

# TSLC1 による食道癌増殖抑制とそのメカニズム解析の研究

嶋田 裕、伊藤 鉄夫、橋本 洋右、加賀野井 純一、  
姜 貴嗣、渡辺 剛、村上 善則\*、今村 正之

京都大学大学院医学研究科 腫瘍外科 \*国立がんセンター研究所 がん抑制ゲノムプロジェクト

## はじめに

食道癌は世界における6番目の癌死因であり、アジアにおいては扁平上皮癌がその90%以上を占めている。手術手技や周術管理が進歩した現在でもその患者予後は依然として不良である。食道扁平上皮癌の進展に関連する遺伝子変化はいくつか報告されているものの、生物学的、病理学的にその関連性が示されたものは少数に過ぎない。それゆえ食道扁平上皮癌の進展に関わる新しい遺伝子を同定することが求められている。

染色体11q23の高頻度のアレル欠失が食道扁平上皮癌において報告されているが、この座位に存在する癌抑制遺伝子は食道扁平上皮癌ではこれまで報告されていない。Comparative genomic hybridization法による解析では食道扁平上皮癌細胞株で34% (10/29株)、食道扁平上皮癌組織でも37% (17/46組織) で11q23の欠失が報告されている。*Tumor Suppressor in Lung Cancer-1* (以下 *TSLC1*) は非小細胞性肺癌細胞 A549を用いた染色体11q23.2での機能的クローニングにより同定された新規癌抑制遺伝子である。*TSLC1* 遺伝子は442アミノ酸からなる一回膜貫通型糖タンパクをコードしており、そのタンパクはNCAMの細胞外ドメインと構造上のホモロジーを有していることから、細胞-細胞接着への関与が想定されている。*TSLC1* 発現が減弱もしくは欠失していることが非小細胞性肺癌、肝癌、膵癌を含む数種の細胞株で示されており、プロモーター領域の過メチル化がその主な原因であると考えられており、*TSLC1* 遺伝子の突然変異は稀であると報告されている。

*TSLC1*はこれまで数種の癌の進展に関わっていることが示されているが、食道扁平上皮癌におけるその役割は未だに検討されておらず、*TSLC1*による増殖抑制を含む腫瘍抑制メカニズムは不明である。また、*TSLC1*発現の臨床的な意義についての報告はない。そこで、我々は食道扁平上皮癌進展への*TSLC1*への関与を調べ、その臨床的意義、腫瘍抑制メカニズムを検討することをこの研究の目的とした。

## 1. 食道扁平上皮癌細胞株および組織における *TSLC1* 発現欠失

食道扁平上皮癌における *TSLC1* 発現欠失の有無を調べるために、当科で樹立した36株の食道扁平上皮癌細胞株、2株の正常食道上皮細胞株、および当科で手術を施行した56症例の腫瘍組織、正常食道組織を用いてRT-PCRを行なったところ、細胞株においては75% (27/36)、腫瘍組織においては50% (28/56) で *TSLC1* 発現が欠失していた (図1A, B)。これに対して、すべての正常食道上皮細胞株、正常組織では *TSLC1* 発現を認めた。この結果より *TSLC1* 遺伝子は食道扁平上皮癌発生の過程で高頻度に不活化されている可能性が示唆された。

## 2. 食道扁平上皮癌における *TSLC1* 発現欠失の臨床的意義

*TSLC1* 発現欠失の臨床的意義を評価するために、*TSLC1* 発現を調べた56腫瘍を発現陽性28腫瘍、発現陰性28腫瘍の2つのグループに分け、臨床病理学的因子との関連を調べた (表1)。pT (p

