

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780285

研究課題名（和文）犬乳腺腫瘍の悪性化における上皮間葉化（EMT）現象とその臨床的意義

研究課題名（英文）Clinical significance of the Epithelial-Mesenchymal Transition in the malignant transformation of canine mammary gland tumors.

研究代表者

中川 貴之（NAKAGAWA TAKAYUKI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40447363

研究成果の概要（和文）：犬乳腺腫瘍の悪性化機構における上皮間葉化現象（EMT）とその意義を明らかにするため、まず犬乳腺腫瘍自然発症例の組織サンプルを用いて EMT 関連因子の免疫染色を行ったところ、乳腺腫では EMT は見られない一方で乳腺癌で EMT が起こっていることが明らかとなった。犬乳腺腫瘍細胞株においても EMT 関連因子を検索したところ同一症例から分離された細胞株の中から、E-cadherin,  $\beta$ -catenin が高発現し上皮様の性質を示す CHMp13a 株と、vimentin, N-cadherin が高発現し間葉様の性質を示す CHMp5b 株が得られた。トランスウェルアッセイにより運動能、浸潤能を評価したところ CHMp5b 株は有意に高い運動能と浸潤能を示し、EMT と細胞の悪性度との関連が示唆された。より詳細に検討するためにこれら細胞株を用い TGF- $\beta$  刺激による EMT 誘導実験を行ったところ、TGF- $\beta$  刺激下で vimentin が一過性に誘導され、その発現動態は Smad2 のリン酸化の動態と一致した。また TGF- $\beta$  刺激 EMT 誘導による運動能と浸潤能の変化を xCELLigence system により経時的に評価したところ、EMT 関連因子の発現動態と同様に運動能、浸潤能ともに一過性に上昇を認める結果となった。これらの結果から EMT が犬乳腺腫瘍の悪性化に関与していることが示唆されるものの EMT は不安定で動的なものであり、それには抑制性 Smad の発現が関与している可能性が示唆された。今後は RNAi を用い EMT の制御を行い EMT と犬乳腺腫瘍の悪性化の関連を明らかにする実験を移植マウスモデルを用い進め、得られた知見を自然発症臨床例において確認する研究を継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：To clarify the significance of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the malignant transformation of canine mammary gland tumors (cMGTs), serial experiments were intended. EMT related factors were examined on tissue specimens collected by the surgical resection from clinical cases of spontaneous cMGTs. Immunohistochemical analysis revealed that the protein expression pattern indicating EMT was observed only in the adenocarcinoma cases, but not in the adenoma cases. For further in vitro studies, we obtained two clonal cell lines derived from the same cMGT patient, which show the different malignancy in the culture condition and the transplanted mouse model. Highly malignant clonal cell line, CHMp5b, was found to have the mesenchymal characteristics with high expressions of vimentin and N-cadherin, whereas low malignant cell line, CHMp13a, showed the epithelial characteristics with high expressions of E-cadherin and  $\beta$ -catenin. In the trans-well assay, CHMp5b showed significantly higher motility and invasive potential than CHMp13a. These results suggested the relationship between the EMT status and the malignancy of cMGT cells. By the stimulus of TGF- $\beta$  on these cell lines, vimentin expression was induced and this expression was paralleled with the phosphorylation of Smad2. In the experiment using xCELLigence system, changes of expressions of EMT related proteins were correlated with motility and invasive potential of these cells dynamically. From the results of these experiments, EMT might relate to the malignant transformation of cMGT dynamically and Smad2 cascades might be a crucial factor in converting the EMT status. We continue the further study on the significance of EMT in canine MGT malignancy with the controlled experiment by RNAi method, and confirm these findings obtained from these studies in the clinical cMGT cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 臨床獣医学

キーワード：外科、上皮間葉化、犬、乳腺腫瘍、TGF-β、Smad

1. 研究開始当初の背景

犬は近年伴侶動物としてその生活や医療の質が向上し、余命が延長とともに腫瘍性疾患が大きな問題となってきた。人医領域においてその腫瘍研究が進むも悪性腫瘍の根治が困難であると同様に、犬においてもその治療は未だ非常に困難である。犬の乳腺腫瘍は発生頻度が非常に高く、且つその半数を占める悪性腫瘍では所属リンパ節や肺をはじめとする遠隔臓器に転移しやすく臨床問題となることが多い (Brody RS et al., J Am Anim Hosp Assoc., 1983, Sorenmo K, Vet Clin North Am Small Anim Pract., 2003)。また犬では人と異なり胸腹部にかけて左右4～5対の複数の乳頭を持ち広範な乳腺を有するため肉眼的病変部以外からの続発や術後再発がみられるだけでなく、同一乳腺内に良性腫瘍と悪性腫瘍が混在する場合もあり (Shofer FS et al., Breast Cancer Res., 1989) 発生頻度の非常に高い腫瘍でありながら未だ正確な術前診断や治療が確立されていない疾患のひとつである。病理学的な乳腺組織における腫瘍の悪性化の過程は過形成、上皮内癌、非浸潤性癌、浸潤性癌があり、犬乳腺腫瘍においてはこれらを同一乳腺上に同時にみる (Sorenmo K et al., 26th Annual conference of Vet Cancer Society, 2006) ことがある。これら複数の病理学的に異なる病変は同じ組織より次々に癌化し悪性形質を獲得していったものと推測され、これらの変化を解析することは犬乳腺腫瘍の悪性化の機序を明らかにするだけでなく、より正確な新規診断法や治療法開発につながるものと考えられる。

腫瘍の悪性形質の重要なものとして転移浸潤能が挙げられる。本研究室ではこれまでに犬乳腺腫瘍の転移浸潤機構解明に向けた研究を進め、細胞間接着因子 E-cadherin と β-catenin の結合 (Takauji S et al., J Vet Med Sci, 2007, Uyama R et al., Vet Comp Oncol., 2006)、E-selectin と sialyl Lewis X の結合 (Nakagawa T et al., J Vet Med Sci., 2002)、細胞走化因子 CXCR4 と SDF-1 の関連 (Oonuma T et al., J Vet Med Sci., 2003) などが乳腺腫瘍の転移に関与

していることを明らかにしてきた。また犬乳腺腫瘍細胞株を用いたマウス実験においても、マイクロアレイ解析の結果から E-cadherin の変化が示唆 (Murai et al., Res Vet Sci, under submission) された。E-cadherin と β-catenin の発現の変化は本来強固な結合を持つ上皮系細胞である乳腺細胞が浸潤転移しやすい間葉系の形質へと変化する重要な要素 (Shiozaki H et al., Cancer, 1996) であり、近年ヒト乳癌をはじめとする上皮系腫瘍において注目されるようになってきた上皮間葉化現象 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) に関与する因子のひとつとしても重要視されている (Fuchs IB et al., Anticancer Res., 2002)。EMT は細胞膜表面接着因子の減少/消失、運動能の獲得、上皮/間葉マーカーの変化によって定義されるものである (Stefan G et al., Nature Rev., 2003)。変化する因子としてこれまでに E-cadherin、β-catenin (Stockinger A et al., J Cell Biol., 2001, Lombaerts M et al., Br J Cancer, 2006)、N-cadherin (Nakajima S et al., Clin Cancer Res., 2004, Kuphal S et al., Oncogene, 2006)、ZO-1 (Polette M et al., Cells Tissues Organs., 2007)、cytokeratin (Willipinski SB et al., Clin Cancer Res., 2005)、vimentin (Korsching E et al., J Pathol., 2005) 等が知られている。

