

氏名	まの りょうすけ 真野 亮介		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1970 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Induction of potassium channel regulator KCNE4 in a submandibular lymph nodes metastasis model (顎下リンパ節転移モデルにおけるカリウムチャンネル制御因子 KCNE4 の発現誘導)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	坂田 俊文
	(副 査) 福岡大学	教授	岩本 隆宏
	福岡歯科大学	教授	池邊 哲郎

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

メラノーマなどのがん細胞は、しばしば所属リンパ節(LN)に転移した後、血行性に遠隔転移をきたす。がん患者における LN 転移の有無は予後と相関しており、治療戦略を決定する上での重要な要因となる。そのため、LN 転移のメカニズムを理解するために、多くの動物モデルや臨床研究が行われてきた。がん細胞は、原発巣および転移部位で免疫細胞や間質細胞とコミュニケーションをとり、腫瘍が二次臓器に到達する前から転移を支持する環境へ作り変えていることが報告されている。また、メラノーマが LN に転移するメカニズムとして、センチネル LN にリンパ管新生の亢進や免疫抑制環境の誘導などの変化が起こることが報告されている。これまでの臨床研究や動物モデル研究によると、原発巣から遠隔部位へのがん細胞の播種は、原発巣の診断よりも早期に起こることが多いとされている。転移播種前の LN における変化を理解することは、LN 転移を予防する治療法を開発するために非常に重要である。本研究では、メラノーマ細胞がマウス舌から顎下リンパ節(SLN)に転移するモデルを作製し、SLN における遺伝子発現の初期変化について解析した。

### 【対象と方法】

C57BL/6 マウスの舌(右側)に B6 由来メラノーマ細胞株 B16-F10 を移植し、移植細胞数及び移植後原発巣の変化、SLN への転移率を解析した。次に、B16-F10 移植後 3 日目の SLN より total RNA を抽出し、qPCR にてメラノーママーカーの発現量を解析した後に、マイクロアレ

イ解析を行い、対照群(PBS 投与群)の SLN と比較検討した。発現増加した遺伝子のうち、Potassium voltage-gated channel, lsk-related subfamily, gene 4 (*Kcne4*)、Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, + system), member 11 (*Slc7a11*)、Fascin actin-bundling protein 1(*Fscn1*)、Growth arrest and DNA-damage-inducible 45  $\beta$  (*Gadd45b*)に着目し、qRT-PCRによる検証を行った。次に、上記因子と CD45 (汎白血球マーカー) または Podoplanin (リンパ管内皮マーカー) の発現について免疫組織染色を行い、タンパクレベルでの発現誘導やリンパ節内の局在について解析した。培養リンパ管内皮細胞 (LEC)における電位依存性カリウムチャンネル subfamily Q (KCNQ) member 1-5 の発現量を qRT-PCRにて解析し、KCNQ1 と KCNE4 とのリンパ節における局在について免疫組織学的解析で検討した。また、LEC における KCNE4 の役割を調べるため、siRNA または発現ベクターを用いて KCNE4 を発現抑制または過剰発現させ、ケモカインや細胞接着因子の発現量に及ぼす影響を qRT-PCRにて解析した。最後に、ヒト正常リンパ節組織とメラノーマ転移リンパ節組織における KCNE4 の発現について免疫組織染色にて解析した。

#### 【結果】

B16-F10 を舌に移植したマウスの舌原発腫瘍は移植細胞数や移植後日数に応じて増大し、SLN への転移率も経日的に増加し、移植後 14 日目に 10 匹中すべてのマウスで SLN への転移を認めた。B16-F10 移植後 3 日目に採取した SLN で、メラノーママーカーが増加していない SLN を選択し、マイクロアレイ解析した結果、対照群と比べて 162 の発現上昇遺伝子を認めた。これらの中で、これまでにリンパ節転移との関連性が報告されていない 4 つの因子、カリウムチャンネル調節因子 KCNE4、アミノ酸トランスポーター SLC7A11、接着因子 FSCN1、核内タンパク GADD45  $\beta$  に着目した。また、発現増加遺伝子には、転移との関連が報告されている C-motif chemokine ligand Ccl19 (*Ccl19*) が含まれていた。*Kcne4*、*Slc7a11*、*Fscn1*、*Gadd45b* および *Ccl19* の発現量について、移植後 3 日目の SLN における発現量を qRT-PCRにて検証した結果、右側 SLN における *Kcne4*、*Slc7a11* および *Ccl19* の発現増加が確認された。LEC における *Kcne4* と *Slc7a11* はトランズウェルを用いた B16-F10 との共培養によって発現誘導されなかったため、B16-F10 由来液性因子の直接作用は少ないと考えられた。リンパ節高転移性である B6 マウス口腔扁平上皮癌細胞株 MOC2 についても、マウス舌に移植した結果、PCR レベルで SLN への転移が検出され、*Kcne4* の発現が誘導された。