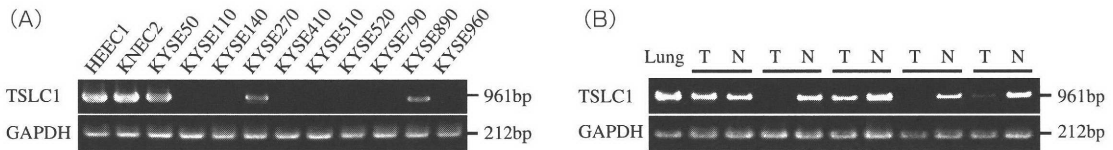


図1 食道扁平上皮癌における TSLC1 mRNA 発現欠失 (RT-PCR)  
 (A) 代表的な細胞株 10 株、(B) 5 症例よりの腫瘍組織 (T) および正常食道上皮 (N)。KYSE は食道扁平上皮癌細胞株、HEEC1 と KNEC2 は正常食道上皮細胞株。

表1 TSLC1 発現と臨床病理学的因子の関連

項目		TSLC1 発現		p 値
		陽性 (n = 28)	陰性 (n = 28)	
年齢	平均 ± SD	65.2 ± 9.87	65.6 ± 9.71	0.87 <sup>a</sup>
性別	Male	22	25	0.27 <sup>a</sup>
	Female	6	3	
pT	pT1	11	3	0.012 <sup>b</sup>
	pT2	2	11	
	pT3	9	9	
	pT4	6	5	
pN	pN0	13	8	0.17 <sup>a</sup>
	pN1	15	20	
pM	pM0	26	20	0.036 <sup>a</sup>
	pM1	2	8	
pTNM	I	10	1	0.002 <sup>b</sup>
	IIa	1	7	
	IIb	2	5	
	III	13	7	
	IVa	1	2	
	IVb	1	6	
局在	上部	5	3	0.70 <sup>b</sup>
	中部	15	15	
	下部	8	10	
組織型	高分化	3	8	0.24 <sup>b</sup>
	中分化	15	12	
	低分化	10	8	
リンパ管浸潤	あり	10	5	0.15 <sup>a</sup>
	なし	17	21	
血管浸潤	あり	14	10	0.33 <sup>a</sup>
	なし	13	14	

a ; Fisher's exact テスト、b ; Chi-square テスト

=0.012)、pM (p = 0.036)、pTNM (p = 0.002) において発現陽性腫瘍と発現陰性腫瘍との間に統計学的有意差が認められたが、年齢、性別、pN、腫瘍局在、組織型、リンパ管浸潤、血管浸潤においては有意差を認めなかった。Kaplan-Meier 法による生存分析では (図2) 発現陰性腫瘍を持つ患者は発現陽性腫瘍を持つ患者に比し予後不良の傾向を認めた (p = 0.079)。次に TSLC1 発現欠失が独立し

た予後因子であるかどうかを調べるために Cox 多変量解析を行なったところ (表2)、TSLC1 発現欠失 (RR 2.47; CI 1.00-6.05, p = 0.049) は pT (RR 3.77; CI 0.92-12.3)、pN (RR 3.83; CI 1.11-13.2) と共に独立した予後因子であった。これらの結果より TSLC1 発現欠失は食道扁平上皮癌患者の予後に関連した有益な予後マーカーとなり得ることが示唆された。

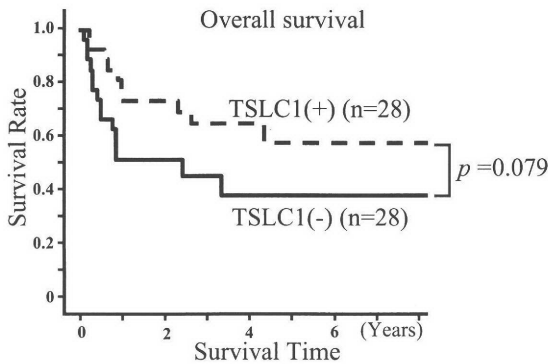


図2 Kaplan-Meier法による食道扁平上皮癌患者 (TSLC1発現陽性28例、発現陰性28例)の生存曲線。

表2 Cox多変量解析

項目	Estimates	RR	95% CI	p値
性別 (男性)	1.83	3.36	0.92-12.3	0.067
pT (3, 4)	2.62	3.77	1.40-10.2	0.009
pN (1)	2.12	3.83	1.11-13.2	0.034
pM (1)	- 0.23	0.88	0.31-2.55	0.819
組織型 (低分化)	0.19	1.10	0.41-2.98	0.848
TSLC1 (-)	1.97	2.47	1.00-6.05	0.049