2. 研究の目的

これらの背景から犬乳腺腫瘍の悪性化においても EMT が主要な役割を果たしているとの仮説のもと、本研究では犬乳腺腫瘍の様々な悪性段階における EMT 関連因子の発現解析を行うことにより犬乳腺腫瘍の悪性化機構を明らかにすること、また、それに基づくより正確な悪性度判定指標の策定や増殖ないし転移抑制を目的とする新規分子標的治療法の開発などの臨床応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の実験から成る。それぞれの実験の方法についての詳細は各実験ごとの

研究成果において併せて記載した。

(1)臨床例(同一個体の様々な悪性段階の腫瘍組織)における EMT 関連因子の発現検索と病理学的悪性度との比較検討

(2)同一個体からの悪性段階の異なる犬乳腺腫瘍細胞株の分離と樹立

(3)悪性段階の異なる犬乳腺腫瘍細胞株における上皮間葉マーカーの発現と悪性度との関連の評価

(4)TGF- $\beta$ 刺激による EMT 誘導と犬乳癌細胞株の生物学的動態変化の評価

#### 4. 研究成果

(1)臨床例における EMT 関連因子の発現検索と病理学的悪性度との比較検討

##### 材料と方法

##### 組織サンプル

2007年から2010年の間に、東京大学附属動物医療センターに来院した犬乳腺腫瘍症例のうち外科的切除にて腫瘍組織が得られた症例を対象とした。他の重度の全身性疾患や腫瘍を併発した症例は除外した。年齢、品種、体重、避妊歴、病理組織学的診断、腫瘍サイズ、所属リンパ節浸潤の有無、遠隔転移の有無、予後は、診療記録および飼い主ないし紹介病院への電話調査によりデータ収集を行った。腫瘍サイズはそれぞれの症例において最大の腫瘍の直径とした。所属リンパ節への浸潤は病理診断にて確認し、遠隔転移は胸部 X 線検査にて評価した。また WHO の TNM 分類のよりそれぞれの症例における腫瘍の臨床病期を評価した。

##### 抗体

本実験に用いた抗体とその反応条件および反応時間は以下の通り。

E-cadherin, mouse Ig, 1:1000, 2hrs at RT  
(BD Transduction Laboratories)

$\beta$ -catenin, mouse Ig, 1:2000, 1hr at 37°C  
(BD Transduction Laboratories)

Vimentin, mouse Ig, 1:200, 1hr at 37°C  
(CHEMICON)

##### 免疫組織染色

採取された組織は 10%中性ホルマリンにて固定しパラフィンに包埋した。組織は 2 $\mu$ m の厚みで連続切片を作成し、1枚は病理組織学的診断のために HE 染色を行った。免疫組織染色には DAKO 社の ENVISION+ kit/HRP (DAB)を用いた。内因性ペルオキシダーゼ活性は 0.03% $H_2O_2$ にて除去した。一次抗体とその反応条件と反応時間は前述のとおりである。デキストランポリマーに抗マウス Ig 抗体

と HRP を結合させたポリマー試薬に室温にて 30 分反応させた後、DAB/hydrogen peroxide にて発色処理を行った。封入前にヘマトキシリン染色にて核染を行った。上皮および間葉マーカーの発現は組織の染色性にて評価した。

##### 結果と考察

##### 症例

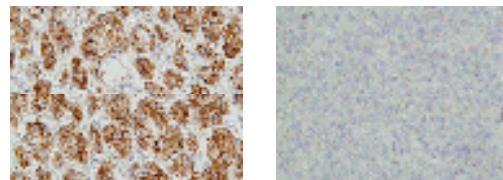
本学附属動物医療センターに来院し外科手術を受けた 22 症例より 28 組織サンプルが得られた。症例の平均年齢は 10 才 11 ヶ月齢 (5 才 3 ヶ月齢~14 才 3 ヶ月齢) で平均体重は 10.9kg (2.7~33.2kg) であった。品種はミニチュア・ダックスフンドが 3 症例、ラブラドル・レトリバー、マルチーズ、トイ・プードル、シーザーが 2 症例などであった。

病理組織学的診断では 20 組織サンプルが乳腺癌、5 組織サンプルが乳腺腫、1 組織サンプルが悪性混合腫瘍であり、また正常乳腺組織も 2 組織サンプル得られた。

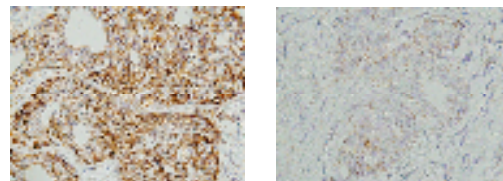
##### 免疫組織染色

何らかの上皮系マーカーの減弱 (E-cadherin と  $\beta$ -catenin の両方あるいはどちらかの発現強度の減弱) が見られた 8 組織サンプルは全て悪性腫瘍 (乳腺癌 7 組織、悪性混合腫瘍 1 組織) であった。また、E-cadherin と  $\beta$ -catenin の両方の減弱が見られた組織は 5 組織サンプル (乳腺癌 4 組織、悪性混合腫瘍 1 組織) であった。(図 1)

図 1



E-cadherin 強陽性 (左) と弱陽性 (右)  
ともに組織型は単純型乳腺癌

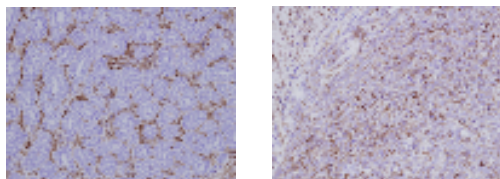


$\beta$ -catenin 強陽性 (左) と弱陽性 (右)  
ともに組織型は単純型乳腺癌

また間葉系マーカーの発現が見られた組織は 7 サンプルであり、これもまた全て悪性腫瘍 (乳腺癌 6 組織、悪性混合腫瘍 1 組織) であった。これら 7 組織サンプルのうち、何

らかの上皮系マーカーの減弱を伴うものは 5 サンプルであった。(図 2)

図 2



vimentin 弱陽性 (左) と強陽性 (右)

