細胞増殖能も有意に低下することが示された。

【考察】

本研究において、DL-CGH 法を肺腺癌・悪性胸膜中皮腫細胞株に応用した検討を行うことで、浸潤能の高い細胞株において *Bex1* が候補遺伝子として発現が亢進しているのを突き止めることができた。細胞の浸潤能を評価・観察する手法は数多くあるが、我々は他の手法に比べてより簡便に行える 3 次元 *in vitro* モデルの DL-CGH 法を開発し発表した。この手法により細胞が浸潤する様子を容易にリアルタイムで観察することを可能とした。今回の研究では DL-CGH 法をさまざまな細胞株に応用することで、

細胞株を浸潤能の有無により分類できることが示された。DL-CGH 法は細胞の浸潤する様子を観察できるだけでなく浸潤能の有無により細胞株をスクリーニングする技術としても有用であることが分かった。

今回癌細胞の浸潤能に深く関わる候補遺伝子として選別できた *Bex1* について、これは brain expressed X-linked (Bex) ファミリーの中の 1 つである。Bex ファミリーのタンパク質には *Bex1-5* が存在し、*Bex1* は軸索の再生など主に神経発生に関与することが知られている。それ以外には、p75 neurotrophin receptor を介して cell cycle の制御にも関わっている。過去の研究では乳癌や神経内分泌腫瘍などにおいて *Bex1* の発現が亢進していることが報告されているが、原発性肺癌や悪性胸膜中皮腫についてはこれまでに *Bex1* との関連性を報告した研究は見られない。

今回の研究結果から、肺腺癌・悪性胸膜中皮腫細胞株において浸潤能の高い細胞で *Bex1* の発現が亢進しており、*Bex1* のノックダウンにより癌細胞の樹状突起形成が抑制されることで浸潤能が大きく低下する可能性が示された。同時に、*Bex1* の発現を低下させることで細胞増殖能も大きく抑制されることが示された。

【結論】

DL-CGH 法を用いた細胞株浸潤能の検討結果より、*Bex1* は癌浸潤能に関与することが示された。*Bex1* は神経発生に関わる遺伝子として知られているが、癌における役割はまだよくわかっていない。*Bex1* は癌細胞の浸潤能のみならず増殖能に深く関与する重要な遺伝子であり、原発性肺癌や悪性胸膜中皮腫における分子標的薬の候補となる可能性が示唆された。