RR; risk ratio, CI; confidence interval

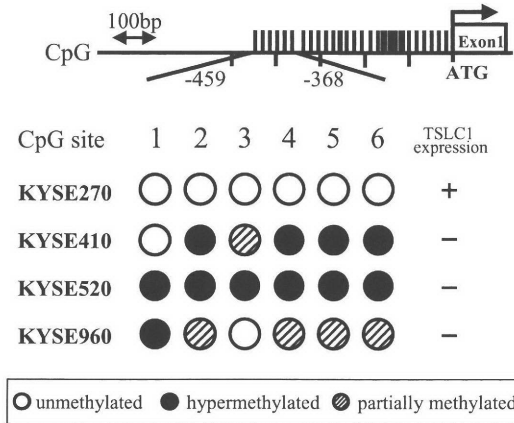


図3 食道扁平上皮癌細胞株における TSLC1 のメチル化分析  
転写開始部位より-459bpより-368bpの間の6ヶ所のCpGに含まれるシトシン残基のメチル化の状態 (bisulfite sequencing法)。丸印はそれぞれの細胞株 DNAのこの領域に含まれる6ヶ所のCpGを示している。

### 3. プロモーターのメチル化による TSLC1 遺伝子不活化

TSLC1プロモーターのメチル化の状態を調べるために、4種類の食道扁平上皮癌細胞株 (TSLC1発現欠失株; KYSE270、TSLC1発現陽性株; KYSE410、KYSE520、KYSE960) を用いて転写開始部位上流のプロモーター配列上に存在する6ヶ所のCpGのシトシン残基のメチル化の状態を bisulfite sequencing法により直接同定した (図3)。TSLC1を発現しているKYSE270のゲノムDNA上のシトシン残基6ヶ所はすべてメチル化の修飾を受けていなかったのに対し、TSLC1発現を欠失している他の3

株では5ヶ所以上でシトシン残基のメチル化を認め、特にKYSE520では6ヶ所すべてのシトシン残基が過メチル化を受けていた。次に脱メチル化剤によってTSLC1発現が回復するかどうかを検討するために、上記の細胞株に対し5-aza-2'-deoxycytidineを接触させTSLC1発現をRT-PCRにて調べたところ、KYSE410、KYSE520、KYSE960ではTSLC1発現が回復したが、KYSE270ではその発現は不変であった (data not shown)。これらの結果より食道扁平上皮癌においてはプロモーター領域のメチル化が TSLC1遺伝子の不活化に関与していると考えられた。