左の組織では間質のみが強く染色されている。ともに組織型は単純型乳腺癌

一方で、乳腺腫および正常乳腺腫瘍組織ではこれらの上皮系マーカーの発現の減弱や間葉系マーカーの発現上昇は見られず、腫瘍の悪性化に伴い EMT が発生していることが示唆された。しかしながらこれらの症例の臨床データとの有意な関連はみられなかった。より大規模な症例数での検討が必要かもしれない。また、乳腺癌症例においても EMT が必ずしも起きているわけではなく、悪性化との関連には議論の余地があると考えられる一方で、EMT が生体現象として動的な現象である可能性も示唆され、実験モデルにおけるより詳細な解析が必要と考えられた。

(2) 同一個体からの悪性段階の異なる細胞株の分離・樹立

同一個体の乳癌の様々な悪性段階における EMT 関連因子の検索や評価を行うために、本研究室にて樹立された犬乳癌細胞株をクローニングし悪性段階が異なると思われる細胞株の分離・樹立を試みた。その方法や成果を投稿論文としてまとめたものを以下に掲載する。

#### Article Title:

Establishment of a pair of novel cloned tumour cell lines with or without metastatic potential from canine mammary adenocarcinoma

#### Authors:

K. Murai, T. Nakagawa, Y. Endo, A. Kamida, K. Yoshida, M. Mochizuki, R. Nishimura and N. Sasaki

#### ABSTRACT

We produced 23 cloned cell lines from parental CHMp, which was previously established from a canine mammary adenocarcinoma patient in our laboratory. Two representative cloned cell lines, namely, CHMp-5b and -13a, were selected and characterized for cellular morphology, growth potential and expression of some tumour-related

proteins. Subsequently, we transplanted the 2 tumour cell lines orthotopically into female nude mice to examine their tumorigenicity and metastatic potential. Interestingly, despite sharing the same origin, only CHMp-5b cells metastasized to the lung. Our results indicate that a comparison between these 2 cell lines at the molecular level will help us understand mechanisms of tumour progression, especially in the context of distant metastases originating from canine mammary gland tumours.

#### INTRODUCTION

Canine mammary gland tumour (CMGT) is the most common neoplasia in female dogs, accounting for approximately 50% of all tumours (Brodey et al., 1983; Moe, 2001; MacEwen and Withrow, 1996). Histologically, about 50-60% of CMGTs are considered malignant (Brodey et al., 1983; Moe, 2001; MacEwen and Withrow, 1996). In malignant mammary tumours, tumour invasion to the surrounding tissues and pulmonary metastases are the most significant prognostic outcomes (Hahn et al., 1992; Kurzman and Gilbertson, 1986; Shofer et al., 1989). Mammary cancers in dogs and breast cancers in women are known to share many clinicopathological features (Martin et al., 1984). Therefore, canine mammary gland tumours are considered to be an appropriate and valid model for human breast cancer (MacEwen, 1990).

In this study, we obtained several clones from a CMGT cell line. Newly established cloned cell lines were investigated to determine their characteristics, including morphology, growth potential and protein expression. In addition, 2 representative cloned cell lines were transplanted into immunodeficient mice to analyse their metastatic potential.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Cell culture

Canine mammary carcinoma cell line CHMp, which was previously established from the primary mass of an inflammatory CMGT patient and characterized in our laboratory, was used in this study (Uyama et al., 2006). Cultured CHMp cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 5mg/L gentamicin sulphate and 6mg/L fungizone, and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

##### Cloning

Cell lines were cloned from the parental cell line CHMp using a limiting-dilution method. Briefly, a diluted cell suspension was dispensed into 96-well microplates at a concentration of

1cell/well. The microplates were examined using a microscope immediately after dispensing cells and during culture periodically. Wells suspected of containing more than 2 cells or multiple colonies were not cultured further. This limiting-dilution procedure was repeated twice for reliability.

#### Doubling times

Cells obtained by the limiting-dilution method were plated in Petri dishes (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) at a concentration of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. The number of viable cells was determined every 24 hours using trypan-blue staining, and the doubling time was calculated in the logarithmic growth phase.

#### Antibodies

Primary antibodies used for western blotting were obtained from the following sources: oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) (LAB VISION, Fremont, CA, USA), E-cadherin,  $\beta$ -catenin (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), cytokeratin 18, and vimentin (CHEMICON, Temecula, CA, USA). Dilutions of each antibody used in western blotting were as follows: 1:500 for ER, PgR,  $\beta$ -catenin, and cytokeratin 18, 1:1000 for E-cadherin and vimentin.

#### Western blotting

Sub-confluent cultured cells were lysed in radioimmuno-precipitation-assay (RIPA) buffer (10 mM Tris-HCl, 1% NP40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.1 mM sodium molybdate, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 10 mM sodium fluoride, 25 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphoric acid, and 1 mM EGTA). Protein concentrations were measured using the bicinchoninic acid (BCA) protein-assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). Cell lysates were boiled for 5 minutes in 2x SDS sample buffer and 10 $\mu$ g total protein was resolved by SDS-PAGE. Lysates of other species known to stain positively with each primary antibody were used as positive control (data not shown). After electrophoresis, separated proteins were blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Blots were then incubated for 16 hours at 4°C with PBS-T buffer containing 5% non-fat milk. The blots were incubated with appropriate primary antibodies for 2 hours at room temperature and subsequently incubated with horseradish-peroxidase-conjugated antibodies against mouse Ig (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) for 1 hour at room temperature with slight

shaking. Membranes were developed using the Enhanced Chemiluminescence Plus detection kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

#### Mice

Six- to seven-week-old female, KSN-slc mice (Japan SLC, Inc., Tokyo, Japan) were used as model hosts for the production of experimental pulmonary metastasis by CMGT. Mice were maintained in specific pathogen-free conditions:  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 40-70% humidity, and a 12-hr light-and-dark cycle. Two or 3 mice were placed in one cage (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan), and the cages were set in a laminar-flow-rack housing system (ICM Inc., Ibaragi, Japan). Animals were fed sterilized food (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan) and water ad libitum.

#### Generation of experimental pulmonary-metastasis model

Animal experiments were performed according to the principles outlined in the Guide for Animal Care and Use of the Committee of the Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo. Each of the 2 cloned cell lines was suspended in saline at a dose of  $1 \times 10^7$  cells/200 $\mu$ l and inoculated subcutaneously into the right mammary fat pad of immunodeficient mice using a 21-gauge needle. After the transplantation, the size of each tumour mass was measured using callipers once a week after inoculating tumour cells (measurement began 2 weeks after inoculation). Tumour volume (V) was calculated according to the following formula:

$$V = a \times b^2 \times 1/2 \text{ (mm}^3\text{)}$$

where a and b are the tumour length and width (in mm), respectively. Mice were sacrificed when they showed clinical signs such as dyspnoea and weakness or when the predefined experimental time of 13 weeks passed. Mice were sacrificed and autopsied to detect metastatic lesions in the lungs or other organs. Masses formed at the transplanted site and metastatic masses formed in the lungs were collected for further investigation.

#### Statistical analysis

Comparison of the rate of metastasis among the xenografted mice transplanted with the 2 different cell lines was made by Fisher's exact test. A probability of less than 5% ( $P < 0.05$ ) was considered significant in all analyses.

