

論文内容の要旨

論文題目 Characterization and Ability of Human Vascular Adventitial Fibroblasts to Provide a Favorable Environment for Human Lung Adenocarcinoma

(ヒト血管外膜由来線維芽細胞による肺腺がん腫瘍進展促進環境の形成機構)

氏名 星野 歩子

序論

乳がん、膵臓がん、肺がんなどの様々ながん種において、がん組織は間質細胞を含み、がん微小環境を形成している。がん微小環境を構成する間質には線維芽細胞、免疫細胞、血管及びリンパ管、そして細胞外マトリックスがある。これまでに、微小環境を構成する間質ががんの進展や転移の促進に好都合な環境を提供し得ることが示唆されている (*Cell. 2000;100:57-70*)。がん間質線維芽細胞のがん進展への寄与はヒトの病理組織およびマウスを用いた検討により報告されている (*Cell. 2005;121:335-48*)。間質線維芽細胞による腫瘍進展寄与機構としては、血管新生の誘導、骨髄由来の血管内皮前駆細胞の動員、そして細胞外マトリックスの再構築などが考えられている (*Nat Rev Cancer. 2006;6:392-401*)。このように、がん間質線維芽細胞が間接的に腫瘍進展に寄与するとの報告はあるものの、直接的な寄与の報告はほとんどない。

さらに、がん間質に含まれる線維芽細胞の起源は様々であることが予想され、その特徴には多様性があることが示唆される (*J Clin Invest. 1995;95:859-73*)。既存の組織由来の線維芽細胞、血管を構成する線維芽細胞、骨髄由来の線維芽細胞が、がん間質線維芽細胞の起源としてこれまでに報告されてきているが、間質に線維芽細胞が直接的に動員されることの評価が難しいことから十分な検討がされていないのが現状である。

血管の最も外側を構成する血管外膜には線維芽細胞が多く含まれている。がん細胞の血管浸潤は血管外膜を包囲する様な形で進展することが知られている。胃がん組織ではしばしば血管の異常が認められ、がん組織内の血管外膜構造を保たずに消失している様にみえると報告されている (*J Clin Pathol. 2004;57:970-2*)。このことは、血管外膜線維芽細胞ががん間質線維芽細胞としてがん組織の一部となっていることを示唆している。更に、肺がん組織切片においても血管外膜の線維芽細胞ががん間質に動員されている様な組織像が認められる。

我々は、血管外膜線維芽細胞ががん間質線維芽細胞の起源の一つであり、更にごん進展において組織学的に隣接することで腫瘍進展を促進する特殊な微小環境を提供し得るという仮説を立てて実験を行った。これまでに血管外膜線維芽細胞の特徴を明らかにした研究はなく、我々はまず

血管外膜由来線維芽細胞 (hVAFs: human Vascular Adventitial Fibroblasts) の生物学的な特徴を調べるとともに腫瘍進展に寄与する環境を提供し得るかどうか、またその際に関わる機構について検討することを本研究の目的とした。

本論

1. 血管外膜由来線維芽細胞 (hVAFs) の生物学的特徴

ヒト肺がん外科手術材料から血管外膜を初期培養して血管外膜由来線維芽細胞 (hVAFs) を採取した。hVAFs は、同一検体から採取したヒト肺組織由来線維芽細胞 (hLFs: human Lung-tissue-derived fibroblasts) と同様の形態を示し、様々な膜表面タンパク発現が類似していた。血管外膜の線維芽細胞が病態によって形態を変化させる報告があることから hVAFs の分化能を検討した。hVAFs は、筋線維芽細胞以外にも脂肪細胞及び骨芽細胞に分化し得る間葉系幹/前駆細胞 (MPCs) であることが分かった。

2. hVAFs の肺がん細胞株 A549 腫瘍形成能への寄与

A549 肺がん細胞株を hVAFs および hLFs とマウス皮下へ共移植した際、どちらの線維芽細胞も共に A549 単独移植に比べて腫瘍形成時期を早めることが分かった。移植細胞数を 1×10^4 個で検討した場合 A549 単独では腫瘍形成が確認できない (3ヶ月を越しても形成しない) のに対して hVAFs では2週目で、hLFs との移植では4週目で腫瘍形成が見られた (Fig.1a)。しかし、腫瘍形成が確認出来てからの腫瘍体積の増加傾向は、hVAFs 共移植群と hLFs 共移植群とで同様であった (Fig.1b)。in vitro の検討では、軟寒天培地中での足場非依存的な増殖を検討すると hVAFs との共培養で最もコロニー形成率が高く次に hLFs (hVAFs の 1/2) との共培養、A549 単独 (hVAFs の 1/3) と続くことが分かった。しかし、二次元培養において A549 細胞を hVAFs と共培養した際の増殖速度は、単独培養の場合と同様であったことから、これらの結果は単に A549 細胞の増殖能を上昇させたわけではないといえる。また、hVAFs によるがん細胞の腫瘍形成能上昇への寄与は A549 細胞株に限らず他の肺がん細胞株 (CRL-5807 及び PC-14) でも示された (Fig.2)。

