

がん細胞による線維芽細胞の形質変化とその可視化

2008年3月修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生証番号 66525 氏名 真田 賢

指導教員 落合 淳志 教授

キーワード ; がん間質、CAF

序論

がん組織はがん細胞と間質細胞より構成される。近年、がん細胞とがん間質細胞の相互作用ががん組織形成生存、進行、転移に寄与することが示された。形態学的な観察から、がん間質中の線維芽細胞はCAF (Cancer Associated Fibroblast) と呼ばれ、正常組織中の線維芽細胞とは異なる性質を持つことが示唆された。また、線維芽細胞はがん組織に積極的に動員され、形質変化することが示されてきた。しかし、がん細胞によって引き起こされる明確な線維芽細胞の形質変化の機構は不明であり、動員中の経時的な変化についての知見は全くなかった。

本研究ではがん細胞存在下における線維芽細胞の形質変化を明らかにし、可視化することによって CAF 化の機構を検索することを目的とした。

結果と考察

1. 線維芽細胞内で SCD 遺伝子の発現はがん細胞によって惹起される

がん細胞により引き起こされる線維芽細胞内の遺伝子発現変化を明らかにするために、通常培養でのヒト骨髄由来線維芽細胞株 KM104 とヒト膵臓がん由来細胞株 Capan-1 の培養上清を添加した KM104 の mRNA 発現比較を cDNA マイクロアレイ法にて解析した。その結果、191 の候補遺伝子が得られ、データベース上にプロモーターの知見の有る 13 遺伝子について定量的 PCR 法を用いて経時的変化を含め解析した。その結果、SCD 遺伝子の有意な発現増加がみられた (表 1) 。

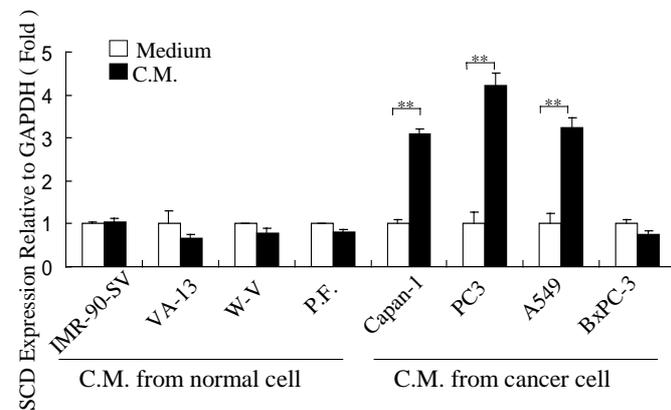


図1 正常細胞とがん細胞の培養上清による KM104 内 SCD mRNA 発現変化 (C.M.; 培養上清, P.F.; 初代培養線維芽細胞)

Gene Symbol	6 h	12 h	24 h
E2F1	0.389	0.584	0.794
LDLR	1.79*	1.74*	1.44
CTSD	1.54	1.01	1.19
PSG6	1.53	3.48*	1.18
ATF3	0.588	1.53	0.949
GIP3	0.447	2.97**	3.35*
USF2	1.46	2.65*	1.78
SQLE	2.86*	5.80**	13.1**
OAZ2	0.823	1.66	1.68
SEPX1	1.25	0.090	0.482
SCD	4.44**	16.1**	52.8**
AP1M2	1.27	0.987	1.294
INSIG	1.01	1.15	0.792

表1. Capan-1 の培養上清による KM104 内 mRNA 発現変化 (数値は培養上清添加前との比)

また、この SCD 遺伝子の発現上昇はヒトがん細胞 4 株の内 3 株の培養上清によって引き起こされるが、ヒト正常細胞株 4 株の培養上清ではいずれにおいても引き起こされないことを明らかにした (図 1)。更に、KM-104 以外のヒト線維芽細胞株でも同様の結果が得られた (データは本

文に示した)。

2. SCD 遺伝子の発現は CAF と正常組織中線維芽細胞と異なる

5 症例のがん患者より単離した CAF と正常組織由来の線維芽細胞 (N-CAF) における SCD mRNA 発現量を比較し CAF での発現が高いことを明らかにした (図 2)。この結果は、生体内においても CAF 化に伴い、SCD 遺伝子の発現が増加することを示す。一方、CAF は N-CAF とは異なり、がん細胞の培養上清を添加すると SCD

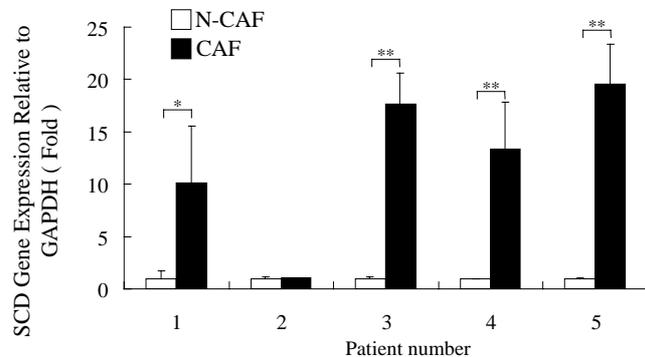


図 2 5 人のがん患者由来の N-CAF、CAF それぞれの SCD mRNA の発現

mRNA 発現量が減少した (データは本文に記載した)。このことは CAF 化により SCD の発現機構が変化することを示し、SCD の発現ががん細胞による形質変化の指標になることを示す。

3. がん細胞による線維芽細胞内発現変化の可視化

がん細胞による線維芽細胞内発現変化を可視化するため、SCD 遺伝子の転写開始点上流 3048、580 base をクローニングし、その領域をプロモーターとした EGFP 発現 KM104 株 pSCD>3048、580 を作製した。それらの細胞を用いて、Capan-1 の培養上清を添加した際の線維芽細胞内蛍光量の上昇を観察できた (図 3)。また、GFP

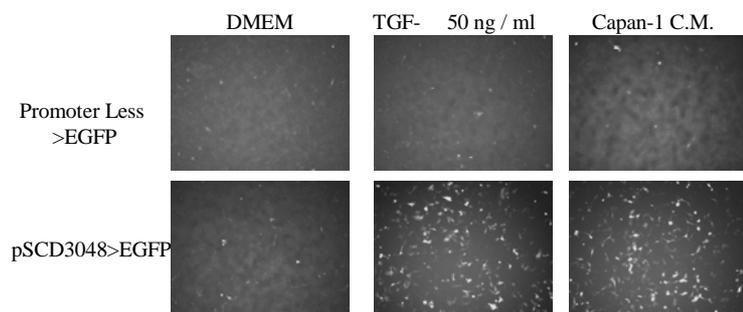


図 3. がん細胞による線維芽細胞内 SCD mRNA 発現変化の可視化 DMEM、TGF-、Capan-1 の培養上清による刺激 24 時間後の各ベクター導入線維芽細胞の蛍光顕微鏡写真 (C.M.; 培養上清)

陽性細胞数を FACS によって定量することができた (データは本文に記載した)。

まとめ

私はがん細胞による線維芽細胞内 SCD 遺伝子の発現上昇を明らかにした。この発現増加は多くのがん細胞株によって惹起され、どの線維芽細胞株内でも起こり、CAF でも保存されていることから SCD の発現ががん細胞による線維芽細胞の形質変化の指標となると考えられる。また、SCD 遺伝子のプロモーターを用いてがん細胞による線維芽細胞内発現変化を *in vitro* にて可視化できた。これらのことより、SCD 遺伝子のプロモーターを用いてがん細胞による線維芽細胞の動員中の経時的な変化を観察でき、今後 CAF 化機構が明らかになると考えられる。