## RESULTS

### Establishment of cloned cell lines

Twenty-three clones were successfully obtained by cloning of the CHMp cell line. Two clones, CHMp-5b and -13a, were selected as representatives of the variety among the 23 cell lines based on the expression of some proteins,

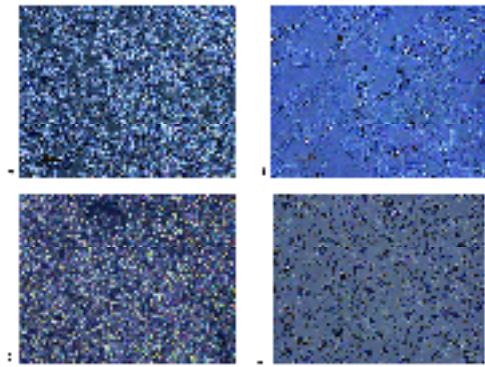
morphology, and doubling times.

Light-microscopy findings

Morphological features of CHMp-5b cells were unique and most of the cells were apparently spindle-shaped. In contrast, CHMp-13a had a large proportion of small round cells (Fig. 1).

Figure 1.

Phase contrast micrographs of cloned cell lines; CHMp-5b (A), (B) and CHMp-13a (C), (D).



Doubling time

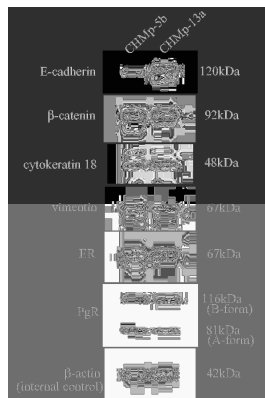
The doubling times of CHMp-5b and CHMp-13a were calculated to be 14.4 and 18.5 hours, respectively.

Western blotting

The 2 cell lines, CHMp-5b and -13a, showed different protein-expression patterns. Expression of E-cadherin was undetectable in CHMp-5b, whereas CHMp-13a expressed E-cadherin. Expression levels of  $\beta$ -catenin, vimentin, ER, and PgR were higher in CHMp-5b than in -13a. Only cytokeratin 18 showed higher expression in CHMp-13a than in -5b (Fig. 2).

Figure 2.

Western blotting analysis for 6 oncological factors of 2 CMGT cloned cell lines.

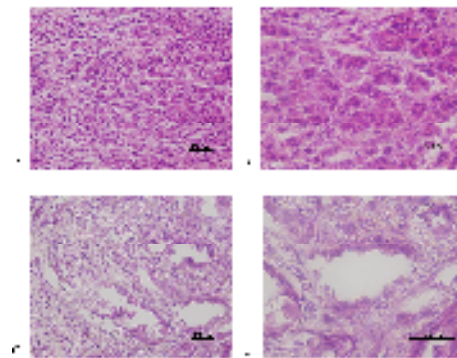


CMGT cell xenografts in immunodeficient mice

Six nude mice were used for each cloned cell line. Most of the mice were sacrificed when they showed clinical signs such as dyspnoea and weakness and some were sacrificed when the predefined experimental time of 13 weeks passed. In all mice, tumour growth was detected at the transplanted site and masses were histologically confirmed to be carcinomas (Fig. 3).

Figure 3.

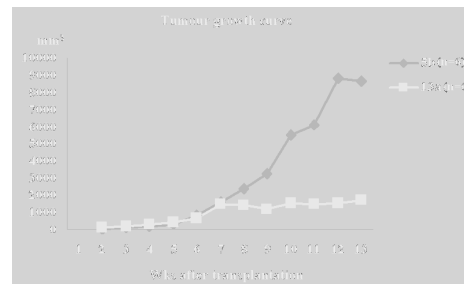
Pathological findings of masses developed at the transplanted site; CHMp-5b (A), (B) and CHMp-13a (C), (D).



Ulceration of primary masses was observed in some mice. Necrosis and fluid accumulation was observed within the tumour masses in some mice. Calculation of the tumour volumes is shown in Fig. 4. The tumour volume increased significantly ( $P < 0.0001$ ) in CHMp-5b-transplanted mice compared to that in CHMp-13a-transplanted mice.

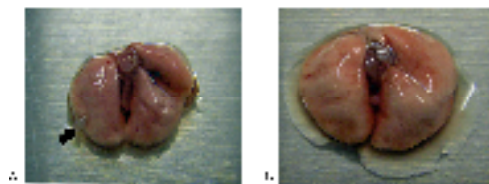
Figure 4.

Changes in calculated tumour volume of mice xenografts. Significant differences were detected between 2 cell lines ( $P = 0.0037$ ).



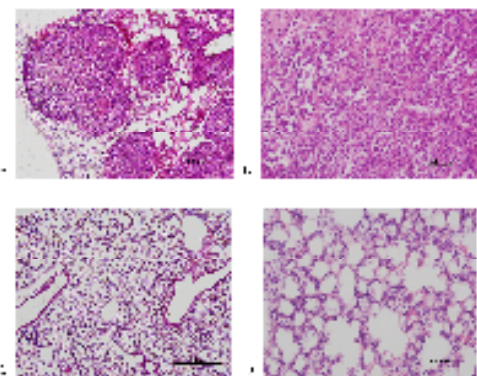
Between the 2 transplanted cell lines, only CHMp-5b cells metastasized to the lung (4 out of 6 mice) but there was not a single metastatic lesion in any mouse transplanted with CHMp-13a. Macroscopic lung findings are shown in Fig. 5.

Figure 5. Gross findings of lungs excised from CMGT-xenografted mice. Small foci were observed on the surface of the lung in CHMp-5b mice (A). There was no metastatic lesion in the lung of CHMp-13a mice (B).



Small superficial pulmonary foci were observed in all mice with pulmonary metastases. Pathological findings of the pulmonary metastatic lesions are also shown in Fig. 6.

Figure 6. Pathological findings of lungs excised from CMGT-xenografted mice; CHMp-5b (A), (B) and CHMp-13a (C), (D). Metastatic lesions were only observed in CHMp-5b mice.



The body weight of mice were  $30.42 \pm 2.69$  g for CHMp-5b group and  $24.02 \pm 2.49$  g for CHMp-13a group. The weight of the primary mass in the CMGT-xenografted mice was  $7.33 \pm 2.07$  g for CHMp-5b group and  $1.14 \pm 0.51$  g for CHMp-13a (data are expressed as mean  $\pm$  SD).

## DISCUSSION

In this study, 23 cloned cell lines were successfully established from the parental cell line CHMp. Of these, we selected 2 representative cell lines based on their characteristics including morphology, growth potential, and expression of some tumour-related proteins. CHMp-5b and CHMp-13a differed in morphology and growth potential indicating that each cell line likely has distinct functions.