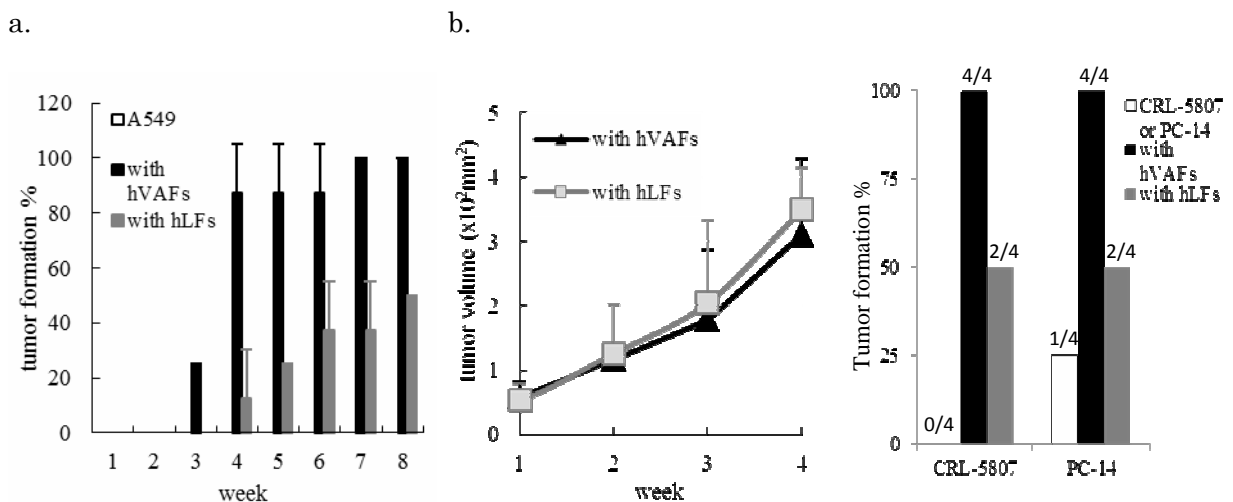


Fig.1. A549 細胞株と線維芽細胞のマウス皮下共移植実験 (n=8)

a. 移植後腫瘍形成率 b. 腫瘍形成確認後の腫瘍体積増加

Fig.2. 肺腺がん細胞株と線維芽細胞の腫瘍形成能

これまで、骨髄由来の間葉系幹細胞が乳がん細胞の転移を促進するという報告があることから、hVAFs に含まれる MPCs が肺がん細胞株の腫瘍形成能を上昇させる可能性について検討した。hVAFs を脂肪もしくは骨芽細胞へ分化誘導させた後で A549 細胞とマウス皮下へ移植した結果、分化誘導していない未分化な細胞との共移植の場合と腫瘍形成時期が同じであることが分か

った。このことから腫瘍形成能上昇への寄与は hVAFs に含まれる未分化状態の細胞が重要なのではないことが分かった。

3. DNA マイクロアレイ解析による hVAFs 特異的に発現する遺伝子の検索

hVAFs による腫瘍形成促進機構を調べるために、hLFs に比べて hVAFs で特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析したところ、Podoplanin の遺伝子発現が hVAFs で高いことが分かった。Podoplanin とは、ヒト肺がん組織内の線維芽細胞で発現が高いと予後不良であることが報告されている分子である。Podoplanin のタンパク発現も、hVAFs (43±17.5%) において同一患者由来の hLFs (16±10.3%) より高いことが、flow cytometry によって確認できた。