SLN 組織を KCNE4 抗体を用いて免疫組織染色した結果、KCNE4 は B16-F10 移植マウスのリンパ節で増加しており、CD45 陽性細胞には発現せずに、リンパ管マーカーである Podoplanin 陽性領域での発現が観察された。リンパ管内皮細胞において KCNQ ファミリーのうち KCNQ1 がドミナントに発現していたため、SLN における KCNQ1 の発現について免疫染色にて検討した結果、KCNQ1 も Podoplanin 陽性細胞で発現しており、KCNE4 陽性細胞においても検出されたことから KCNE4 と KCNQ1 が共局在していることを確認した。KCNE4 を発現抑制した LEC では、メラノーマの転移に関与する *Ccl17* および *Ccl19* の発現が低下し、逆に KCNE4 の過剰発現は *Ccl17* と *Ccl19* の発現を増加させた。接着因子である *Fibronectin 1* (*Fnl1*) は、*Kcne4* のノッ

クダウンにより増加し、過剰発現により減少した。メタロプロテアーゼについては、*Matrix metalloproteinases -2, -3, -14 (Mmp2, Mmp3, Mmp14)*がKcne4のノックダウンにより減少し、KCNE4の過剰発現により*Mmp2*は減少したが*Mmp3*は顕著に増加した。ヒトリンパ節組織を用いた免疫染色の結果、KCNE4はメラノーマが転移したヒトリンパ節組織でも発現している事が確認された。

#### 【結論】

我々は、がん細胞が舌からSLNに短期間で高確率に転移するモデルを構築した。B16-F10移植後、転移成立前のSLNにおける遺伝子発現変化を解析したところ、転移初期の段階でKCNE4とSLC7A11がPodoplanin陽性細胞であるリンパ管内皮に発現誘導されることが明らかになった。

KCNE4は電位性カリウムチャネルの調節因子で、KCNQ1-KCNE4は心筋に発現しているが、LECにおける発現はこれまでに知られていなかった。LECにおいて、KCNE4を発現阻害すると、Cc117とMmp3が減少し、Fn1が増加した。逆に、KCNE4の過剰発現はCc117とMmp3を増加させ、Fn1を減少させたことから、KCNE4は転移に関連するサイトカイン産生とリンパ管内皮透過性を増加させることで転移を促進する可能性が示唆された。また、SLC7A11は、グルタミン酸を排出しシスチンを取り込むアミノ酸交換輸送体である。シスチンはグルタチオンの原料となり活性酸素の除去に働くことから、SLC7A11はがん細胞によって発現誘導されてLECの酸化ストレス軽減に働く可能性が示唆された。

リンパ管内皮におけるKCNE4やSLC7A11の発現誘導は、リンパ管転移の予測因子となる可能性があるが、LECにおけるKCNQ1-KCNE4の役割を解析するために、生理学的研究が必要である。また、リンパ節転移におけるKCNE4の役割を明らかにするためには、今後、LEC特異的にKcne4を欠失させたマウスにがん細胞を移植する必要がある。

#### 審査の結果の要旨

本論文は、メラノーマの顎下リンパ節転移モデルを確立し、転移成立前の顎下リンパ節における遺伝子発現の変動を解析し、リンパ節転移に関わる因子を同定することを目的とした。C57BL/6マウスの舌に同種同系由来のメラノーマ細胞(B16-F10)を移植し顎下リンパ節転移モデルを確立し、転移成立前の顎下リンパ節を解析することで、電位依存性カリウムチャネルの調節性因子であるPotassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4 (*Kcne4*)がリンパ管内皮に発現誘導されることを見出した。また、リンパ管内皮初代培養細胞のKCNE4を発現抑制もしくは過剰発現することで、メラノーマの転移との関連性が報告されているケモカイン C-Cmotif chemokine ligand17 (*Ccl17*)やメタロプロテアーゼ