The 2 cloned cell lines showed different protein-expression patterns in this study. Cytokeratin, a

characteristic protein of epithelial cells (Henderson et al., 1981), and vimentin, the protein of intermediate filaments of mesenchymal cells (Hellman and Lindgren, 1989), were detected in both cell lines at different levels. Cytokeratin expression is considered to reflect the epithelial origin of mammary gland tumours. Vimentin expression in invasive breast carcinomas is generally hypothesized to be due to epithelial-mesenchymal transition or myoepithelial histogenesis, and it has been reported that vimentin expression is associated with high tumour invasiveness and chemoresistance (Korsching et al., 2005). Expression patterns of these markers, lower cytokeratin and higher vimentin expression levels may be associated with malignancy of CHMp-5b cell lines.

Cellular adhesion molecules are important for maintaining tissue structure and cellular polarity and can limit cell movement and proliferation. E-cadherin associates with a group of intercellular proteins called catenins.  $\beta$ -Catenin serves as a bridge between E-cadherin and  $\beta$ -catenin, which connects with the microfilament cytoskeleton. Disruption of normal cell-cell adhesion by alternation of cadherin/catenin molecules may contribute to enhanced potential of tumour cell migration and proliferation, leading to invasion and metastasis (Conacci-Sorrell et al., 2002; Okegawa et al., 2002; Wijnhoven et al., 2000). It is reported that loss of E-cadherin causes cell migration or metastasis in various cancers, including breast cancers (Charpin et al., 1999; Yoshida et al., 2001). In humans, a relationship between the nuclear localization of dephosphorylated  $\beta$ -catenin and the tumorigenesis has also been reported in cancers (Hugh et al., 1999). In the present study, E-cadherin expression was detected only in CHMp-13a, while  $\beta$ -catenin was detected in both cell lines. The CHMp-5b cell line was suggested to have oncogenic properties because of loss of E-cadherin. However,  $\beta$ -catenin localization and phosphorylation state should be investigated to clarify its role in these cell lines.

In humans, ER and PgR are the 2 most widely used predictive factors of breast cancers. Both the ER and PgR are ligand-dependent transcriptional factors belonging to the family of nuclear hormone receptors (Olefsky, 2001). It has been reported recently that there are 2 major, distinct pathways responsible for generating low- and high-grade invasive carcinomas. While the former consistently show ER and PgR positivity, the latter are usually ER-/PgR-negative (Simpson et al., 2005). In this study, 2 cloned cell lines

showed both ER and PgR expression but at different levels. The relationship between expressions of these proteins and malignancy in transplanted nude mice is unclear.

In this study, we measured the expression of several important factors in the newly established cloned CMGT cell lines. Because the difference in the expression patterns of these proteins was consistent, results of this study may elucidate some of the characteristics of these cell lines. The 2 cloned cell lines may be useful tools for in vitro and in vivo tumour analysis.

Several steps and many factors playing intricate roles are thought to be involved during the development of distant metastases (Woodhouse et al., 1997). To understand molecular mechanisms of metastasis, experimental animal models are quite valuable for recapitulating conditions as in patients with cancers (Fidler, 1986; Fu et al., 1993). In this study, we developed an experimental animal model of pulmonary metastasis using CMGT cloned cell lines.

Interestingly, only CHMp-5b cells metastasized to the lung of transplanted mice. Therefore, the CHMp-5b cells were thought to have more malignant characteristics than CHMp-13a cells in vivo. In conclusion, we presented 2 cell lines that were generated from the same, single parental cell line but showed different metastatic potentials. These cell lines will be important research models in the field of veterinary oncology while further studies unraveling other differences between these 2 cell lines are warranted.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) and Young Scientists (B), Clinical Veterinary Science, from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

#### REFERENCES

Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H., Roszel, J.R., 1983. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19, 61-90.

Charpin, C., Bonnier, P., Garcia, S., et al., 1999. E-cadherin and beta-catenin expression in breast medullary carcinomas. *Int. J. Oncol.* 15, 285-292.

Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A., 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* 109, 987-991.

Fidler, I.J., 1986. Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 5, 29-49.

Fu, X., Le, P., Hoffman, R.M., 1993. A metastatic orthotopic-transplant nude-mouse model of human patient breast cancer. *Anticancer Res.* 13, 901-904.

Hahn, K.A., Richardson, R.C., Knapp, D.W., 1992. Canine malignant mammary neoplasia: Biologic behavior, diagnosis and treatment alternatives. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 28, 251-256.

Hellmen, E., Lindgren, A., 1989. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. *Vet. Pathol.* 26, 420-428.

Henderson, D., Weber, K., 1981. Immuno-electron microscopical identification of the two types of intermediate filaments in established epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 132, 297-311.

Hugh, T.J., Dillon, S.A., O'Dowd, G., et al., 1999. Beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* 82, 504-511.

Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., et al., 2005. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol.* 206, 451-457.

Kurzman, I.D., Gilbertson, S.R., 1986. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin. Vet. Med. & Surg. (Small Animal)* 1, 25-32.

MacEwen, E.G., Withrow, S.J., 1996. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., MacEwen, E.G. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*, second ed. Saunders Co, Philadelphia: WB, pp.356-372.

MacEwen, E.G., 1990. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 125-136.

Martin, P.M., Cotard, M., Mialot, J.P., et al., 1984. Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 12, 13-17.

Moe, L., 2001. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57, 439-443.

Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.C., et al., 2002. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J. Urol.* 167, 1836-1843.

Olefsky, J.M., 2001. Nuclear receptor minireview series. *J. Biol. Chem.* 276, 36863-36864.

Shofer, F.S., Sonnenschein, E.G., Goldschmidt, M.H., et al., 1989. Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary



carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 13, 49-60.  
Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., et al., 2005. Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* 205, 248-254.  
Uyama, R., Hong, S.H., Nakagawa, T., et al., 2006. Establishment of four pairs of canine mammary tumor cell lines derived from primary and metastatic origin and their E-cadherin expression. *Vet. Comp. Oncol.* 4, 104-113.  
Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M., 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005.  
Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F., Liotta, L.A., 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80, 1529-1537.  
Yoshida, R., Kimura, N., Harada, Y., et al., 2001. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int. J. Oncol.* 18, 513-520.