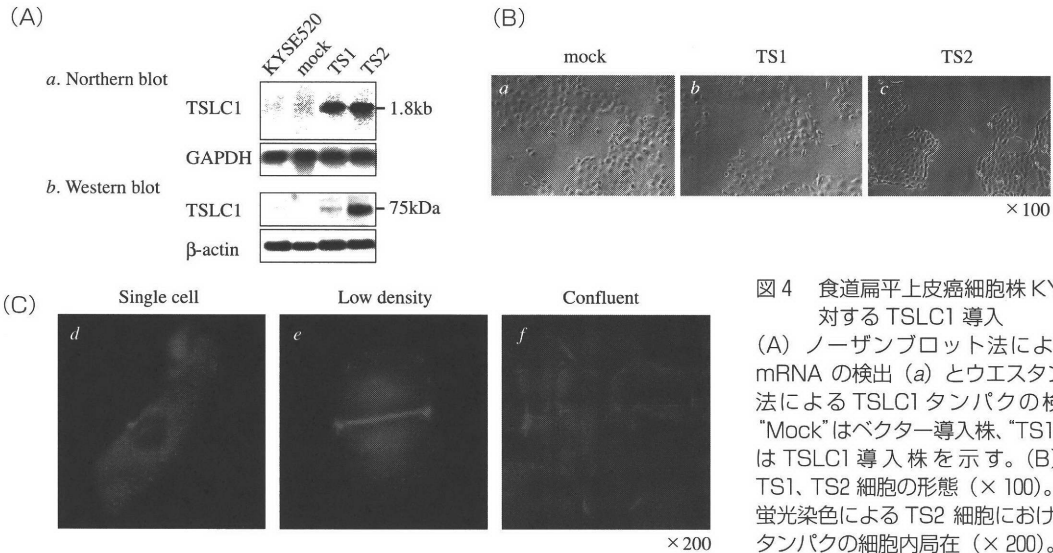


図4 食道扁平上皮癌細胞株 KYSE520 に対する TSLC1 導入  
 (A) ノーザンプロット法による TSLC1 mRNA の検出 (a) とウエスタンプロット法による TSLC1 タンパクの検出 (b)。“Mock”はベクター導入株、“TS1”と“TS2”は TSLC1 導入株を示す。(B) mock、TS1、TS2 細胞の形態 (×100)。(C) 免疫蛍光染色による TS2 細胞における TSLC1 タンパクの細胞内局在 (×200)。

#### 4. *In vitro* および *in vivo* における TSLC1 導入による増殖抑制

これまでの検討で *TSLC1* 遺伝子の不活化により食道扁平上皮癌細胞はある一定の悪性形質を獲得する可能性が示唆された。そこで、プロモーター領域の過メチル化により TSLC1 発現を欠失している KYSE520 に発現ベクターを用いて TSLC1 を遺伝子導入し、TSLC1 を発現する 2 つの独立した安定細胞株 TS1、TS2 を得た。同時に KYSE520 にベクターのみを導入した mock 株を得た (図 4 A)。TS1 と TS2 はノーザンプロット法ではほぼ同じレベルの TSLC1 mRNA を発現しているのに対し (図 4 A, a)、ウエスタンプロット法では TS2 は TS1 よりも強い TSLC1 タンパク発現を示した (b)。形態学的には KYSE520、mock 細胞、TS1 は細胞が比較的解離した状態で増殖するが (図 4 B, a, b)、TS2 は細胞同士がお互いに強固に集まった形で増殖する像が観察された (c)。次に TSLC1 タンパクの局在を調べるためにこれらの細胞を用いて免疫蛍光染色を行なったところ (図 4 C)、単一細胞状態では TSLC1 タンパクは主として細胞質に存在していたが (d)、細胞接着の初期より TSLC1 タンパクは細胞接着面で鋸歯状に分

布し (e)、コンフルエント状態では細胞-細胞境界部に不規則に分布していた (f)。

TSLC1 発現が KYSE520 の増殖に与える影響を調べるために、細胞増殖実験を行なったところ、TS1 および TS2 の増殖は KYSE520、mock 細胞と比して有意に抑制され ( $p < 0.01$ )、TS2 の増殖は TS1 と比して有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ ) (data not shown)。さらに、TSLC1 による *in vivo* での腫瘍抑制活性を検討するために、ヌードマウス皮下に細胞接種し腫瘍体積を調べた (図 5 A, B)。その結果、KYSE520 の腫瘍増殖は外来性 TSLC1 発現により大幅に抑制され、接種 28 日目の腫瘍体積は mock 細胞に比して TS1 で 64%、TS2 で 98% 抑制され ( $p < 0.01$ )、TS2 の腫瘍は TS1 に比しても有意に抑制されていた ( $p < 0.01$ )。

TSLC1 発現による増殖抑制メカニズムをさらに調べるため、上述の細胞における細胞周期変化をフローサイトメトリーにて検討した (図 5 C)。G1 期の細胞の割合は TS1 で  $56 \pm 1.5\%$ 、TS2 で  $68.8 \pm 1.6\%$  であり、mock 細胞の  $48 \pm 0.8\%$  と比して有意に高値であった。

