



Title	Expression of Transmembrane-4 Superfamily (TM4SF) Proteins in Human Lung Cancer Cells : Down-regulation of CD9 and Its Contribution to Cell Motility in Small Cell Lung Cancer
Author(s)	船越, 俊幹
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43729
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ふな 船 越 俊 幹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Expression of Transmembrane-4 Superfamily (TM4SF) Proteins in Human Lung Cancer Cells: Down-regulation of CD9 and Its Contribution to Cell Motility in Small Cell Lung Cancer (肺がん培養株における TM4SF (transmembrane-4 super family) タンパクの発現：小細胞肺がん培養株における CD9 の発現低下とその細胞運動への寄与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川 瀬 一 郎 (副査) 教 授 荻 原 俊 男 教 授 吉 崎 和 幸

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

TM4SF (transmembrane-4 superfamily) は細胞膜を 4 回貫通する構造を持つ膜タンパクであり、細胞膜上でインテグリンとコンプレックスを形成して細胞運動 (cell motility) を調節すると考えられている。最近、悪性腫瘍における TM4SF タンパクの発現に関する報告がなされている。非小細胞肺がん (non-small cell lung cancer、NSCLC) においては、その転移に TM4SF のメンバーである CD9 と CD82 の発現減少が関わっていることが最近になって分かってきた。一方、より悪性度の強い小細胞肺がん (small cell lung cancer、SCLC) の浸潤・転移とこれら TM4SF タンパクとの関連については検討されていない。本研究の目的は、肺がん培養株を用いて TM4SF タンパクの発現を検討し、NSCLC と SCLC で発現の違いがあるかどうか、またその違いが両者の細胞運動性の違いと相関するかどうかをみることである。

【方法】

- 1) 肺がん培養株 (SCLC 17 株、NSCLC 13 株) での TM4SF タンパク (CD9、CD63、CD81、CD82、CD151、NAG-2) の発現を、抗 TM4SF 抗体を用いた flow cytometry にて解析した。
- 2) 肺がん培養株から total RNA を抽出し、reverse transcription (RT) -PCR を用いて CD9、CD63、 β -actin の発現を検討した。
- 3) CD9 cDNA の発現ベクターを用いて、CD9 を発現していない SCLC 株 OS3-R5 への transfection を行い、CD9 を強発現する stable clone、OS3-R5-pZCD9 を樹立した。この OS3-R5-pZCD9 と、親株 OS3-R5 および mock transfectant、OS3-R5-pZSV との細胞運動性の差を、Boyden chamber と time-lapse videomicroscopy を用いたフィブロネクチン (fibronectin、FN) 上での cell motility assay にて検討した。
- 4) OS3-R5-pZCD9 に導入された CD9 が β 1 インテグリンとコンプレックスを形成するかどうか、免疫沈降による共沈実験を行った。
- 5) CD9 の発現が OS3-R5 以外の SCLC 培養株の細胞運動性に影響を与えるかどうかを検討するため、CD9 cDNA を発現ベクター、pEGFP-C1 に組み込んだ pEGFP-CD9 を作製した。この pEGFP-CD9 を用いて SCLC 株 OS3-R5、CADO-LC6、NCI-69、OS10 への transient transfection を行い、CD9 導入細胞の運動性を FN 上での time-lapse

videomicroscopic motility assay で検討した。

6) 臨床検体 (SCLC 7 例、NSCLC 1 例) を用いて抗 CD9 抗体による免疫組織染色を行い、腫瘍での CD9 の発現を検討した。

【成績】

1) flow cytometry で調べた TM4SF タンパクのうち、CD63、CD81、CD82、CD151 は大部分の肺がん培養株で発現しており、SCLC と NSCLC との間で有意差を認めなかった。一方、CD9 と NAG-2 は、NSCLC に比べ SCLC では発現する細胞が有意に少なかった。特に CD9 は、NSCLC で 13 株中 12 株が発現していたのに対し、SCLC では、17 株中 14 株において発現が低下していた ($p < 0.0001$)。

2) RT-PCR では、CD63 と β -actin は SCLC と NSCLC との間に発現の差は認められなかった。一方、CD9 は調べた NSCLC 株すべてで発現されているのに対し、SCLC ではほとんどの培養株で CD9 が検出されなかった。以上の結果から、CD9 の発現は SCLC と NSCLC との間で大きく異なり、SCLC における CD9 の発現低下は、主として CD9 遺伝子の転写レベル以前で起こっていると考えられた。

3) Boyden chamber を用いた motility assay では、OS3-R5 は多くの細胞が FN でコートしたメンブレンをすり抜けて lower chamber に移動した。これは抗 β 1 インテグリン抗体存在下ではほぼ完全に抑制され、FN 上での OS3-R5 の細胞運動は β 1 インテグリン依存性と考えられた。一方、OS3-R5-pZCD9 では、親株 OS3-R5 の約 20% の細胞しか移動しなかった。同様の所見は、time-lapse videomicroscopic motility assay でも認められ、OS3-R5-pZCD9 では FN 上での細胞運動による移動距離が、OS3-R5 に比べやはり 20% 程度に低下していた。

4) 免疫沈降実験の結果、CD9 はコントロール抗体や抗 N-CAM 抗体では沈降されなかったが、抗 β 1 インテグリン抗体では β 1 インテグリンと共沈され、CD9 が β 1 インテグリンと結合していることが示唆された。

5) SCLC 株 OS3-R5、CADO-LC6、NCI-69、OC10 に pEGFP-CD9 を transient transfection し videomicroscopic motility assay で検討したところ、GFP-CD9 を発現する腫瘍細胞は GFP のみを発現する細胞に比べ、すべての培養株で一様に細胞運動性の減少を示した。

6) 臨床検体を用いた免疫組織染色では、肺正常部および NSCLC の腫瘍部は CD9 陽性であったが、SCLC の腫瘍部は 7 例とも陰性であった。

【総括】

本研究の検討で、SCLC では NSCLC に比べ、培養株および臨床検体とも CD9 の発現が高頻度に低下していることがわかった。また SCLC 株への CD9 の強制発現は、FN 上での細胞運動の低下をもたらした。このことから NSCLC に比べ非常に早期からおこる SCLC の局所浸潤や転移は、CD9 の発現低下が一因である可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

Transmembrane-4 Superfamily (TM4SF) は細胞膜を 4 回貫通する構造を持つ膜タンパクであるが、最近、悪性腫瘍における TM4SF の発現に関する報告がなされている。

本研究では、肺がん培養株において各種 TM4SF の発現を検討した。結果、非小細胞肺がんにくらべ、より悪性度の強い小細胞肺がんにおいて、TM4SF のメンバーである CD9 の発現が有意に減少していた。臨床検体においても、免疫組織染色で、小細胞肺がんの CD9 の発現減少を確認した。

さらに小細胞肺がん培養株に CD9 を強制発現させると細胞運動性の低下を示したことより、CD9 の発現減少が細胞運動性の亢進をもたらしていると考えられた。

細胞運動性と悪性度は相関すると考えられており、非小細胞肺がんにくらべ、非常に早期からおこる小細胞肺がんの局所浸潤や転移は CD9 の発現低下が一因である可能性を示唆したものである。

以上より本研究は学位に値するものと認める。