Matrix metalloproteinases-3 (Mmp3)、接着因子 Fibronectin 1 (*Fnl*) が変動することを確認し、KCNE4 がリンパ節転移に促進的に関与している可能性が示唆された。

#### 1. 斬新さ

これまでメラノーマの舌-顎下リンパ節転移モデルの報告はなく、本研究で新規モデルを確立した。また、KCNE4 とメラノーマのリンパ節転移の関連性の報告も本研究が初めてである。

#### 2. 重要性

メラノーマのリンパ節転移は予後と関連しており、リンパ節転移の制御は治療戦略の上で重要な要因となる。リンパ節では様々な因子が関与することで転移に適した環境、すなわち転移前ニッチが形成され、リンパ節転移が促進されることが知られている。転移成立前のリンパ節における分子生物学的変化を理解することで、将来的に予後予測因子や治療戦略につながる可能性がある。

#### 3. 実験方法の正確性

すべての動物実験は、関連する法律および機関指針を遵守し、福岡大学の動物実験委員会の承認（承認番号：1810067）および ARRIVE ガイドラインに準拠して実施された。また、全ての実験は複数回施行され再現性があることを確認した。加えて本論文は査読を経て *Scientific Reports* に受理されており研究方法の正確性は評価されていると考える。

#### 4. 表現の明確さ

研究課題、目的、方法、結果、考察は十分に検討され極めて正確かつ明瞭に表現されている。また、申請者のプレゼンテーションも明確なものであった。

#### 5. 主な質疑応答

**Q.** なぜ舌でメラノーマが増殖した際に、まだ転移していないリンパ節に KCNE4 が増加したのか。トランズウェルの実験では液性因子ではなさそうだが、どういうメカニズムで発現が増加したと考えられるか。

**A.** ご指摘の通りトランズウェル培養の実験では KCNE4 の変化は見られなかったため、メラノーマ細胞自体からの分泌因子による直接的な変化ではなく、舌腫瘍が形成されたことによる腫瘍周囲の微小環境での変化や、そこでの分泌因子がリンパ管を介してリンパ節へと流入したことによる反応と考える。

**Q.** リンパ管内皮細胞で KCNE4 が発現する事でカリウムチャネルが抑制されるとの事だが、その事と内皮細胞の透過性の亢進や転移促進の関連性はあるのか。カリウムチャネ

ルと血管もしくはリンパ管内皮の透過性との関連性の報告はあるか。

A. 本研究で、KCNE4 を過剰発現させたリンパ内皮細胞で接着因子であるフィブロネクチン 1 の発現が減少しており内皮の透過性亢進に関与している可能性が示唆された。接着因子と内皮の透過性や転移との関連性についての報告はあるが、カリウムチャンネルと内皮の透過性の報告はなく直接の関連性は不明である。

Q. 印象に残った点として、KCNE4 というチャンネルのコアではなく制御因子の方が重要というのは非常に興味深かった。KCNQ1 はがんや糖尿病、不整脈等との関連が報告されているが、今回は転移に対し制御因子を介してどのように関わっているか、何か仮説はあるか。

A. KCNQ1 は大腸がんなどで腫瘍抑制性に働くと言われており、KCNE4 は KCNQ1 に抑制的に作用するため腫瘍増悪に働く可能性がある。KCNQ1 と Wnt シグナルの  $\beta$  カテニン経路との関連性が報告されており、KCNQ1 と KCNE3 の複合体はチャンネルを活性化することで  $\beta$  カテニンを安定化し、がん患者の良好な予後と相関すると言われていている。KCNE4 はチャンネル抑制性に働くため、 $\beta$  カテニン経路が活性化され細胞の増殖、腫瘍形成に関与している可能性が考えられる。

Q. それはカリウムチャンネルを介さずに、別のシグナル経路の一部として働いている可能性があるということか。

A. KCNQ1 が  $\beta$  カテニンの標的遺伝子となり、KCNQ1 の発現が  $\beta$  カテニンの安定化とシグナル経路の不活性化に作用するといった報告がある。

Q. KCNE4 が抑制的に働くことでカリウムチャンネルが閉じ、カルシウムチャンネルが持続的に開く事でカルシウムシグナルが大きくなる可能性もあると思うがどうか。

A. インジケータを使ったカリウムやカルシウムイオンの動態や膜電位等の生理学的検討、チャンネル活性の確認はまだできていない。マイクロアレイ解析では *Cacnb3* というカルシウムイオンの  $\beta$  サブユニットの発現上昇が確認された。

Q. マイクロアレイ解析を行われているが、実際これはリンパ管内皮由来の遺伝子なのか。

A. ご指摘の通り、今回は顎下リンパ節全体から RNA を抽出しているため、リンパ管内皮由来のみとは断言ができない。ソーティングを行いリンパ内皮細胞のみから RNA の抽出を行ったり、シングルセル解析等を行う事でより詳細な遺伝子解析が可能になると考える。

Q. マイクロアレイ解析を行った際に KCNQ1 は変化していたか。

A. KCNQ1 は増加も減少もなく、明らかな発現変化は見られなかった。

Q. マイクロアレイ解析でトランスポーターの発現増加がみられたが、KCNE4 との関連性や、転移への関与の詳細は解るか。

A. トランスポーターSLC7A11 と KCNE4 との関連性は確認できていない。転移への関与も詳細は不明だが、がん細胞の生存へ働くといった報告がある。

Q. 臨床では舌がんのリンパ節転移としてセンチネルリンパ節が定義されるが、その前段階のリンパ節が着眼点ということか。動物実験ではリンパ節転移により色素沈着が起こるが、転移がないことは色素沈着のみでなく、組織標本で腫瘍細胞、細胞異形といった所見がないことも確認したのか。

A. センチネルリンパ節への転移成立前より早期のリンパ節の変化に着目した。転移の有無については、色素沈着に加えメラノーママーカーの発現量や HE 染色での組織学的評価も行った。

Q. 今回使用されているメラノーマと、実臨床で舌がんのメインとなる SCC では性質が違うと考えられるが、同様の変化が想定されるか。

A. SCC も舌に移植し転移モデルを作製した。メラノーマと同様にがん細胞移植後の顎下リンパ節で KCNE4 の発現増加を認めたが、メラノーマは移植後 3 日で発現増加していたのに対し、SCC は 7 日目では発現増加しておらず、11 日目で発現増加が確認された。転移性はメラノーマの方が高いと考えられ、SCC の場合は顎下リンパ節での遺伝子発現変化や転移までに、より時間を要すると考える。

Q. マイクロアレイで接着因子の増加がみられたが、これは転移の促進もしくは抑制のどちらに作用していると考えられるか。

A. 顎下リンパ節において接着因子 *Fscn1* が発現増加していた。リンパ節での増加であり、がん細胞のリンパ節への生着促進に作用している可能性があり、転移促進のためのニッチ形成と考えられる。

Q. 転移成立前に KCNE4 が発現上昇するリンパ節がセンチネルリンパ節になり得ると考えられるか。KCNE4 の発現があるリンパ節と、発現がないリンパ節がある場合、KCNE4 が発現しているリンパ節に転移が起こると考えているか。それを証明することは可能か。

A. KCNE4 が転移予測マーカーとなり得る可能性があると考えている。マウスでは頸部から複数のリンパ節摘出は困難なため、証明は難しい。証明のためには複数の頸部リンパ節を観察できるより大きな動物での実験等が必要と考える。

Q. KCNE4 と KCNQ1 は染色ではマージしているが、共沈するかなどの確認は行ったか。

A. 免疫沈降実験を行ったが、明確な結果は出なかった。

Q. KCNE4がKCNQ1に作用してチャネル活性が転移の機序にどのように関与しているかを調べるため、KCNE4のノックアウトマウスを使用した実験や、KCNE4が関与しているQT延長症候群の患者を調べると良いのではないか。

A. ノックアウトマウスを使用した実験は時間が足りず実施できていない。KCNE4の活性を調節する薬剤はないが、KCNQ1アクチベーターやブロッカーのモデルマウスへの投与実験を行ったが、いずれも転移率の有意な差は認めなかった。

Q. 申請論文内容の要旨にも今後の実験展望が記載されているが、これからも実験を継続していくのか。いずれは実臨床での検査等に反映できるような項目と考えられるが、どのような道筋を考えているか。

A. 将来的には転移の予測マーカー等としての臨床応用を目指して研究を継続していきたい。まずはリンパ管内皮特異的にKCNE4ノックアウトマウスへのがん細胞移植実験やチャネルの生理学的研究が必要と考える。

本論文は内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員による討議の結果、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。