これらの結果は食道扁平上皮癌において TSLC1 が著明な腫瘍増殖抑制活性を持つことを示

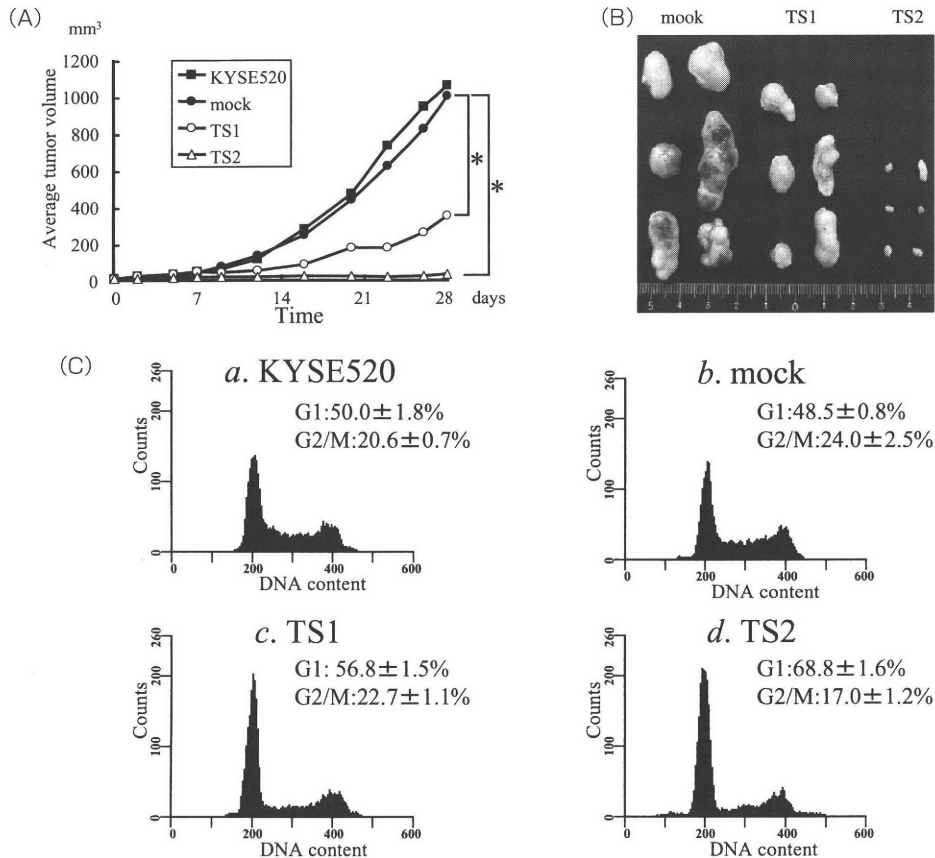


図5 TSLC1による *in vitro* 及び *in vivo* における増殖抑制

アスタリスクは mock に対する有意差 ( $p < 0.01$  Tukey-Kramer テスト) を示す。

(A) KYSE520, mock, TSLC1 導入 (TS1 と TS2) 細胞のヌードマウス皮下における腫瘍形成。0 日目に  $10^6$  個の細胞を皮下接種し 6 つの腫瘍の平均体積を測定した。(B) 28 日目における mock 細胞, TS1 細胞, TS2 細胞の皮下腫瘍。(C) フローサイトメトリーによる細胞周期変化。G1 と G2/M 期の細胞の割合を平均 ± SD として示す。

唆し、その機序として G1 での細胞周期停止が関与している可能性が考えられた。

### 5. TSLC1 導入による *in vitro* での細胞移動抑制及び細胞浸潤抑制

腫瘍での臨床病理学的検討で示したように、TSLC1 発現欠失は食道扁平上皮癌の浸潤あるいは転移に関与していることが想定された。そこで、TSLC1 導入による細胞移動、浸潤能を検討するために、トランスウェルチャンバーアッセイおよびマトリゲルチャンバーアッセイを行なった (図