(3)悪性段階の異なる犬乳腺腫瘍細胞株における上皮間葉マーカーの発現と悪性度との関連の評価

研究(2)において分離・樹立された犬乳癌クローン細胞株 CHMp5b 株と CHMp13a 株における上皮マーカー及び間葉マーカーの発現を、ウェスタンブロット及び免疫蛍光染色を用いて評価した。また、これらの細胞株は研究(2)の結果が示すように同一の細胞株から単離されたものであるが、マウス移植時には全く異なる挙動を示し CHMp5b 株では非常に高い確率で肺への転移がみられる一方で CHMp13a 株遠隔臓器への転移はみられない。そこでこれらの細胞株の悪性度の違いをより定量的に評価するために、トランスウェルを用いたケモタキシスアッセイにて運動能及び浸潤能の測定も行った。

## 材料と方法

### 細胞株

犬乳癌クローン細胞株 CHMp5b 株と CHMp13a 株を、ゲンタマイシン及び 10%FBS を添加した RPMI-1640 培地にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。細胞の調整時には附着細胞がセミコンフルエントまで増殖した段階で EDTA 加トリプシンにてシャーレより剥離し、FBS により反応を停止させ PBS にて洗浄後、サンプルの調整を行った。

### Western Blot 法

細胞を radioimmune precipitation assay buffer solution (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 4mM Pefabloc, 5µg/ml aprotinin, 5µg/ml leupeptin, 10mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)に溶解し、氷上で 30 分静

置後 15000rpm, 4°C で 30 分間遠心、その上清を BCA 法によって蛋白濃度を測定し、2× sample buffer (100mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 12% β-mercaptoethanol, 1% glycerol, 0.1% Bromophenol blue)で 2 倍希釈したものをサンプルとして使用した。SDS-PAGE におけるサンプル量は 1 レーンにつき 10µg とした。泳動後、PVDF メンブレンに転写し、5% skim milk を含んだ TBS-T buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)にメンブレンを 1 時間室温で浸漬することによってブロッキングを行った。シグナルの検出は ECL plus system を用いて行った。

### 免疫蛍光染色

各細胞株を 4 well のスライドチャンバーに播き、2 日間 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養後、氷冷した Methanol によって 5 分間固定した。ブロッキングは 5% normal goat serum を含む TBS-T buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20)を用い 37°C、30 分間行った。二次抗体は FITC で標識されたものを使用し、DAPI を含んだ封入剤で封入後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### Trans-well 法

運動能の評価には BD Falcon セルカルチャーインサートを、浸潤能の評価には BD BioCoat マトリゲルインバージョンチャンバーを用い、メーカーの推奨するプロトコールに従って行った。要約すると、下室に 10%FBS を添加した RPMI-1640 培地を加え、上室に 0.1%BSA を添加した RPMI-1640 培地による細胞懸濁液を 1well 当たり 2.5×10<sup>4</sup> 個播種した。22 時間 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で静置し、インサートの下面に移動した細胞数を評価した。各サンプルは triplicate で行い、11well 当たり 200 倍視野で 3 か所写真撮影を行い、細胞数をカウントした。統計は Mann-Whitney U-test を用い p<0.05 で有意とした。

### Real-time chemotaxis assay

#### (xCELLigence system)

1 日間 TGF-β 刺激を行った細胞を用いて運動能及び浸潤能の測定を行った。運動能の測定は上室に 0.1%BSA 及び 1ng/ml TGF-β 含有 RPMI-1640 培地による細胞懸濁液を、下室に 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を加え、21 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で静置した。浸潤能はインサート底部にマトリゲルをコーティングしたものを用い、その他は同様のプロトコールで行った。コントロール群は TGF-β 刺激を行わない状態で行い、細胞懸濁液の作成は 0.1%BSA 含有 RPMI-1640 培地で行った。統計は Mann-Whitney U-test を用い p<0.05 で有意とした。

## 抗体

本実験に用いた抗体とその反応条件および反応時間は以下の通り。

E-cadherin, mouse Ig, 1:1000, 2hrs at RT  
(BD Transduction Laboratories)

$\beta$ -catenin, mouse Ig, 1:2000, 2hrs at RT  
(BD Transduction Laboratories)

Vimentin, mouse Ig, 1:1000, 2hrs at RT  
(CHEMICON)

N-cadherin, mouse Ig, 1:1000, ON at 4°C  
(United States Biological)

Pan-Actin, mouse Ig, 1:10000, 2hrs at RT  
(Cell Signaling)

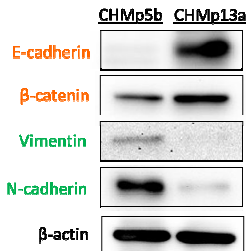
Mouse IgG, Sheep, 1:20000, 1hr at RT  
(GE Healthcare)

## 結果と考察

本実験において考慮する蛋白は上皮マーカーとして E-cadherin、 $\beta$ -catenin を、間葉マーカーとして Vimentin、N-cadherin とした。その結果、E-cadherin の発現は CHMp13a の方が高く、Vimentin 及び N-cadherin の発現は CHMp5b の方が高い結果となった。(図 1)

### 図 1

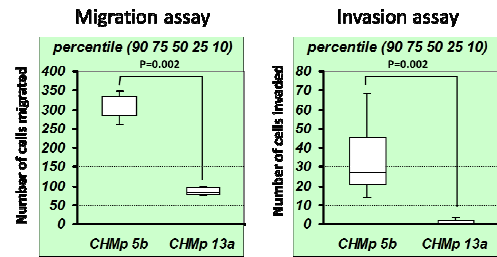
犬乳腺腫瘍由来細胞株 CHMp5b、CHMp13a における上皮マーカー (E-cadherin、 $\beta$ -catenin) 及び間葉マーカー (Vimentin、N-cadherin) の発現



今回、運動能を測定する migration assay と浸潤能を測定する invasion assay を行った。その結果、運動能、浸潤能ともに CHMp5b の方が有意に高いという結果が得られた。(図 2)

### 図 2

CHMp5b、CHMp13a において Migration assay (左) 及び Invasion assay (右) を行った結果、いずれにおいても CHMp5b の方が有意に高かった。データは中央値及びパーセンタイルによって示している



これらの実験の結果をまとめると、浸潤能の高い CHMp5b の方がより間葉の性質が強いということが示された。しかし、EMT が直接浸潤能に寄与しているかどうかはこの実験系では評価できない。そこで次に我々は EMT を誘導した細胞株において浸潤能がどのように変化するのか検討した。

## (4) TGF- $\beta$ 刺激による EMT 誘導と犬乳癌細胞株の生物学的動態変化の評価

EMT は TGF- $\beta$  による刺激によって誘導されることが明らかになってきている。TGF- $\beta$  は細胞膜上のセリンスレオニンキナーゼ型受容体である I 型及び II 型受容体によるヘテロ四量体形成を誘導し、II 型レセプターのキナーゼにより I 型受容体がリン酸化を受ける。活性化した I 型受容体は Smad2/3 をリン酸化することによって細胞内へシグナルを伝える。リン酸化された Smad2/3 は Smad4 と複合体を形成することによって核内へ移動し、様々な標的遺伝子の転写を制御する。EMT はこの Smad 経路によって制御されているが、一方で上記の Smad 経路に関与しない non-Smad 経路もまた EMT 誘導に関与していることが近年明らかになっている。

研究(3)より犬の乳腺腫瘍細胞株において EMT 様の変化を起こしている細胞株で高い浸潤能が示されたが、この変化をより明らかにするために TGF- $\beta$  刺激による EMT 誘導を行い、犬乳腺腫瘍細胞株における変化を評価した。また同時に TGF- $\beta$  による EMT 誘導が Smad 経路に依存しているかどうかを評価した。