4. Podoplanin 発現線維芽細胞による腫瘍形成促進機構

FACS を用いて hVAFs における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞を分取し、それぞれを A549 細胞株とマウス皮下へ移植した結果、Podoplanin 陽性細胞との共移植群で腫瘍形成が促進された (Fig.3a)。また、Podoplanin 陽性細胞と A549 細胞共移植群の腫瘍形成時期は Podoplanin 陰性群との共移植より早い、腫瘍形成が確認出来てからの腫瘍体積の増加曲線は Podoplanin 陽性共移植群と陰性共移植群で同様であることが分かった (Fig.3b)。同様の結果が hLFs における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞でも得られた。これらは、hVAFs と hLFs それぞれと A549 細胞での共移植の場合での腫瘍体積増加の結果と類似していた。このことから、Podoplanin 陽性細胞は腫瘍形成促進に寄与することが示唆され、hVAFs と hLFs に含まれる Podoplanin 陽性細胞の量の差が腫瘍形成時期に違いが見られた理由である可能性が考えられる。さらに、Podoplanin 陽性 hVAFs と A549 を共移植したマウスでよりリンパ節及び肺への転移が促進されていることが分かった (Fig.3c)。

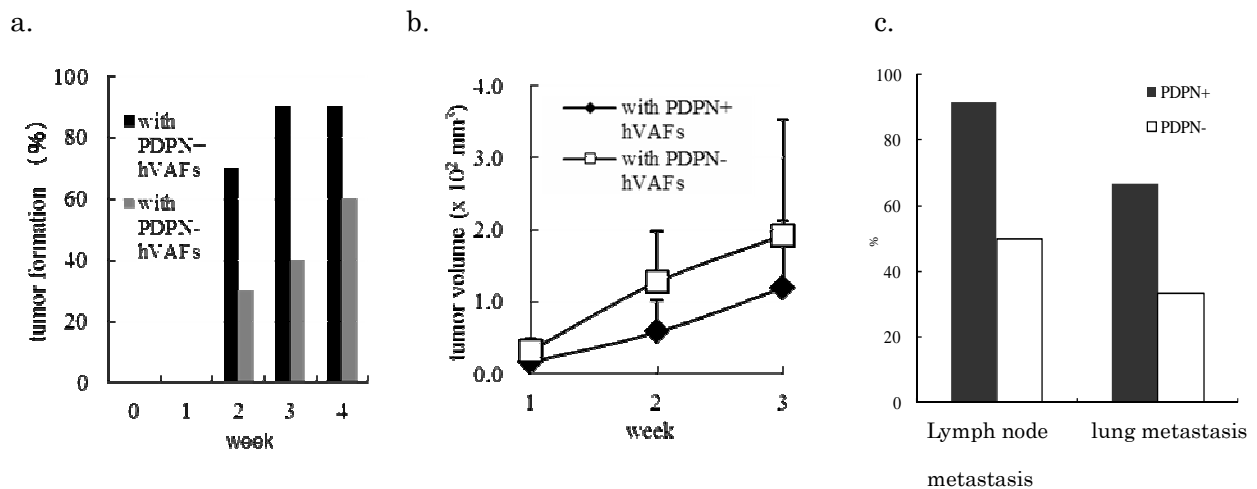


Fig.3. hVAFs の Podoplanin 陽性及び陰性細胞と A549 細胞株のマウス皮下共移植実験 (n=10)

a. 腫瘍形成率 b. 腫瘍形成確認後の腫瘍体積増加 c. 肺及びリンパ節転移率

次に、hVAFs における Podoplanin 発現を shRNA により抑制し (Fig.4a)、その時の A549 腫瘍形成へ与える影響を調べると、hVAFs による A549 腫瘍形成促進が打ち消されることが確認できた (Fig.4b)。Podoplanin 発現抑制 hVAFs との共培養で足場非依存的な増殖の促進も抑制された。しかし、Podoplanin 発現 hVAFs の培養上清を添加した場合と、shRNA により Podoplanin 発現が抑制された hVAFs の培養上清を添加した場合とではコロニー形成に差はみられなかった。また、Podoplanin 組み換えタンパク質添加によってもコロニー形成に変化はなかった。hVAFs に Podoplanin を強発現させると (>80%陽性) A549 細胞の腫瘍形成率が上昇した。以上のことから、hVAFs における Podoplanin は腫瘍形成能上昇に寄与する機能分子であることが分かった。

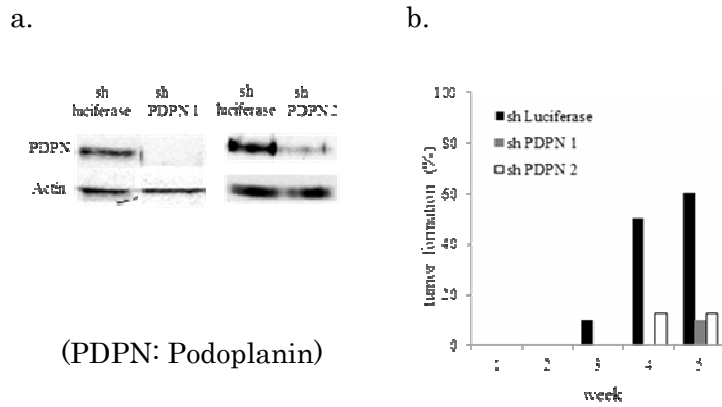


Fig.4. hVAFs の Podoplanin 発現の抑制 (n=6-10)

a. shRNA 処理後の hVAFs による Podoplanin 発現; western blot
 b. Podoplanin 発現抑制 hVAFs による A549 細胞の腫瘍形成能

5. ヒト 3 cm 以下肺がん組織における線維芽細胞の Podoplanin 発現とがん進展

ヒト肺がん切除症例 112 例において、腫瘍サイズが 3 cm 以下の中で間質線維芽細胞が Podoplanin 陽性症例 (n=32) と Podoplanin 陰性症例 (n=80) を集めた。Podoplanin 陽性腫瘍 32 例中 17 例 (53%) で脈管侵襲がみられたが、陰性腫瘍 80 例では 12 例 (15%) でのみみられた。また、Podoplanin 陽性腫瘍 32 例中 9 例 (28%) でリンパ節転移が確認されたが、陰性腫瘍 80 例中 6 例 (7.5%) のみがリンパ節転移陽性であった (Fig.5a)。さらに、Kaplan-Meier 解析により、Podoplanin 陽性腫瘍の方が手術後の再発率が高く ($p < 0.001$) 生存率が低い ($p < 0.001$) ことがわかった (Fig.5b)。

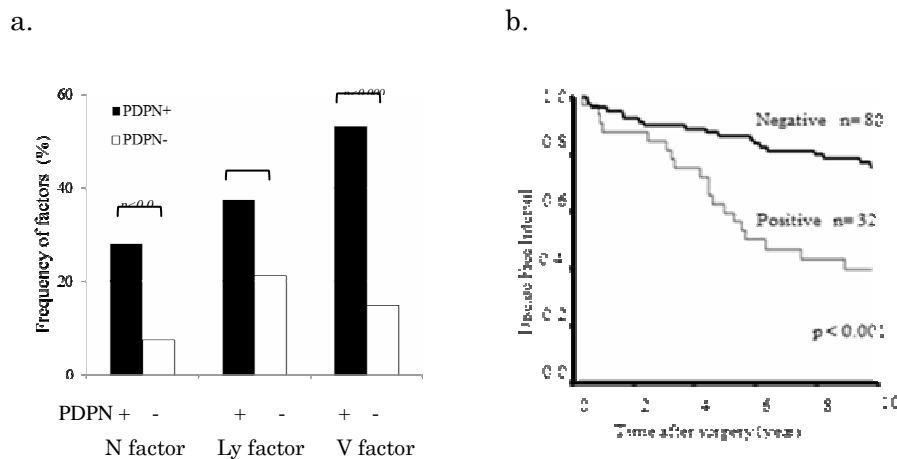


Fig.5. ヒト肺がん切除検体による間質線維芽細胞 PDPN 発現別腫瘍進展

a. N; 脈管侵襲, Ly; リンパ管浸潤 V; リンパ節転移率
 b. PDPN 発現別に見た 10 年再発率

結論

本研究では初めて、同一臓器由来の二種類の線維芽細胞 hVAFs 及び hLFs が腫瘍進展において異なる影響を与えることを報告している。また、hVAFs が hLFs に比べて肺腺がん細胞株の腫瘍形成能上昇させる機構には Podoplanin が関わることが分かった。このことから血管周囲にはがん進展を促進させる特殊な環境があることが示唆された。これまでに、がん間質の線維芽細胞が腫瘍進展に寄与することを示唆する様な報告はあったが、実際に腫瘍進展を促進させる細胞集団を特定し、更に機能分子を報告した研究はこれまでになく、がん微小環境の研究を進展させて行くうえで極めて重要な報告であると考えられる。また従来のような、がん細胞のみに着目しては腫瘍組織の生物像を把握することは難しく、がん研究においてがん組織全体をとらえた検討を行い、治療戦略を考える必要があることが示唆された。