6 A, B)。前者のアッセイでは細胞移動能は mock 細胞に比べ TS1 で 70%、TS2 で 80% と有意に抑制され ( $p < 0.01$ )、後者のアッセイでは細胞浸潤能は mock 細胞に比べ TS1 で 65%、TS2 で 94% と有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。TS1 に対する TS2 の浸潤能は有意に抑制されていたが ( $p < 0.01$ )、移動能の抑制は有意ではなかった。これらの結果より TSLC1 は食道扁平上皮癌の浸潤・転移に関与していることが示唆された。

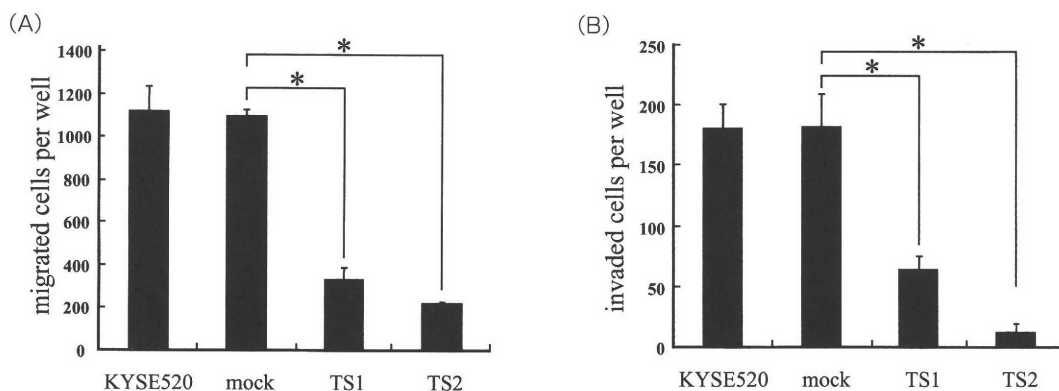


図6 TSLC1による *in vitro* の移動能、浸潤能の抑制

アステリスクは mock に対する有意差 ( $p < 0.01$  Tukey-Kramer テスト) を示す。(A) KYSE520、mock、TSLC1 導入 (TS1 and TS2) 細胞のトランスウェルチャンバーを用いた移動能アッセイ。(B) マトリゲルチャンバーを用いた浸潤能アッセイ。

## まとめ

この研究で我々は食道扁平上皮癌における TSLC1 の生物学的、臨床的意義を検討した。腫瘍での TSLC1 発現の有無は腫瘍深達度、転移の状態と関連しており、TSLC1 発現欠失は有用な予後マーカーであることが示唆された。さらに、食道扁平上皮癌細胞への TSLC1 導入はその細胞増殖能、移動能、浸潤能を抑制した。TSLC1 は細胞接着に関わる膜タンパクであることから、E-cadherin が食道扁平上皮癌を含む様々な腫瘍の進展に関連しているのと同様に、TSLC1 発現欠失による細胞-細胞相互作用の破壊が食道扁平上皮癌細胞の浸潤や転移を促進するのかも知れない。TSLC1 による腫瘍抑制機序については今後更なる

検討が必要だが、我々は今回 G1 期における細胞周期停止が増殖抑制の一因であることを示唆した。現在、細胞周期関連遺伝子を含めた TSLC1 の新たなターゲット分子同定を目指してマイクロアレイ等を用いた downstream 解析を行なっているところである。

また、TSLC1 発現欠失は食道扁平上皮癌においてもプロモーターのメチル化によって引き起こされることが示唆されたが、TSLC1 発現が食道扁平上皮細胞の増殖を劇的に抑制したことから、脱メチル化剤を用いた TSLC1 発現回復が食道扁平上皮癌の新たな治療戦略の一つとなることが期待される。