## 材料と方法

### 細胞株

犬乳癌クローン細胞株 CHMp5b 株と CHMp13a 株を、ゲンタマイシン及び 10%FBS を添加した RPMI-1640 培地にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。細胞の調整時には附着細胞がセミコンフルエントまで増殖した段階で EDTA 加トリプシンにてシャーレより剥離し、FBS により反応を停止させ PBS にて洗浄後、サンプルの調整を行った。

## TGF- $\beta$ 刺激による EMT 誘導

Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 (PeproTech Inc.) を培地に対し 1ng/ml の濃度となるように添加した。

#### Western Blot 法

細胞を radioimmune precipitation assay buffer solution (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 4mM Pefabloc, 5 $\mu$ g/ml aprotinin, 5 $\mu$ g/ml leupeptin, 10mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) に溶解し、氷上で 30 分静置後 15000rpm, 4°C で 30 分間遠心、その上清を BCA 法によって蛋白濃度を測定し、2 $\times$  sample buffer (100mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 12%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% glycerol, 0.1% Bromophenol blue) で 2 倍希釈したものをサンプルとして使用した。SDS-PAGE におけるサンプル量は 1 レーンにつき 10 $\mu$ g とした。泳動後、PVDF メンブレンに転写し、5% skim milk を含んだ TBS-T buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) にメンブレンを 1 時間室温で浸漬することによってブロッキングを行った。シグナルの検出は ECL plus system を用いて行った。

#### 免疫蛍光染色

各細胞株を 4 well のスライドチャンバーに播き、2 日間 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養後、氷冷した Methanol によって 5 分間固定した。ブロッキングは 5% normal goat serum を含む TBS-T buffer (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) を用い 37°C, 30 分間行った。二次抗体は FITC で標識されたものを使用し、DAPI を含んだ封入剤で封入後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### Trans-well 法

運動能の評価には BD Falcon セルカルチャーインサートを、浸潤能の評価には BD BioCoat マトリゲルインバージョンチャンバーを用い、メーカーの推奨するプロトコールに従って行った。要約すると、下室に 10%FBS を添加した RPMI-1640 培地を加え、上室に 0.1%BSA を添加した RPMI-1640 培地による細胞懸濁液を 1well 当たり 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 個播種した。22 時間 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で静置し、インサートの下面に移動した細胞数を評価した。各サンプルは triplicate で行い、11well 当たり 200 倍視野で 3 か所写真撮影を行い、細胞数をカウントした。統計は Mann-Whitney U-test を用い p<0.05 で有意とした。

#### Real-time chemotaxis assay

##### (xCELLigence system)

1 日間 TGF- $\beta$  刺激を行った細胞を用いて運動能及び浸潤能の測定を行った。運動能の測定は上室に 0.1%BSA 及び 1ng/ml TGF- $\beta$  含有 RPMI-1640 培地による細胞懸濁液を、下室に

10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を加え、21 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で静置した。浸潤能はインサート底部にマトリゲルをコーティングしたものを用い、その他は同様のプロトコールで行った。コントロール群は TGF- $\beta$  刺激を行わない状態で行い、細胞懸濁液の作成は 0.1%BSA 含有 RPMI-1640 培地で行った。統計は Mann-Whitney U-test を用い p<0.05 で有意とした。

#### 抗体

本実験に用いた抗体とその反応条件および反応時間は以下の通り。

E-cadherin, mouse Ig, 1:1000, 2hrs at RT  
(BD Transduction Laboratories)

$\beta$ -catenin, mouse Ig, 1:2000, 2hrs at RT  
(BD Transduction Laboratories)

Vimentin, mouse Ig, 1:1000, 2hrs at RT  
(CHEMICON)

N-cadherin, mouse Ig, 1:1000, ON at 4°C  
(United States Biological)

Smad2/3, mouse Ig, 1:1000, ON at 4°C  
(BD Transduction Laboratories)

pSmad2, rabbit Ig, 1:1000, ON at 4°C  
(CHEMICON)

Pan-Actin, mouse Ig, 1:10000, 2hrs at RT  
(Cell Signaling)

Mouse IgG, Sheep, 1:20000, 1hr at RT  
(GE Healthcare)

Mouse IgG1-FITC, Goat, 1:400, 40min at 37°C  
(Santa Cruz)

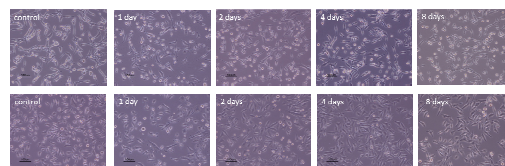
Rabbit IgG, Donkey, 1:10000, 1hr at RT  
(GE Healthcare)

#### 結果と考察

使用した細胞株は前述した CHMp5b と CHMp13a である。これらの細胞を通常の培養に用いる培地に 1ng/ml になるよう TGF- $\beta$  を添加した培地で培養した。TGF- $\beta$  刺激後 1, 2, 4, 8, 12 日後に細胞形態の観察とウェスタンブロット及び免疫蛍光染色により検討を行った。まず形態学的変化であるが、刺激後各群において両細胞株とも著明な変化は認められなかった。(図 3)

#### 図 3

対照および TGF- $\beta$  刺激から 1, 2, 4, 8 日後の細胞形態。CHMp5b 及び CHMp13a のいずれにおいても著明な変化は認められなかった



Smad2 のリン酸化を調べることによってヒト

リコンビナント TGF- $\beta$ が犬においても有効かどうかを確認したところ刺激前と比較して明らかにリン酸化が認められたため、今回の実験において使用可能であると考えられた。刺激 1 日後より両細胞株において間葉系マーカーである Vimentin の発現が強力に誘導された。(図 4) CHMp5b では E-cadherin の発現低下もみられ、その変動は Smad2 のリン酸化に依存していた。

図 4-1

TGF- $\beta$ 刺激による上皮間葉マーカーの発現及び Smad2 のリン酸化の経時的变化をウェスタンブロットにより解析した。無処理のものをコントロールとした。

CHMp5b では刺激 1 日後には Smad2 のリン酸化がみられ、それに合わせて E-cadherin と Vimentin の発現が変化している。4 日後には Smad2 のリン酸化は抑制され、E-cadherin 及び Vimentin の発現レベルはコントロールと比較して差が認められない。

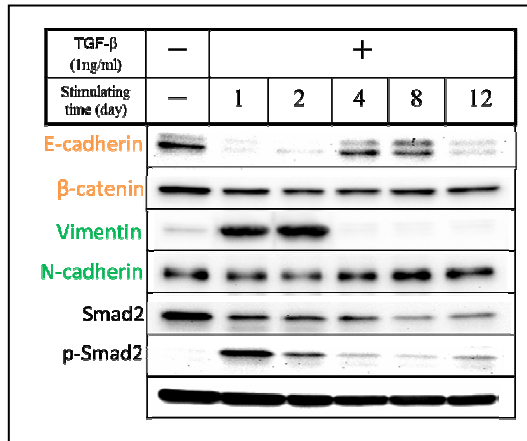
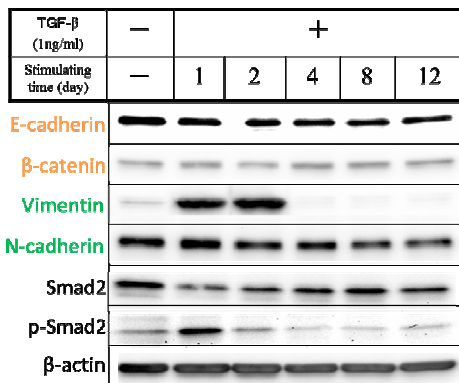


図 4-2

CHMp13a では TGF- $\beta$ 刺激から 1 日後、Smad2 のリン酸化とともに Vimentin の発現誘導が認められた。しかし CHMp5b と異なり、E-cadherin の変化は認められなかった。

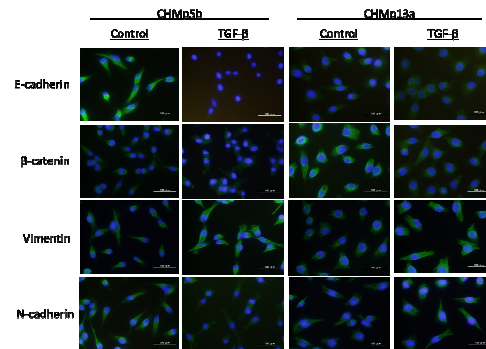


CHMp13a においては E-cadherin の変動は認められなかった。これらの変化は一過性のもので、4 日後以降はまたコントロールと差がみられなくなった。Smad 経路はその標的遺伝子の中に抑制性 Smad と呼ばれるこの経路を抑制するタンパクの一群をコードする遺伝子が含まれており、負のフィードバック機構を形成することにより制御されている。本実験において E-cadherin と Vimentin の発現変化が一過性であったのは、このような負のフィードバック機構が存在する為であると考えられる。Smad2 のリン酸化に依存して変化していることが、この仮説を裏付けている。一方で  $\beta$ -catenin と N-cadherin の変動は両細胞株において認められず、犬においてこれらのマーカーが上皮及び間葉マーカーとして本当に有用なのかどうか、あるいはこの結果を部分的な EMT として捉えるべきかどうかは今後検討しなくてはならない。

刺激 1 日後の細胞において免疫蛍光染色を行ったが、概ねウェスタンブロットと同様に傾向がみられ、両細胞株における Vimentin の発現誘導及び CHMp5b における E-cadherin の著明な低下がみられた。(図 5)

図 5

TGF- $\beta$ 刺激 1 日後の上皮間葉マーカーの発現を免疫蛍光染色によって解析した



悪性度の評価は前述したトランスウェルを用いたケモタキシスアッセイによって運動能及び浸潤能の測定を行う予定であったが、ウェスタンブロットの結果より TGF- $\beta$ による EMT 誘導は一過性のものであったことから、アッセイのエンドポイントを正確に設定する必要性が生じた。そこでリアルタイムにデータをモニタリングできる xCELLigence システムを用いてケモタキシスアッセイを行った。運動能は両細胞株において有意な差は認められなかったが、浸潤能は CHMp13a において有意に亢進した。(図 6) しかしこの変化は一過性のもので、長時間観察するとコントロールとの差は消失した。この CHMp13a の浸

潤能の獲得は上皮及び間葉マーカーの変動と関連しているかどうか検討の余地はあるが、少なくとも TGF- $\beta$ が誘導する EMT と同様に安定的でない変化であることが分かった。

図 6-1

CHMp5b 及び CHMp13a における TGF- $\beta$ 刺激後の運動能あるいは浸潤能の経時的変化をリアルタイムケモタキシスアッセイによって解析した。TGF- $\beta$ 刺激 1 日後の細胞を用い、アッセイ中もチャンバーに同じ濃度で添加することによって刺激をし続けた。CHMp5b では運動能、浸潤能ともに有意な差は認められなかった

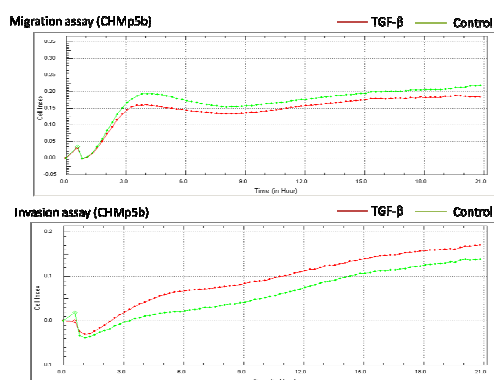
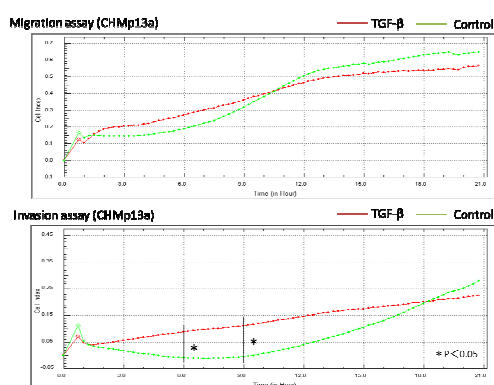


図 6-2

CHMp13a では TGF- $\beta$ 刺激群における浸潤能が有意に亢進した。しかしこれは一過性のもので、時間の経過とともに差はなくなっていた



上皮系悪性腫瘍が転移する際、原発巣から間質に浸潤するステップでは EMT が非常に重要であると考えられているが、遠隔臓器に到達後二次性の腫瘍巣を形成するためには EMT とは逆に上皮の性質を再度獲得しなければならないと考えられている。この現象は間葉上皮転換 (MET) と称されるが、今回の実験において一度間葉マーカーである Vimentin の発現誘導と E-cadherin の発現低下

を生じた腫瘍細胞が、再び元の発現状態に戻るといった MET に類似した現象がみられた。この TGF- $\beta$ による安定的でない EMT の誘導は、腫瘍細胞が生体内で転移する際に利点となり得るかもしれない。

今回、一連の研究において犬乳腺腫瘍の中でも病理組織学的に悪性である症例で上皮系マーカーの減弱と間葉系マーカーの発現といった EMT 様の変化がみられ、また自然発症例の犬乳癌細胞株から分離された悪性度の異なる細胞株でも同様に悪性度の高い細胞株において EMT 様の変化が見られた。サンプル数は少ないものの犬乳腺腫瘍の悪性化に EMT の発生が関与していることを示唆するものと考えられた。またこの分離された細胞株に対して TGF- $\beta$ 刺激による EMT 誘導を行ったところ、EMT 様の変化は一過性で動的なものであり、それには Sma2 が関与していることが明らかとなった。また誘導された EMT が元に戻る現象は MET と類似しておりこうした変化が癌細胞が生体内で浸潤移動する上でどのような意義を持つものかも将来検討課題になるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 貴之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
助教

研究者番号：40447363

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし