

# がん細胞による線維芽細胞の形質変化とその可視化

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻修士課程

がん先端生命科学分野

学生証番号 66525

真田 賢

指導教員；落合 淳志

# 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)。

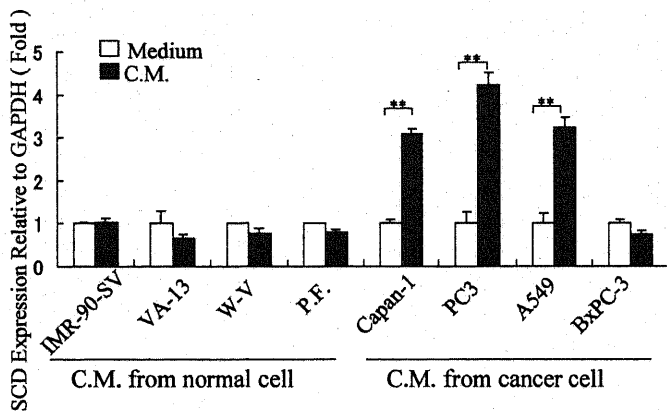


図 1 正常細胞とがん細胞の培養上清による KM104 内 SCD mRNA 発現変化 (C.M.; 培養上清, P.F.; 初代培養線維芽細胞)

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 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

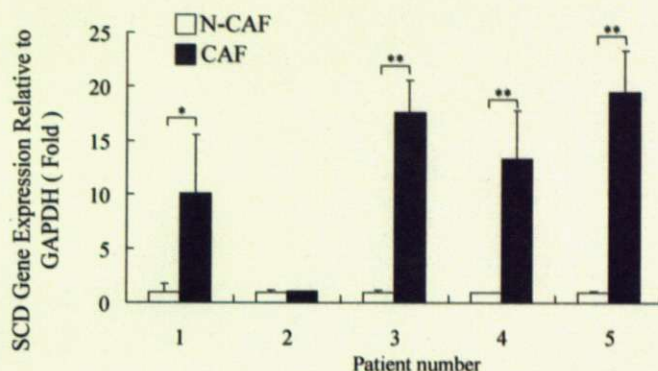


図 2 5 人のがん患者由来の N-CAF、CAF それぞれの SCD mRNA の発現

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 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)。

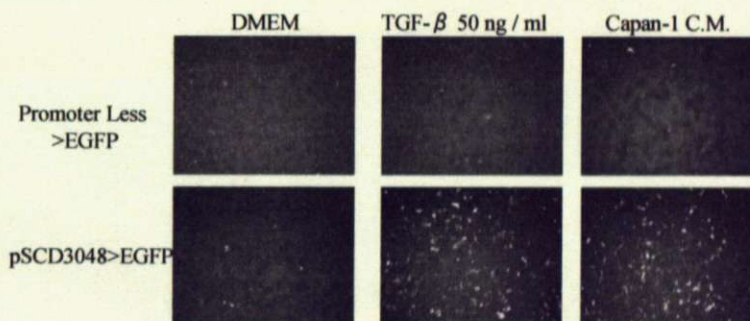


図 3. がん細胞による線維芽細胞内 SCD mRNA 発現変化の可視化 DMEM、TGF- $\beta$ 、Capan-1 の培養上清による刺激 24 時間後の各ベクター導入線維芽細胞の蛍光顕微鏡写真 (C.M.; 培養上清)

## 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。

## 目次

第 I 章	概要	1
第 II 章	序論	2
第 III 章	材料・方法	4
	1. 培養細胞と培養条件	
	2. CAF の単離と初代培養	
	3. 培養上清	
	4. cDNA マイクロアレイ法	
	5. 定量的 PCR	
	6. 蛍光標識細胞分取	
	7. マウスヒトがん移植モデル	
	8. プラスミド構築	
	9. 大腸菌培養および DNA 調整	
	10. 細胞への形質転換	
	11. 蛍光顕微鏡観察	
	12. SCD mRNA 発現の蛍光顕微鏡を用いた可視化実験	

13. SCD mRNA 発現の可視化の定量実験

第 IV 章 実験結果

13

1. *in vitro* におけるがん細胞培養上清による線維芽細胞内遺伝子発現変化解析
2. がん細胞による線維芽細胞の遺伝子発現変化の普遍性解析
  - 2-1. 血清の有無による発現変化
  - 2-2. 細胞接触による発現変化
  - 2-3. 多種のがん細胞株と正常細胞株による発現変化
  - 2-4. 多種の線維芽細胞株の SCD mRNA 発現変化
3. CAF と N-CAF 及びマウスモデルにおけるがん間質細胞内 SCD mRNA 発現変化
  - 3-1. CAF と N-CAF における SCD mRNA 発現
  - 3-2. がん細胞の培養上清による CAF の SCD mRNA 発現応答
  - 3-3. マウスヒトがん移植モデルにおけるがん間質細胞内 SCD mRNA 発現変化
4. がん細胞による線維芽細胞内 SCD mRNA 発現の可視化
  - 4-1. SCD mRNA 発現の可視化
  - 4-2. SCD mRNA 発現の可視化の定量化

第 V 章 考察

22

第 VI 章 SUMMARY

30

謝辭 32

圖表 33

參考文獻 45

## I : 概要

がん組織はがん細胞と間質細胞より構成される。近年、がん細胞と間質細胞の相互作用が、がん組織形成の生存、進行、転移に寄与することが示されてきた。がん間質中の線維芽細胞は CAF ( Cancer Associated Fibroblast ) と呼ばれ、形態学的ならびに細胞生物学的な観察から正常組織中の線維芽細胞 ( Non-Cancer Associated Fibroblast ; N-CAF ) とは異なる性質を持つことが示された。また、正常組織中の線維芽細胞はがん組織に積極的に動員され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線維芽細胞の形質変化の時空間的解析は行われておらず、どのような機構によっていつがん間質線維芽細胞の形質変化が起こるのかも不明である。

本研究では、がん細胞の培養上清によって線維芽細胞の SCD ( stearoyl-CoA desaturase ) 遺伝子が発現増加することを明らかにし、がん細胞によって引き起こされる線維芽細胞の形質変化の指標に SCD 遺伝子の発現が適切であることを示した。次に、SCD 遺伝子のプロモーターの下流に EGFP ( Enhanced Green Fluorescent Protein ) を持つ線維芽細胞を作製し、がん細胞による線維芽細胞細胞の発現変化を可視化できたことを報告する。

これらの結果は、がん細胞との相互作用により起こる線維芽細胞の SCD 遺伝子発現変化を経時的に観察できることを示し、がん細胞により形質変化する線維芽細胞 ( CAF 化 ) の機構解明に大きく寄与すると思われる。

## II : 序論

がん組織はがん細胞だけでなく線維芽細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞、マクロファージなどの多種の細胞より構成される[1-3]。それらの細胞は間質細胞と呼ばれ正常組織中にも存在するが、がん組織中の間質細胞は正常組織中とは異なった性質、形態を持つことが示されている[4]。

近年そのがん組織を形成する間質細胞が、がん細胞の生存[5]、進行[6]、転移[7]、がん組織生成の段階全て[8]において重要な働きをしていることが示された。

特に、がん組織中の線維芽細胞は大腸がん[9]、乳がん[10]、肝がん[11]、肺がん[12]、前立腺がん[13]、そして膵臓がん[14]などにおいて多量に存在する。がん組織中の線維芽細胞は CAF ( Cancer Associated Fibroblast ) と呼ばれ、上皮細胞をがん化し[15, 16]、がんの増殖[17]、血管新生[18]、転移[19]に寄与する。また CAF はがん細胞を直接増殖促進するだけでなく、内皮前駆細胞を動員し血管新生を亢進させることにより、間接的にがん細胞へ影響を与えることも明らかとなった[20]。このように CAF のがん細胞に与える影響は近年盛んに研究されているが、がん細胞による線維芽細胞の影響はあまり検討されていなかった。CAF の定義はがん組織に含まれ、筋線維芽細胞に似た形態を持つことであり[19]、筋線維芽細胞とは平滑筋と線維芽細胞の特徴を併せ持つ間葉系細胞で、細胞培養においては広い紡錘状の形をした細胞である。CAF の免疫細胞化学的な特徴は  $\alpha$ -SMA (  $\alpha$ -smooth muscle actin )、Vimentin、prolyl 4-hydroxylase、FAP ( fibroblast activation



protein, alpha) 陽性であり、平滑筋細胞では高発現している高分子量の caldesmon、smoothelin 陰性である[17, 21-23]。

しかし、Vimentin、prolyl 4-hydroxylase は正常組織中の線維芽細胞でも発現しており、 $\alpha$ -SMA は CAF に特異的に発現するのではなく、正常線維芽細胞においても細胞密度、周囲の張力によって発現が調節される[24-26]。また、FAP も CAF に特異的に発現するのではなく、組織の創傷治癒時に発現することが知られており[27]、現在までに CAF 特異的な免疫細胞化学的なマーカーは知られていない。

これまでに、がん細胞の刺激による正常線維芽細胞の CAF への変化過程の研究は少ない。また、線維芽細胞はその由来組織によって遺伝子発現パターンが異なっていることより[28]、異なる由来組織の線維芽細胞における CAF 化に伴う共通の遺伝子発現変化は全く知られていなかった。また、当研究室で行ったマウスにヒトがん細胞とヒト正常線維芽細胞を別々の部位より移植し腹腔内にがん組織を作らせたところ、ヒト正常線維芽細胞はがん組織に多量に存在したことより、正常線維芽細胞はがん組織に積極的に導入されることを示してきた[29, 30]。これらの実験をもとに、正常線維芽細胞ががん組織内に導入される過程を考えると、正常線維芽細胞が CAF 化する過程はがん細胞または組織が産生する液性因子による作用を受ける段階から、がん細胞と直接接触による作用を受ける段階まで様々な局面で段階的に起こる可能性がある。そこで、いつ、どこで、どの線維芽細胞が形質を変化させるのかに関心が寄せられる。一つの正常線維芽細胞の明らかな形質変化を見つけ出し、その変化を可視化し、経時的に観察することは、それらの疑問に解答を与えて

くれるであろう。

本研究の目的はがん細胞またはがん組織による正常線維芽細胞の CAF 化誘導の第一段階と考えられる、がん細胞の産生する液性因子により惹起される線維芽細胞共通の遺伝子発現変化を明らかにすることである。また、その遺伝子発現変化を形質変化の指標とし、可視化することによって、いつ、どこで、どの正常線維芽細胞ががん細胞によって CAF 化されるかを明らかにすることである。

### Ⅲ：材料と方法

#### 1. 培養細胞と培養条件

SV-40 にて形質転換されたヒト骨髄由来の線維芽細胞株 KM104 と CMV ( *Cytomegalovirus* ) プロモーター支配下に GFP ( Green Fluorescent Protein ) 遺伝子を持つ、GFP 陽性 KM104 は当研究室によって樹立された細胞株である。その 2 つの線維芽細胞株は、SV-40 にて形質転換された他の 4 種の線維芽細胞株 ( ヒト肺由来の線維芽細胞株 VA-13 、IMR-90-SV 、MRC-5 SV1 TG 1 、ヒト表皮由来の線維芽細胞株 W-V ) よりもがん組織に動員されやすい線維芽細胞株である[30]。ヒト前立腺がん由来細胞 PC-3 は ATCC ( Rockville , MD ) より購入し、通常 10 % FBS ( fetal bovine serum ) と 1 % 抗生物質 ( penicillin と streptomycin ) を含む RPMI-1640 で培養された。penicillin と streptomycin 、RPMI-1640 ( Roswell Park Memorial Institute ) は SIGMA Chemical ( St Luis, MO ) より購入した。

VA-13 、IMR-90-SV 、MRC-5 SV1 TG1 は理研 ( Tukuba , Japan ) より購入し、通常 10 % FBS と 1 % 抗生物質 ( penicillin と streptomycin ) を含む  $\alpha$ -MEM ( alpha-Minimal Essential Medium ) にて培養された。

W-V は理研 ( Tukuba , Japan ) より購入し、ヒト肺がん由来細胞株 A549 、ヒト膀胱がん由来細胞株 BxPC3 は ATCC ( Rockville , MD ) より購入し 10 % FBS と 1 % 抗生物質 ( penicillin と streptomycin ) を含む DMEM ( Dulbecco' s modified Eagle' s

medium ) にて培養された。

ヒト膵臓がん由来細胞株 Capan-1、BxPC3、ヒト前立腺がん由来細胞株 PC-3、ヒト肺がん由来細胞株 A549 は ATCC より購入し、20 % FBS と 1 % 抗生物質 ( penicillin と streptomycin ) を含む DMEM にて培養された。全ての細胞は 5 % CO<sub>2</sub>、37 °C にて培養した。

## 2. CAF の単離と初代培養

インフォームドコンセントを取得後、生体組織検査のために国立がんセンター東病院の患者 5 名より取り出されたがん組織と正常組織を用いた。取り出されたがん組織と正常組織はメスと鉗を用いて細かく切断され、 $\alpha$ -MEM の入った直径 10 cm のシャーレ中に入れられた。数日後シャーレに生着した細胞は、 $7 \times 10^6$  個に増えたところで新しい培地の入ったシャーレに移し、さらに培養を続けた。これを 20 日あるいは 21 日間繰り返し、CAF と初代培養線維芽細胞を得た。本論文では CAF と対比し、この手法で培養した初代培養細胞を N-CAF と表記する。

全ての初代培養は 10 % FBS と 1 % 抗生物質 ( penicillin と streptomycin ) を含む  $\alpha$ -MEM を用いて 5 % CO<sub>2</sub>、37 °C にて培養された。全ての初代培養細胞を用いた実験は 7 ~ 9 回継代したものをを用いた。

### 3. 培養上清

IMR-90-SV、VA-13、W-V、Capan-1、PC3、A549、BxPC3 は直径 10 cm の培養皿にて培養され、細胞数が  $5.6 \times 10^6$  個に増えたところで PBS (phosphate-buffered saline) で洗淨し、それぞれの培地を添加した。5% CO<sub>2</sub>、37 °C にて 24 時間培養後、MILLEX®HA Filter 0.45 μm (Millipore Corp, Bedford, MA) を用いてそれぞれの培養上清を得た。

### 4. cDNA マイクロアレイ法

22,284 個の転写物に対応した mRNA 発現レベルの解析に human H133A oligonucleotide probe arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いた。全 RNA は Trizol (Life Technologis, Inc.) を用いて、KM104 と Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後の KM104 から抽出した。すべての cRNA プローブを作製するために全 RNA 1 mg と T7-transcription [31] が用いられた。10 μg の cRNA 断片は 200 ml のハイブリダイゼーション反応混液中 45 °C 16 時間 60 rpm で遠心し、マイクロアレイにハイブリッド形成された。その後 6 × SSPE (saline-sodium phosphate-EDTA) を用いて 25 °C にて洗淨し、100 mM MES (pH 6.7)、0.1 M NaCl、0.01% Tween 20 の緩衝液に溶かされた streptavidin phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて 50 °C にて染色し再び 6 × SSPE にて洗淨した。biotinylated anti-streptavidin IgG にて染色し、再び streptavidin phycoerythrin にて染色し、6 x SSPE にて洗淨した。マイクロアレイの蛍光強度は GeneArray scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて 3 μm の

分解能にて査走された。査走された画像の蛍光強度は Microarray Suite 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて通常培養での KM104 の各遺伝子の mRNA 量を 1 とし、定量解析された。各々の実験は独立に 2 度行った。

## 5. 定量的 PCR

KM104、IMR-90-SV、VA-13、W-V、CAF、N-CAF は直径 10 cm の培養皿にて培養され、細胞数が  $7 \times 10^6$  個に増えたところで PBS で洗浄され、1 ml の Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加され、セルスクレーパーにて剥がされ、200  $\mu$ l の chloroform (Wako, Osaka, Japan) を添加され、激しく震蕩され 2 分間室温で放置され、15000 rpm、4  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心されることによって全 RNA を分離された。分離された RNA 溶液は 500  $\mu$ l の 2-propanol (Wako, Osaka, Japan) を添加され、激しく震蕩され 10 分間室温で放置され、15000 rpm、4  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心された。上清を捨て、75% の Ethanol (Wako, Osaka, Japan) にて洗浄し、精製することによって、各細胞からの全 RNA 抽出は行われた。

cDNA は 2.5  $\mu$ g の全 RNA に 50 pmol の Random 6 mers (Takara Bio, Shiga, Japan)、2  $\mu$ l の 5  $\times$  ExScript<sup>TM</sup> Buffer 2  $\mu$ l (Takara Bio, Shiga, Japan)、50 U の ExScript<sup>TM</sup> RTase (Takara Bio, Shiga, Japan)、10 U の RNase Inhibitor (Takara Bio, Shiga, Japan) を添加し総量 10  $\mu$ l にし、42  $^{\circ}$ C 15 分間逆転写反応を行い、95  $^{\circ}$ C 2 分間逆転写酵素を熱失活させ得た。逆転写反応は Thermal Cycler Dice

( Takara Bio , Shiga , Japan ) によって行った。

定量的 PCR は得られた cDNA 溶液  $2 \mu\text{l}$  、SYBR<sup>®</sup>*Premix Ex Taq*<sup>™</sup>  $12.5 \mu\text{l}$  ( Takara Bio , Shiga , Japan ) 、滅菌蒸留水  $9.5 \mu\text{l}$  、Table 1-1 に示す PCR Forward Primer 、PCR Reverse Primer をそれぞれ  $0.2 \mu\text{M}$  添加し、総量  $25 \mu\text{l}$  を  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 秒間初期変性を行い、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 秒間  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  30 秒間伸張反応を 40 回行った。反応終了後、増殖曲線と融解曲線を確認した。同一プライマーを用いているにもかかわらず、融解温度が他の実験結果とずれている、または塩基配列より予想される融解温度より大幅にずれている実験データは破棄した。各材料の GAPDH 遺伝子の cDNA フラグメントを増幅して検量線を作成した。その各材料の検量線を用いて各実験材料の GAPDH mRNA 量を測定した。そして、各遺伝子 cDNA のフラグメントを増幅して検量線を作成し、各実験材料の mRNA 量は検量線を元に GAPDH mRNA 量より補正することで定量した。

## 6. 蛍光標識細胞分取

蛍光標識細胞分取 ( FACS ) 解析、GFP 細胞の識別と回収は FACSCalibur ( Becton Dickinson , San Jose, CA ) を用いた。FACS 解析、回収に用いる細胞は全て 3 % FBS 、0.05 % NaN<sub>3</sub> を含む PBS に  $1 \times 10^6$  個 / ml の密度にて行った。回収する細胞は 25 ml の 7.5 % BSA FractionV 溶液 ( Gibco Laboratories , Grand Island , NY ) と 25 ml の PBS にて 24 時間コーティングし、液体培地を添加した 50 ml Falcon tube ( Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ ) に回収した。全ての FACS データは CELLQuest software

( Becton Dickinson , San Jose, CA ) によって解析された。

## 7. マウスヒトがん移植モデル

動物の飼育と実験は国立がんセンターによって定められた指針に従い行われた。

C.B-17/Icr-*scid* ( Severe Combined Immunodeficiency ) マウス は CLEA Japan, Inc ( Tokyo, Japan ) より購入した。200  $\mu$ l の 10% FBS を含む DMEM 中に播種された  $2 \times 10^6$  個の Capan-1 はマウスに皮下移植された。5 週間後、マウスよりがん組織と肝臓組織を摘出し、無菌のメスを用いて 1 cm 四方の小さな断片に解剖され、DMEM 中で MULTI-BEADS SHOCKER ( Yasui Kikai , Osaka , Japan ) を用いて完全に破碎された。分離された細胞より全 RNA は抽出され、ヒト RNA とは反応しないように設計したマウスホモログの SCD、Scd1 特異的プライマーセット ( Scd1-F , Scd1-R . , Table 1-1 ) を用いてがん組織中のがん間質細胞内の Scd1 mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。マウス SCD mRNA 量の測定に対するポジティブコントロールとしてマウス肝臓組織細胞、ネガティブコントロールとしてヒト線維芽細胞から mRNA を抽出し定量的 PCR を行った。

## 8. プラスミド構築

プラスミドの構築にあたり、SCD 遺伝子の 5' flanking region の配列を NCBI のデータベース ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene> ) より得た。次に MRC-5 のゲノム DNA を鋳型に proSCD3077-F、proSCD-R、あるいは proSCD608-F、proSCD-R



( Table 1-2 ) の 2 つのプライマーのセットを用いて PCR 反応を行い、SCD 遺伝子の転写開始点の 29 base 下流から 3048 base 上流までの約 3.1 kb のフラグメント、転写開始点の 29 base 下流から 580 base 上流までの 608 base のフラグメントを増幅した。増幅されたフラグメントを制限酵素サイト付加したプライマー Xho1-proSCD3077-F 、 Hind3-proSCD-R あるいは Xho1-proSCD608-F 、 Hind3-proSCD-R ( Table 1-2 ) の 2 つのプライマーセットを用いて PCR 反応を行い、*Xho I-HindIII* の制限酵素サイトが付加した SCD 遺伝子の転写開始点の 29 base 下流から 3048 base 上流までの約 3.1 kb のフラグメント、転写開始点の 29 base 下流から 580 base 上流までの 608 base のフラグメントを増幅した。それぞれの PCR 産物を *Xho I-HindIII* で制限酵素処理し、エタノール沈殿にて精製した。その後、pEGFP-1 ( GenBank Accession #: U55761 ) を *Xho I-HindIII* で制限酵素処理し ( Figure 8-A )、エタノール沈殿反応で精製した。制限酵素処理した PCR 産物と pEGFP-1 を TaKaRa Ligation Kit ver 2.1 ( Takara Bio , Shiga , Japan ) を用いて 16 °C 30 分間ライゲーション反応させた ( Figure 8-B )。pEGFP-1 は青木博士 ( 東京大学大学院新領域創成科学研究科 ) より譲り受けた。pEGFP-C1 ( GenBank Accession #: U55763 ) は Invitrogen ( Carlsbad, CA, USA ) より購入した。

## 9. 大腸菌培養および DNA 調整

クローニングのための大腸菌宿主は XL1-Blue 株 ( Stratagene , La Jolla , CA ) を用いた。コンピテントセルにプラスミドを添加し、氷上で 30 分間放置し、42 °C 90 秒間、

更に氷上で 2 分間放置し形質転換した。得られた形質転換体は 0.2 ml の SOC 培地 ( Kanamycin , 10  $\mu$ g / ml ) を添加し、37  $^{\circ}$ C 1 時間振蕩培養し、200  $\mu$ l を LB プレート ( Kanamycin , 30  $\mu$ g / ml ) に播種し 24 時間 37  $^{\circ}$ C にて培養した。コロニー形成した大腸菌は 2 ml の LB 培地 ( Kanamycin , 10  $\mu$ g / ml ) 37  $^{\circ}$ C にて培養し、増殖した大腸菌を QIAprep<sup>®</sup>Spin Miniprep Kit ( Qiagen , Valencia, CA ) を用いて PCR 産物が挿入されているか確認した後、200 ml の LB 培地 ( Kanamycin, 10  $\mu$ g/ml ) 37  $^{\circ}$ C にて培養し、QIAprep<sup>®</sup>Spin Maxi Kit ( Qiagen , Valencia, CA ) を用いて DNA 調整した。その後、フェノールクロロホルム抽出を行い得たプラスミドを以降の実験に用いた。

#### 10. 細胞への形質転換

1 x 10<sup>6</sup> 個の細胞を直径 60 mm の培養皿に 5 ml の培養液と共に播種し、24 時間培養した。500  $\mu$ l の Opti-MEM ( Gibco Laboratories , Grand Island , NY ) に 20  $\mu$ l の LipofectAMINE2000 ( Invitrogen , Carlsbad , CA ) を添加し穏やかに攪拌した。室温で 5 分間放置し、その後 500  $\mu$ l の opti-M に 8  $\mu$ g のプラスミドを添加した。穏やかに攪拌した溶液を添加し 20 分間室温で放置した溶液総量 1 ml を先の細胞に添加した。24 時間培養後、以降の実験に用いた。以後、SCD 遺伝子の転写開始点より上流 580 base をプロモーターとした EGFP 発現 KM104 株を pSCD580>EGFP と表記し、同様に上流 3048 base をプロモーターとした EGFP 発現 KM104 株を pSCD3048>EGFP と表記する。また、形質転換のポジティブコントロールとして CMV プロモーターの支配下に EGFP 遺伝子を含

むベクター、pEGFP-C1 を形質導入した（以後、この細胞を pCMV>EGFP と表記する）。  
また、pEGFP-1 に PCR 産物を入れずに制限酵素処理とライゲーション反応を行い、プロモーターを持たない EGFP 発現 KM104 株、pLess>EGFP を得た。

#### 11. 蛍光顕微鏡観察

EGFP の蛍光観察には BIOREVO BZ-9000（KEYENCE, Osaka, Japan）を用い、蛍光顕微鏡写真の解析には BZ-H2A（KEYENCE, Osaka, Japan）を用いた。励起の光源としては水銀ランプを使用し、フィルターには OP-66836 BZ フィルタ GFP-BP（励起波長；470 / 40 nm，ダイクロックミラー波長；495 nm，吸収波長；535 / 50 nm）を使用した。

#### 12. SCD mRNA 発現の蛍光顕微鏡を用いた可視化実験

pCMV>EGFP、pLess>EGFP、pSCD3048>EGFP、pSCD580>EGFP は直径 10 cm の培養皿にてそれぞれ 3 皿ずつ培養され、細胞数が  $5.6 \times 10^6$  個に増えたところで PBS を用いて洗浄され、DMEM、Recombinant Human TGF- $\beta$ 1（PeproTech, Rocky Hill, NJ）50 ng / ml を含む DMEM、Capan-1 の培養上清をそれぞれ 10 ml ずつ添加し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C にて 24 時間培養後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### 13. SCD mRNA 発現の可視化の定量実験

SCD mRNA 発現の蛍光顕微鏡を用いた可視化実験と同様に、pCMV>EGFP、pLess>EGFP、pSCD3048>EGFP、pSCD580>EGFP は直径 10 cm の培養皿にてそれぞれ 3 皿ずつ培養され、細胞数が  $5.6 \times 10^6$  個に増えたところで PBS を用いて洗浄され、DMEM、Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 50 ng / ml を含む DMEM、Capan-1 の培養上清をそれぞれ 10 ml ずつ添加し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C にて 24 時間培養した。その後、FACS 解析によって DMEM で 24 時間培養した pLess>EGFP の蛍光強度上位 1% 以上持つ細胞を GFP 陽性細胞と定義し (Figure. 10-A)、DMEM、Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 50 ng / ml を含む DMEM、Capan-1 の培養上清それぞれにて刺激した pCMV>EGFP、pLess>EGFP、pSCD3048>EGFP、pSCD580>EGFP の GFP 陽性細胞数を測定した。

#### IV : 実験結果

##### 1. *in vitro* におけるがん細胞による線維芽細胞内遺伝子発現変化解析

ヒトすい臓がん由来細胞株 Capan-1 はマウスに異種移植すると、ヒトがん組織に類似した間質細胞の多いがん組織を作る。またヒト骨髄由来線維芽細胞株 KM104 はマウスに異種移植した際、がん組織に積極的に取り込まれるので [29, 30]、がん細胞の線維芽細胞への影響を探索するに適した細胞株と考えられた。がん細胞の産生する液性因子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、通常培養下での KM104 の mRNA 発現とヒトすい臓がん由来細胞株 Capan-1 の培養上清を添加した KM104 の mRNA 発現比較を cDNA マイクロアレイ法を用いて 22,284 遺伝子について検索した。その結果培養上清添加前をコントロールとし、Capan-1 の培養上清を添加した KM104 では、191 個の遺伝子の mRNA 発現が 5 倍以上変化していた (Table 2)。それらの候補遺伝子の内、TRANSFAC database 7.0 [32] に実験系によらず、プロモーター解析が行われたと記載されている 13 遺伝子を候補遺伝子とした。この 13 遺伝子全てについて、通常培養下での KM104 の発現を定量的 PCR にて測定した。また、ヒトすい臓がん由来細胞株 Capan-1 の培養上清を添加後 6、12、24 時間後の継時的変化も含めて、KM104 の各遺伝子発現量を定量的 PCR にて測定した。その結果、LDLR (low density lipoprotein receptor)、PSG6 (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6)、G1P3 (interferon, alpha-inducible protein 6)、USF2 (upstream transcription factor 2)、SCD と SQLE

( squalene epoxidase ) 遺伝子の mRNA 発現が Capan-1 の培養上清を添加前と比較し、Capan-1 の培養上清を添加後有意に上昇していた。更に KM104 の SCD、SQLE 遺伝子発現は Capan-1 の培養上清との反応時間と相関して増加した ( Table 3 )。

## 2. SCD の発現変化の普遍性解析

序論でも述べたように線維芽細胞の遺伝子発現パターンは由来の細胞によって多様である[28]。また、血清濃度や細胞接触によって、細胞内遺伝子発現や増殖、走行能などの性質変化することが知られている[33-36]。そこで、以下の実験を行った。

### 2-1 血清による発現変化

Table. 3 で示した Capan-1 の培養上清によって KM104 内で mRNA 発現上昇する遺伝子 SCD、SQLE について血清を含む状態で同様の実験を行った。その結果、血清存在下での KM104 内の SQLE mRNA 量は培養上清添加前をコントロールとし、Capan-1 の培養上清添加 6 時間後にコントロールと比べ約 3 倍になり、それ以降は減少し DMEM 添加時と同等の量に減少した ( Figure 1-B )。一方、血清存在下での KM104 内の SCD mRNA 量は Capan-1 の培養上清添加 6 時間後にコントロールと比べ 5 倍になり、それ以降減少するが DMEM 添加時よりも有意に高い量を保った ( Figure 1-A )。

### 2-2 細胞接触による発現変化

Capan-1 と GFP 発現 KM104 を共培養し、24 時間後 FACS 法を用いて KM104 を分離し、SCD mRNA 遺伝子の発現変化を定量的 PCR にて測定した ( Figure 2-A , B )。

その結果、KM104 単独で培養した時と比較し Capan-1 と共培養した KM104 での SCD mRNA 量は増加した。また、共培養時の KM104 と Capan-1 の細胞数の割合が 3:1 の時に、KM104 の SCD mRNA 量は KM104 単独培養時の 2.5 倍になった。同様に 1:1 の時に 5.3 倍に、1:3 の時に 2.5 倍になった (Figure. 2-B)。

### 2-3 多種のがん細胞株と正常細胞株による発現変化

Capan-1 以外のがん細胞株によっても、SCD の mRNA 量の増加は見られるか、がん細胞特有の反応か、4 種のがん細胞株の培養上清と 4 種の正常細胞株の培養上清を KM104 に添加し 24 時間後の KM104 の SCD mRNA 発現量を定量的 PCR を用いて調べた。コントロールはそれぞれの細胞株の通常培地を KM104 に添加し、24 時間後の KM104 の SCD mRNA 発現量とした。その結果、3 種類のがん細胞株の培養上清添加 24 時間後の KM104 の SCD mRNA 発現量は、コントロールと比較し有意に高かった。一方、4 種類の正常線維芽細胞の培養上清添加 24 時間後の KM104 の SCD mRNA 発現量は、コントロールと比較し有意な差は認められなかった (Figure 3)。

### 2-4 多種の線維芽細胞株の SCD mRNA 発現変化

KM104 以外の由来の異なる線維芽細胞株でも、SCD mRNA 量の増加は見られるのか、Capan-1 の培養上清を 3 種類のヒト由来線維芽細胞株に添加し 24 時間後の 3 種類それぞれのヒト由来線維芽細胞株の SCD mRNA 発現量を定量的 PCR を用いて調べた。コントロールは DMEM をそれぞれのヒト由来線維芽細胞株に添加し、24 時間後のそれぞれのヒト由来線維芽細胞株の SCD mRNA 発現量とした。その結果、Capan-1 の培養上清添加により全

ての線維芽細胞株でコントロールと比較し、SCD mRNA 量の増加は見られた (Figure 4-A)。  
また、5 種類の正常組織由来の初代培養線維芽細胞においても 4 種類で Capan-1 の培養上清添加 24 時間後での SCD mRNA 発現量は DMEM 添加 24 時間後と比較して有意に増加していた (Figure 4-B)。

### 3. CAF と N-CAF 及びマウスモデルにおけるがん間質細胞内 SCD mRNA 発現変化

#### 3-1 CAF と N-CAF における SCD mRNA 発現

がん細胞による形質変化を終えたと考えられる実際の CAF と N-CAF で SCD mRNA 量が異なるか、5 人のがん患者より CAF、N-CAF を単離し、*in vitro* で培養し、SCD mRNA 量を測定した。その結果、4 人の患者由来の CAF の SCD mRNA 発現量は N-CAF の発現量と比べて有意に高かった。また、1 人の患者由来の CAF の SCD mRNA 発現量は N-CAF の発現量と比べて有意な差は認められなかった (Figure 5)。

#### 3-2 がん細胞の培養上清による CAF の SCD mRNA 発現応答

実際のがん組織では CAF はがん細胞による刺激を受け続けている。そこで、*in vitro* でがん細胞の産生する液性因子に対する CAF の SCD mRNA 発現変化を調べるため、Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後の CAF の SCD mRNA 発現量を定量的 PCR にて調べた。コントロールは DMEM 添加 24 時間後の CAF の SCD mRNA 発現量とした。その結果、5 人のがん患者由来 CAF の内 4 種にて Capan-1 の培養上清添加 24 時間後の SCD mRNA 発現量はコントロールと比較し有意に少なかった。残りの 1 種の CAF ではコントロール



と比較し有意な差は見られなかった ( Figure 6-A )。また、Capan-1 の培養上清あるいは DMEM にて KM104 株を刺激し、継代した後、更に Capan-1 の培養上清あるいは DMEM を添加した。その結果、DMEM を添加し継代した後の KM104 では通常培養時と変わらず DMEM 添加時に比べて Capan-1 の培養上清添加時の KM104 の SCD mRNA 量は増加した。しかし、Capan-1 の培養上清を添加し継代した後の KM104 では DMEM 添加時に比べて Capan-1 の培養上清添加時の KM104 の SCD mRNA の増加は見られなかった ( Figure 6-B )。

### 3-3 マウスヒトがん移植モデルにおけるがん間質細胞内 SCD mRNA 発現変化

生体内にてがん細胞による影響を受けている間質細胞の SCD mRNA 量を測定するため、マウスヒトがん移植モデルを構築し ( Figure 7-A )、がん組織、正常皮下組織、マウス SCD mRNA 量の測定に対するポジティブコントロールとしてマウス肝臓組織細胞、ネガティブコントロールとしてヒト線維芽細胞から mRNA を抽出し定量的 PCR を行った。その結果、マウス肝臓組織細胞のマウス SCD mRNA 量が測定され、ヒト線維芽細胞には検出されなかった。そして、がん組織のマウス SCD mRNA 量は正常皮下組織に比べ顕著に少なかった ( Figure 7-B )。

## 4. がん細胞による線維芽細胞内 SCD mRNA 発現の可視化

### 4-1 SCD mRNA 発現の可視化

pCMV>EGFP、pLess>EGFP、pSCD3048>EGFP、pSCD580>EGFP に DMEM、TGF- $\beta$  50 ng/ml を含む DMEM、Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後、蛍光顕微鏡を用いて EGFP の発現を観

察した。その結果、pLESS>EGFP ではほとんど蛍光が観察されなかったのに対し、pCMV>EGFP では多くの細胞で観察できた。TGF- $\beta$  50 ng / ml を含む DMEM を添加 24 時間後の pSCD580>EGFP は DMEM を添加 24 時間後と比較し多くの蛍光が観察された。一方、Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後の pSCD580>EGFP は DMEM 添加時と比べ蛍光量の差は見られなかった。また、TGF- $\beta$  50 ng / ml を含む DMEM あるいは Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後の pSCD>3048 は DMEM を添加 24 時間後と比較し多くの蛍光が観察された ( Figure. 9-A )。また、 Capan-1 の培養上清を pSCD>3048 に添加 6、12、24 時間後の蛍光量は時間依存的に増加した ( Figure. 9-B )。

#### 4-2 SCD mRNA 発現の可視化の定量化

蛍光顕微鏡を用いて観察された pCMV>EGFP、pLess>EGFP、pSCD3048>EGFP、pSCD580>EGFP に DMEM、TGF- $\beta$  50 ng / ml を含む DMEM、Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後の GFP 陽性細胞数を FACS を用いて定量化した ( Figure. 10-A )。その結果、pCMV>EGFP と pLess>EGFP に TGF- $\beta$  50 ng / ml を含む DMEM あるいは Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後は DMEM を添加 24 時間後と比較して有意な差は認められなかった。また、Capan-1 の培養上清を添加 24 時間後の pSCD580>EGFP の GFP 陽性細胞数は DMEM 添加時と比較し有意な差は見られなかった。一方、TGF- $\beta$  50 ng / ml を含む DMEM を添加 24 時間後の pSCD580>EGFP の GFP 陽性細胞数は DMEM を添加 24 時間後の GFP 陽性細胞数と比較し 2 倍だった。TGF- $\beta$  50 ng / ml を含む DMEM を添加 24 時間後の pSCD>3048 の GFP 陽性細胞数は DMEM を添加 24 時間後と比較し 2.7 倍観察された。また、Capan-1 の培養上清

を添加 24 時間後の pSCD>3048 の GFP 陽性細胞数は DMEM を添加 24 時間後と比較し  
1.8 倍観察された (Figure. 10-B)。

## V : 考察

### がん細胞培養上清により線維芽細胞の SCD 遺伝子発現増加は誘導される

本研究の cDNA マイクロアレイと定量的 PCR を用いた実験結果 ( Table 2 , Figure 1-A ) より、Capan-1 の培養上清による刺激によって正常線維芽細胞で発現が亢進する遺伝子 SCD 、SQLE を明らかにした。

また、Capan-1 と KM104 を 1 : 1 の割合で血清を含む倍地で共培養し、24 時間後の KM104 の SCD mRNA 発現量は線維芽細胞単独での培養時に比べ 5.3 倍だった ( Figure 2-B )。共培養の実験系における Capan-1 の割合を増やし、同様の実験を行っても、KM104 の SCD mRNA 発現量は線維芽細胞単独での培養時に比べ有意に高かった ( Figure 2-B )。また、この SCD 遺伝子の発現上昇は Capan-1 の培養上清中の血清の有無によらず、Capan-1 の培養上清によって惹起されたことより ( Figure 1 )、生体内の様々な環境で SCD 遺伝子の発現ががん細胞の産生する液性因子によって調節される可能性を示唆している。

線維芽細胞はその由来組織によって遺伝子発現パターンが異なることが知られているが [28]、今回の検討においては Capan-1 の培養上清による SCD mRNA の発現増加は検討した線維芽細胞株いずれにおいても共通であり、初代培養の線維芽細胞でも同様だった ( Figure 4-A, B )。このことより、がん細胞の産生する液性因子による SCD 遺伝子の発現変化は線維芽細胞共通であることが示唆された。

また、線維芽細胞の SCD 遺伝子の発現増加は正常細胞の培養上清では惹起されないが、4 種類のがん細胞株の内 3 種類がん細胞株の培養上清により惹起された ( Figure 3 )。これらのことより、SCD 遺伝子の発現増加は正常細胞の産生しないがん細胞の産生する液性因子によって惹起されることが明らかとなった。またがん細胞の産生する液性因子による SCD 遺伝子の発現変化は線維芽細胞共通であると考えられるので、多くのがん組織で共通にがん細胞の産生する液性因子による線維芽細胞の SCD 遺伝子の発現変化が起こっていると考えられる。

今回検討したがん細胞株の内、BxPC-3 の培養上清のみ線維芽細胞の SCD 遺伝子の発現を亢進しなかった ( Figure 3 )。これは、BxPC-3 をマウスに異種移植すると、今回検討した他のがん細胞株に比べ間質形成の乏しいがん組織を作ることが知られており、BxPC-3 の間質細胞に与える影響は低いと考えられた。またこれらのことから SCD 遺伝子の発現変化は、がん細胞による CAF 化の第一段階であると考えられる「がん細胞の産生する液性因子による間質細胞の発現変化」の *in vitro* における指標になり得ると考えた。また、がん患者より単離した N-CAF と CAF の SCDmRNA 発現量を比較し、CAF の発現が N-CAF より高いこと ( Figure 5 ) より、線維芽細胞の SCD mRNA 量増加はヒトがん組織においても、がん細胞による線維芽細胞の形質変化の指標になり得ると考えられた。

CAF 化に伴いがん細胞培養上清に対する遺伝子発現応答が変化する

がん患者由来の N-CAF は Capan-1 の培養上清によって SCD mRNA 発現が亢進されるが、CAF は Capan-1 の培養上清によって SCD mRNA 発現が抑制される ( Figure 4-B, 6-A )。このことは、CAF 化に伴いがん細胞の培養上清に対する線維芽細胞の遺伝子発現応答が変化する可能性を示している。また、この CAF 化に伴うがん細胞培養上清に対する遺伝子発現応答変化は、マウスヒトがん移植モデルにおいてがん間質細胞中の SCD mRNA 発現が正常皮下組織に比べ顕著に少なかった結果 ( Figure 7-B ) においても矛盾しないと考える。すなわち、N-CAF はがん細胞の産生する液性因子により SCD mRNA 発現亢進を起こすが、完全に CAF 化するとがん細胞の産生する液性因子により SCD mRNA 発現は低下すると考えられた。

KM104 と Capan-1 を 3 : 1 、 1 : 1 、 1 : 3 の細胞数割合で共培養すると、1 : 1 の割合での共培養時に KM104 の SCD mRNA 量は KM104 単独培養時の 5.3 倍となり、3 : 1 、 1 : 3 の割合で共培養した時よりも多かった ( Figure 2-B )。これはがん細胞と線維芽細胞を共培養することにより惹起される線維芽細胞の SCD mRNA 量増加に最適ながん細胞数と線維芽細胞数の割合が存在することを示す。

一方、がん細胞培養上清に対する線維芽細胞の SCD 発現現象という応答変化は生体内において CAF 化された細胞のみならず *in vitro* においても、線維芽細胞に Capan-1 培養上清を長期間添加することによっても引き起こされた ( Figure 6-B )。このことより、がん細胞の培養上清を長期間添加された N-CAF が経代後にも CAF と同様な SCD 発現応答変化を起こしたことは、*in vitro* においてがん細胞培養上清による線維芽細胞の形質変化誘

導を初めて示したと考えられる。今後、本モデルは *in vitro* の CAF 化機構の解明に応用できると考えられる。

### がん間質細胞における SCD 発現変化の意義

SCD は鉄を含む不飽和化酵素で、不飽和脂肪酸の合成の律速段階を触媒する。主に炭素数 18 の直鎖飽和脂肪酸であるステアリン酸をオレイン酸に不飽和化する[37]。ステアリン酸とオレイン酸の比は細胞膜の流動性とシグナル伝達への影響を介して細胞増殖と分化に寄与することが知られている[38-39]。特に脂肪分化の際には必須の遺伝子である[40]。

そして、脂肪酸代謝の多くの転写を調節している SREBP (sterol regulatory element binding protein) によって転写調節されている[41]。興味深いことにこの SREBP mRNA 発現もがん細胞の培養上清によって線維芽細胞内にて惹起され、SCD 遺伝子以外の SREBP によって発現制御される多くの遺伝子も cDNA マイクロアレイによる解析結果中に候補遺伝子と挙げられた (Table. 2)。これらの結果はがん細胞により線維芽細胞の脂肪酸代謝が促進されることを示唆する。

SCD の生体内での働きは代謝に関わる酵素として研究が進められてきた。特に *SCD* ノックアウトマウスの痩せるという表現型により、SCD は現在医療用医薬品の売り上げの上位を占める糖尿病治療薬のよい標的と考えられた。その SCD が代謝に関わる機構についても研究が行われ、AMPK シグナルを介すること、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体を介さないこと、またノックアウトマウスを用いて SCD がレプチンの代謝反応に寄与することが

明らかにされてきた[42-44]。このように SCD について多くの研究がなされてきたが、がんとの関連としては、SCD が多くの前立腺がん患者の正常前立腺組織では認められたが、がん細胞ではしばしば認められなかった[45]という報告だけであり、明らかながん細胞と SCD 発現の関係性は見つかっていない。がん間質細胞における発現について言及した知見は全くなく、今回の報告は CAF と SCD 遺伝子の発現の関係性について初めて言及したものである。

今回、がん間質細胞における SCD の機能を明らかにすることはできなかった。これまでに不死化した線維芽細胞の SCD 遺伝子をノックダウンすると細胞内オレイン酸の減少、コレステロールの減少、増殖能の低下、足場非依存成長低下、アポトーシスの昂進することが知られていたが[46]、今回がん細胞の培養上清を添加しても線維芽細胞の明らかな増殖の差は見られなかった。先にも述べたように、SCD の発現は脂肪酸の不飽和化を介して細胞の分化能に寄与するので、増殖能ではなくがん細胞による周囲線維芽細胞の影響として分化能を変化させることによりがん細胞はがん微小環境の構築に有利に進めていると考えられる。今後は間質線維芽細胞の分化能に着目し解析していくことで SCD のがん間質細胞における役割が明らかになると考えられる。

#### がん細胞による線維芽細胞の発現変化を可視化

CMV (*Cytomegalovirus*) は、ヒトに感染する通常無害のウイルスであり、CMV プロモーターは哺乳動物細胞内で遺伝子の構成的な発現を行う。pCMV>EGFP 細胞では TGF- $\beta$  によ



って陽性細胞率が変化しないにもかかわらず、pSCD580>EGFP では TGF- $\beta$  によって増加した (Figure 9, 10)。SCD 遺伝子の転写開始点より上流 580 base は TGF- $\beta$  によって制御されることが知られており [47]、この実験系で GFP 陽性細胞数は SCD 発現を反映しているといえる。

この実験系において、pCMV>EGFP 細胞では TGF- $\beta$ 、Capan-1 の培養上清によって陽性細胞率が変化しないにもかかわらず、pSCD3048>EGFP では TGF- $\beta$ 、Capan-1 の培養上清ともに増加した。このことは、がん細胞による線維芽細胞の発現変化を可視化できたことを示す。また、pSCD580>EGFP では Capan-1 の培養上清によって GFP 陽性細胞数が変化しないにもかかわらず pSCD3048>EGFP では増加したことより、SCD 遺伝子の転写開始点より上流 580 ~ 3048 base に TGF- $\beta$  以外の Capan-1 の培養上清中の成分によって反応する配列があると考えられる。

SCD の発現は多くの因子によって制御されている。多価不飽和脂肪酸 [48] やコレステロール [49]、TGF、PDGF [47]、脂肪細胞においてはグルコース [50]、insulin と tumor necrosis factor alpha [51]、網膜色素上皮細胞においてはレチノイン酸 [52] などである。本研究では SCD 遺伝子の発現を制御する TGF- $\beta$  以外の Capan-1 の培養上清中成分を明らかにすることはできなかった。今後、SCD の発現を増加させた Capan-1、PC3、A549 の培養上清中成分と発現を惹起しない BxPC-3 あるいは正常細胞株の培養上清中の成分の差を解析することで明らかにできると考えられる。

今回、遺伝子の上流配列を EGFP 遺伝子の上流につなげただけでがん細胞による影響を可視化できた。通常、ウイルスプロモーターはその単純さゆえに哺乳動物のプロモーターより強力で、それゆえに発現ベクターのプロモーターとしてよく用いられる。今回作製した pSCD3048>SCD は通常状態では蛍光を発せず、がん細胞の培養上清によって CMV プロモーターを持つ pCMV>EGFP と比較できるほど蛍光を発するようになる。このことはがん細胞による線維芽細胞内の遺伝子発現応答を可視化する際に SCD 遺伝子の転写開始点より上流 3048 base が有用であることを意味する。

#### 臨床応用

多くのがん細胞の培養上清によって SCD 遺伝子の発現は惹起されるが、正常細胞によっては惹起されない (Figure 3) ことは、がん診断の臨床応用を考えた時に非常に大きなメリットとなる。例えば、診断者血清を線維芽細胞に反応させ、SCD 発現変化を調べることによりがん患者のスクリーニングができる可能性がある。現在、がん診断に用いられている手法は PET (positron emission tomography) や MRI (magnetic resonance imaging) などのコンピューター断層撮影技術を用いた画像診断と血中腫瘍マーカーである。しかし、血中腫瘍マーカーはがんの種類が決定され、初めて利用できる。線維芽細胞の診察者血清に対する細胞内遺伝子発現応答を観察すれば、診察者ががん細胞を保持しているかどうかを診断できる可能性がある。

## 今後の研究課題

Capan-1 の培養上清を添加しただけでがん細胞の培養上清に対する線維芽細胞内 SCD 遺伝子発現応答が変化することを明らかにしたが、SCD 遺伝子をノックダウンしその機能を明らかにしたい。また今後、線維芽細胞内 SCD 遺伝子の発現を増加させた Capan-1、PC3、A549 の培養上清中成分と発現を惹起しない BxPC-3 あるいは正常細胞株の培養上清中成分の差を解析することで、SCD 発現を促進する液性因子を明らかにできると考えられる。

今回、可視化に成功した線維芽細胞のベクター導入効率は 50 % であり、今後クローン化を行うことでより鮮明に可視化できるようにすることが望まれる。このことによって、先に述べたがん細胞によって線維芽細胞内の SCD 発現が一時的に上昇し、その後抑制されるようになるといった経時的変化が観察できるかもしれない。その後、Dorsal skinfold chamber [53] などを用いて生体内におけるにおけるがん組織に動員される線維芽細胞中の SCD 遺伝子の発現変化を可視化したい。また、がん組織の進展に CAF が寄与していると考えられており、CAF 化の機構解明によってがん進展の抑制法の開発を行いたい。

## SUMMARY

Several lines of investigation suggest that development and progression of tumors is not only dependent on cancer cells themselves but also on the active contribution of the stromal cells. Tumour stroma is composed of three main categories, new blood vessels, inflammatory cells and fibrous tissue. Fibroblasts often constitute the majority of the stromal cells within many carcinomas. Stromal fibroblast from malignant tumors ( CAF ; Cancer Associated Fibroblast ) was found phenotypically different from fibroblasts of normal tissue origin. We previously reported that normal fibroblasts was recruited to tumor tissue. However, when and where fibroblsts transform by carcinoma cells since mobilization is unknown. The visualization of transformation is effective method to investigate spatiotemporal response. Apparent increased expression was hypothesized to be enable transformation to visualize.

In this study, we found that the expression of SCD ( stearyl-CoA desaturase ) gene was increased in fibroblasts when cultured with condition media of human carcinoma cell, while those of normal cell lines didn't change its expression level. Furthermore, *SCD* was expressed in primary cultured CAFs established from human lung carcinomas more significantly than primary normal lung fibroblasts derived from the same patients. These results suggest that the expression of *SCD* and its chronological change

in the CAFs are results of the transformation of fibroblasts into CAFs by culture media of cancer cells or direct contact with cancer cells. We then cloned a human SCD promoter and generated a new p(-3348/-150)*SCD*-EGFP construct. By introduction of this construct into a human fibroblasts, carcinoma-induced upregulation of SCD expression could be visualized in fibroblasts *in vitro*. The present results open the possibility of visualization of cancer stromal fibroblast reaction both *in vitro* and *in vivo*. This visualization of stromal reaction may contribute to the clarification of the mechanism of formation of CAFs.

## 謝辞

本研究に従事する機会を与えて頂き、また本研究の立案、実施、発表に関し御指導、ご鞭撻を賜りました国立がんセンター臨床腫瘍病理部部長兼東京大学大学院新領域創成科学研究科がん先端生命科学分野教授落合淳志博士に感謝いたします。

細部にわたり実験の御指導をいただきました同センター臨床腫瘍病理部の皆様には深く感謝しています。また、国立がんセンター研究所分子腫瘍学部の佐々木博己博士並びに青柳一彦博士に cDNA マイクロチップを用いた発現解析に協力していただいたことに感謝します。

また、pEGFP-1 を譲渡して頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科資源制御学分野准教授青木不学博士に感謝いたします。

図表

Table 1-1

プライマーセット ( 発現解析 )

遺伝子名	プライマー名	配列	増幅産物 ( bp )
E2F1	E2F1-F	5' ACCATCAGTACCTGGCCGAGAG	121
	E2F1-R	5' TTGGTGGTCAGATTCAGTGAGGTC	
LDLR	LDLR-F	5' CAAACCCTGGTTGCTGTATTTGTTC	126
	LDLR-R	5' AGCGTTGCACACACAGTCCAGTTC	
CTSD	CTSD-F	5' CAGAAGCTGGTGGACCAGAACA	136
	CTSD-R	5' GGGTGACATTCAGGTAGGACAGAGA	
PSG6	PSG-F	5' TGACCCAGTCACCCTGAATCTC	136
	PSG-R	5' CCAAATGTAGGTGTAGTTCCGACTC	
ATF3	ATF3-F	5' GCCATCCAGAACAAGCACCTC	179
	ATF3-R	5' TTCTTGTTTCGGCACTTTGCAG	
G1P3	G1P3-F	5' AGCTGGTCTGCGATCCTGAA	122
	G1P3-R	5' TAGCCCATCATTTCAACAA	
USF2	USF2-F	5' CGACTTCGCCTACAGCGAGCA	199
	USF2-R	5' CAGGTACTTCAGGGCCTTGCTTA	
SQLE	SQLE-F	5' AACTCCATGCTCCACTGACTGTTG	196
	SQLE-R	5' CTGGATGAAATCCGGTAGATGAGAA	
OAZ2	OAZ2-F	5' GATGGATTATTAGCTGATGGGAGCA	173
	OAZ2-R	5' TGGCCTGGACGTACAATCTCAA	
SEPX1	SEPX1-F	5' CAGCAGCTCGCTGAAGTTTGTC	125
	SEPX1-R	5' AGGTGGAATGGCCAACGTG	
SCD	SCD-F	5' TGTGTCCCAGATGCTGTCATTAGTC	121
	SCD-R	5' CGTGGCAATGCGTTGTTTATGTA	
AP1M2	AP1M2-F	5' TGGCCAACGGTGTGGAGATA	165
	AP1M2-R	5' CAAAGTGGGCTCGCATCAAGTA	
INSIG1	INSIG-F	5' GCAGTGGCGTGTTTACATGGTC	137
	INSIG-R	5' TATCGCAGTGTGGGAACCAAGA	
GAPDH	GAPDH-F	5' AGGGCTGGTTTTAACTCTGGT	200
	GAPDH-R	5' CCCCACTTGATTTTGGAGGGA	
Scd1	Scd1-F	5' TCTTGTCCTATAGCCCAATCCAG	130
	Scd1-R	5' AGCTCAGAGCGCGTGTTCAA	
Gapdh	Gapdh-F	5' AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	108
	Gapdh-R	5' TGAAGGGGTCGTTGATGG	

Table 1-2

## プライマーセット ( クローニング用 )

プライマー名	配列	反応条件
proSCD3077-F	5' ACCAGGCCAGCTAAGTTT	98 °C 10 sec , 66 °C 3min . , 30 cycles
proSCD-R	5' CCGCGGTGCGTGGAGGTCCCG	
proSCD608-F	5' GGTTCACTGTTTCCTGAGA	98 °C 10 sec , 73.2 °C 50 sec . , 30 cycle
proSCD-R	5' CCGCGGTGCGTGGAGGTCCCG	
Xho1-proSCD3077-F	5' CCGCTCGAGACCAGGCCAGCTAAGTTT	94°C 1min /
Hind3-proSCD-R	5' CCAAGCTTCCGCGGTGCGTGGAGGTCCCG	98 °C 10 sec , 66 °C 3 min . , 4 cycles /
		98 °C 10 sec , 73.2 °C 3min . , 29 cycles
Xho1-proSCD608-F	5' CCGCTCGAGGGTTCACCACTGTTTCCTGAGA	94°C 1min /
Hind3-proSCD-R	5' CCAAGCTTCCGCGGTGCGTGGAGGTCCCG	98 °C 10 sec , 64 °C 50 sec . , 4 cycles /
		98 °C 10 sec , 64.4 °C 3min . , 29 cycles



Table 2

cDNA マイクロアレイを用いたがん細胞による線維芽細胞内遺伝子発現変化

遺伝子名		変化量 (倍)							
HLA-G	3632	PCTK1	1482	LPIN1	1223	TNFRSF6B	1006	SGT	645
SCD	2807	ACAA2	1474	NAGA	1223	SEMA4C	1005	DIAPH1	634.2
OSZ2	2807	RIPK2	1450	RECK	1215	KLF12	1004	SBF1	625.1
SEPX1	2804	UBE2H	1448	UK114	1210	MRS3/4	1001	MVD	622.5
TREX1	2676	EXO70	1443	PAK4	1198	TFIP11	1000	ANXA10	605.3
AP1M2	2662	TDP1	1441	TM4SF1	1182	TURGCP	987.4	ARNTL2	604.2
MRPL24	2302	IGFBP&	1437	OSTF1	1175	OGCH	969.3	CHP	598.3
KIAA0676	2134	LGN	1411	STAT1	1148	KIAA0157	952.5	ANXA10	596
C20orf116	2123	KIAA0376	1405	KIAA1089	1138	KIAA0419	935.4	PHC1	585.4
TXN2	2090	NLI-IF	1405	RGL	1127	ACYP2	920.6	CDKN2D	576.1
MGC4504	2029	PLEK2	1405	FLJ20421	1103	ELJ22195	910.3	G1P3	559.9
HRIHFB2122	1995	FLJ20151	1402	FLJ20530	1094	KIAA0872	904.4	GABARAPL1	556.8
FUS1	1971	ADAM17	1396	KIAA1609	1088	DKFZP	901.6	POLG	552.3
MVP	1943	LDLR	1393	RBM9	1078	UPLC1	879.1	ID1	543.2
ELOVL1	1930	PDGFRB	1385	HMGCL	1075	PSG6	868	HOOK2	526.8
MGC5178	1917	FLJ10307	1378	COPEB	1075	MPP1	865.4	DSIPI	512.4
UBAP2	1915	KIAA0356	1375	TNFAIP1	1073	PDPK1	855.1	DXYS155E	500.7
EBP	1911	SQLE	1374	LOC56902	1068	R32184	851.3	PPP2R3A	481.4
THOC1	1892	LCE	1372	TRIM38	1055	SFRS8	846.6	NCOR1	467.1
MGC15523	1842	FLJ14251	1366	MVK	1053	MYT1	842.8	KIAA0268	430.4
NPAT	1821	USF2	1356	GCS1	1046	GABARAP	840.5	MNT	421.8
FLJ22246	1775	PAI-RBP1	1354	FLJ30002	1045	PDCD11	817.7	BTF	398.5
OFD1	1697	SPEC1	1352	HPIP	1044	DKFZ	803.1	PKIG	372.5
CASP9	1649	WWOX	1342	SOX9	1042	FLJ20093	798.8	FLJ22301	363.2
FLJ10385	1640	GTSE1	1318	SREBF1	1039	EGFR-RS	795.4	SAT	357.9
PIN1	1633	PCDHGC3	1317	UGCGL1	1039	MAGEA3	784.6	MKKS	328.9
ASB1	1624	LSS	1304	C20orf19	1037	DIO2	779	ADCY3	306.4
MRIP2	1601	LAMB3	1299	FLJ232333	1028	THOC2	776.1	THTPA	267.6
KIAA0191	1587	TM4SF6	1295	SQLV	1027	PRO2389	762.4	SLC2A3	26.4
SLC39A1	1584	PPP5C	1282	DKFZ	1024	MXD4	756.6	FLJ10751	24.4
CHMP1.5	1551	EPHB2	1275	MGC4737	1024	DKFZp434N	745.1	Rab11-FIP	11
C1R	1546	RIP60	1275	TEAD1	1016	KIAA1467	728.5	DNAJB2	9.6
SON	1543	CPSF4	1258	MADD	1015	MX1	723.7	INSIG1	8.2
CPSF1	1540	FLJ12270	1254	HAN11	1012	P45ORAI-2	710.5	PK428	6.3
HNRPL	1539	FLJ10043	1251	MGC3265	1012	KIAA0419	706.7	SC4MOL	5.2
E2F1	1518	TFCP2	1249	ATPAF2	1011	DKFZp434N	697.3		
ABI-2	1505	NLI-IF	1230	ING4	1009	FLJ12610	680		
FASTK1	1500	HRH1	1227	SLC7A6	1007	AP2A2	672.2		
PCBP4	1494	QPRT	1224	MGC3165	1006	SCRIB	654.9		

KM104 に Capan-1 の培養上清を添加前後での KM104 の遺伝子発現量変化を cDNA マイクロアレイにて探索した。ここには 5 倍以上の変化を示した遺伝子の遺伝子名と mRNA 発現変化量を記載している。

Table 3

候補遺伝子 mRNA の経時的な発現変化量

遺伝子名	経時的発現変化量 (倍)		
	6 時間後	12 時間後	24 時間後
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

KM104 に Capan-1 の培養上清を添加 6、12、24 時間後の KM104 の遺伝子発現変化量を定量的 PCR にて測定した。値は培養上清添加前に対する比で少なくとも 3 回以上の実験の平均値であり、試験値と有意差は t-検定を用いて培養上清添加前の発現量と比較し定義した (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )。

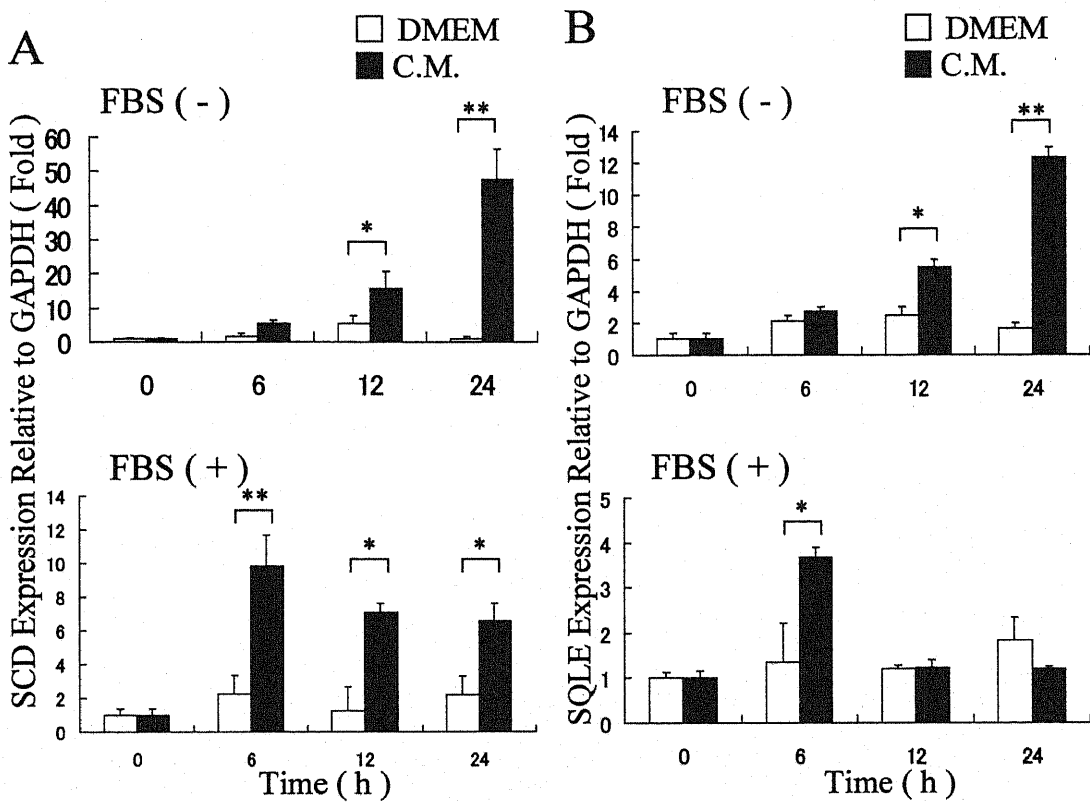


Figure 1

**血清状態によるがん細胞-線維芽細胞応答の変化**

Capan-1 の培養上清、DMEM を KM104 に添加し、その 0、6、12、24 時間後の KM104 の SCD, SQLE mRNA 発現量を血清の有無状態で定量的 PCR にて測定した。

A. SCD mRNA 発現量変化。上段が血清のない状態、下段が血清のある状態 (C.M.; Capan-1 の培養上清)。

B. SQLE mRNA 発現量変化。上段が血清のない状態、下段が血清のある状態。

各実験の n 数は 6 であり、エラーバーは標準偏差を示す。試験値と有意差は両側 t-検定によって DMEM 培地添加後の発現量と比較し定義した (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )。

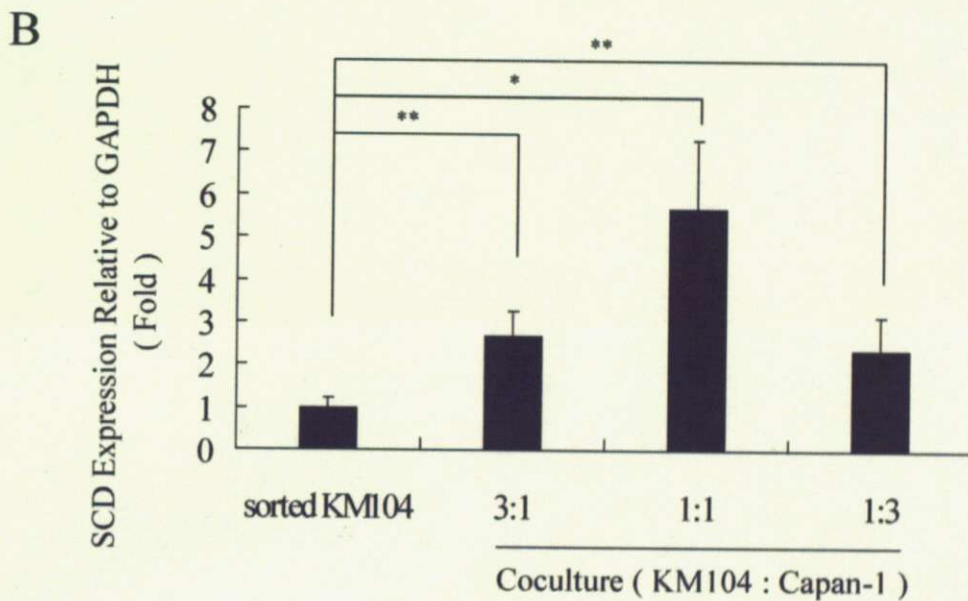
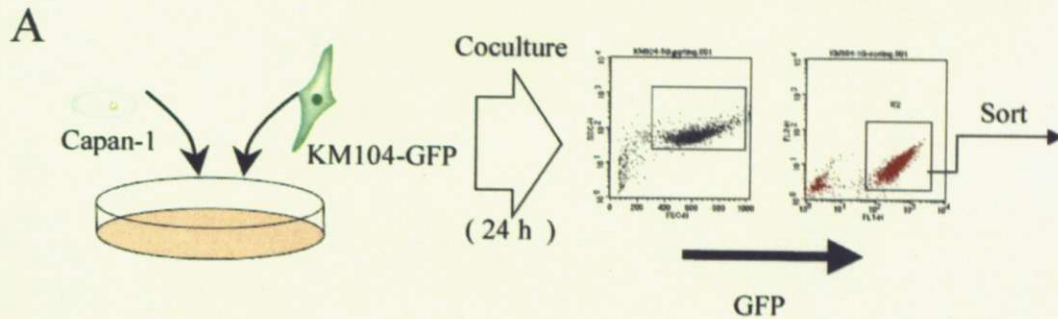


Figure 2

がん細胞と線維芽細胞の共培養による影響

A. 共培養モデル；GFP 陽性に遺伝子改変した KM104 と Capan-1 を共培養し、FACS を用いて GFP 陽性細胞を選別し、その mRNA 量を定量的 PCR を用いて測定した。

B. Capan-1 と共培養した KM104 内 SCD mRNA 発現量。X 軸の数字は共培養時の KM104 と Capan-1 の細胞数比を示す。

各実験の n 数は 6 であり、エラーバーは標準偏差を示す。有意差は t-検定によってコントロールの FACS 処理後の KM104 内の発現量と比較した (\* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ )。

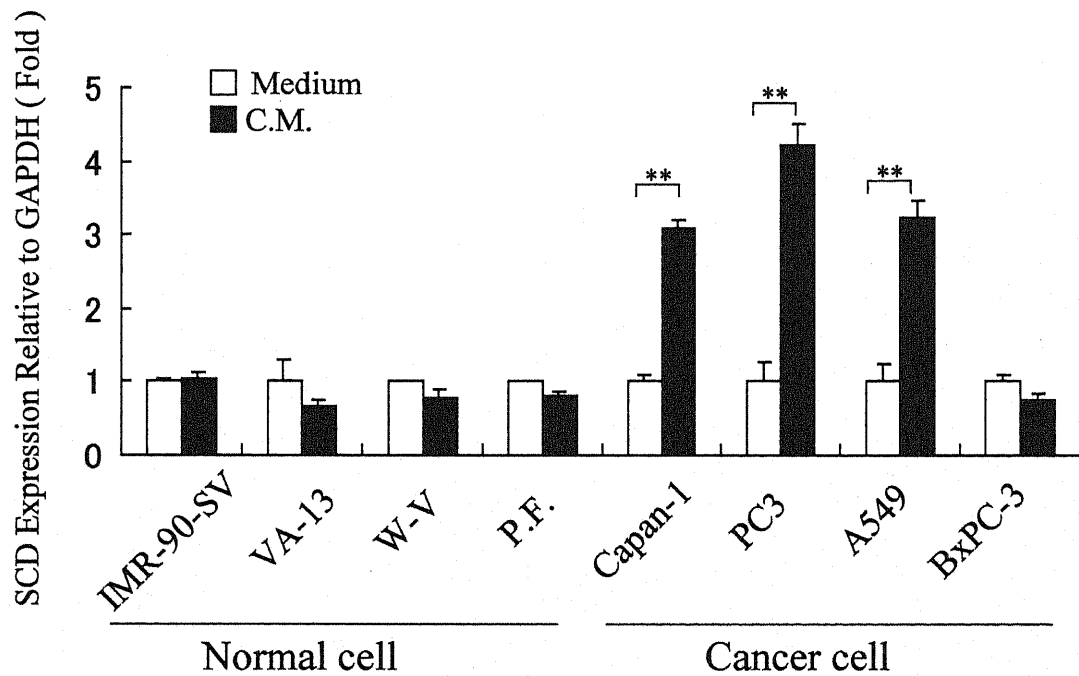


Figure 3

正常細胞とがん細胞の培養上清による KM104 内 SCD mRNA 発現量変化

各細胞の培養培地と、正常細胞 4 種、がん細胞 4 種類の培養上清添加後 24 時間後の KM104 の SCD mRNA 発現量 (P.F.; 初代培養細胞)

各実験の n 数は 6 であり、エラーバーは標準偏差を示す。試験値と有意差は両側 t-検定によって各細胞種の培養培地添加後の発現量と比較し定義した (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )。

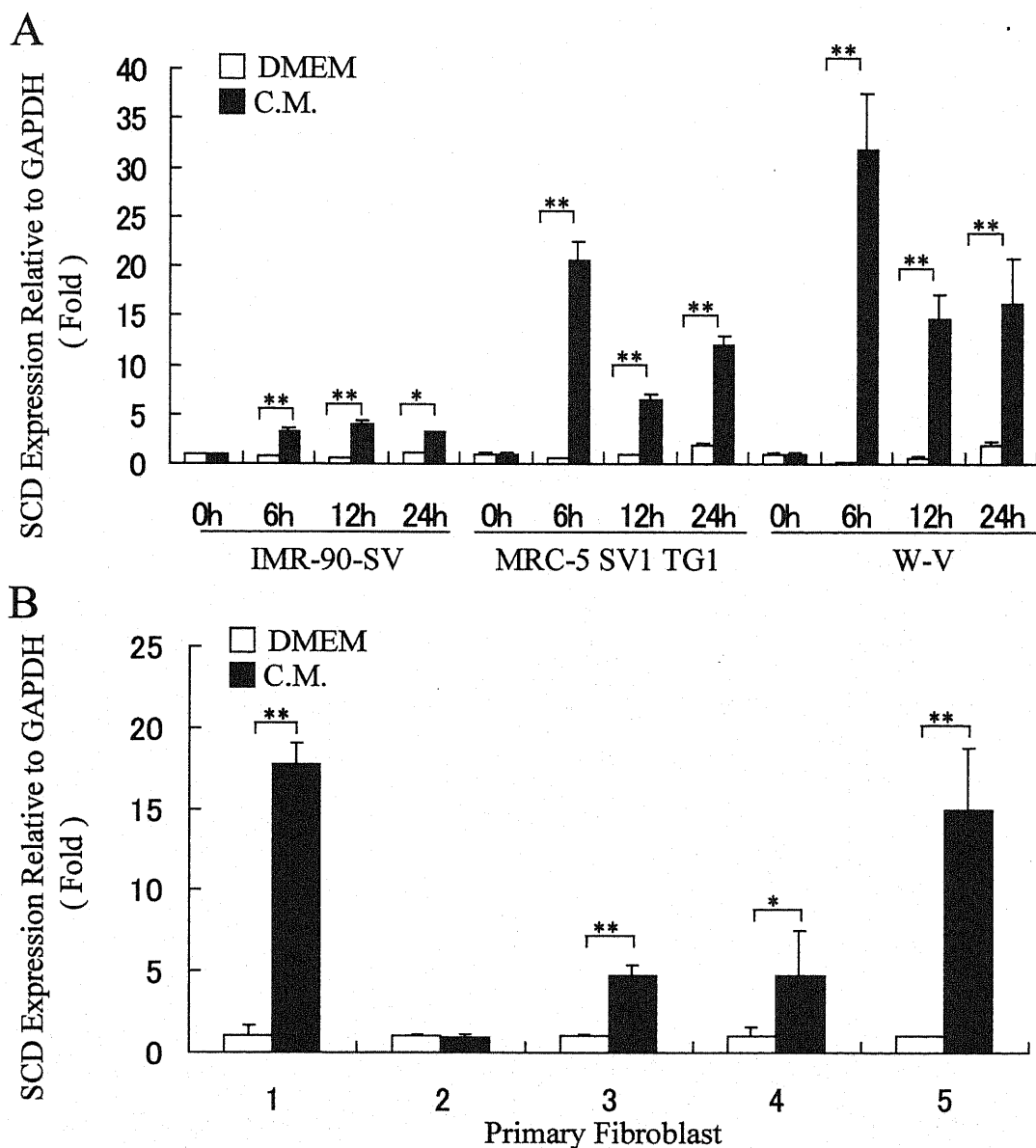


Figure 4

細胞種による線維芽細胞の SCD mRNA 発現量変化

A. 3 種類の線維芽細胞に Capan-1 の培養上清、DMEM を添加 0、6、12、24 時間後の線維芽細胞の SCD mRNA 発現量 (C.M.; Capan-1 の培養上清)

B. 作製した 5 種類の初代培養細胞に Capan-1 の培養上清、DMEM を添加 24 時間後の初代培養細胞の SCD mRNA の発現量

各実験の n 数は 6 であり、エラーバーは標準偏差を示す。試験値と有意差は両側 t-検定によって DMEM 添加後の発現量と比較し定義した (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )。

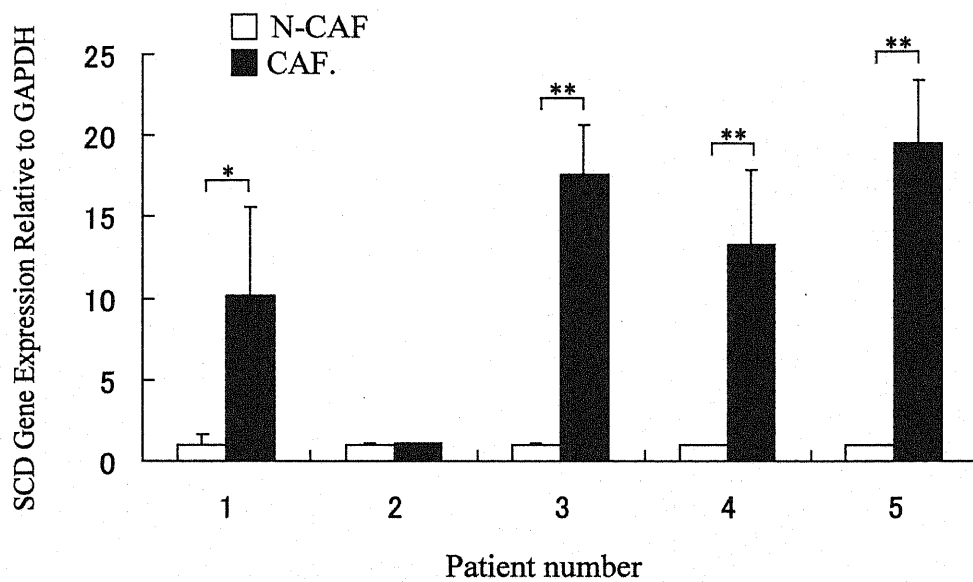
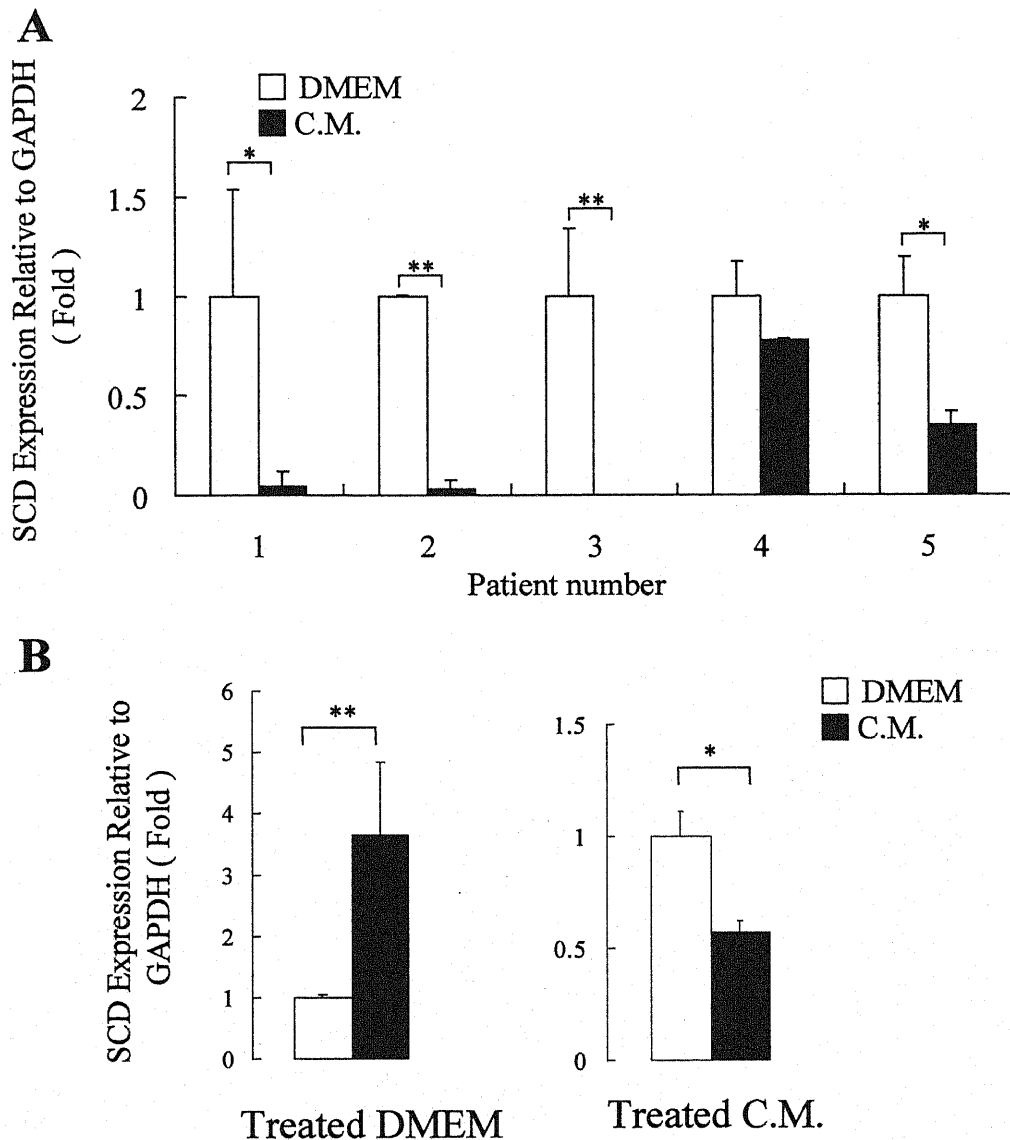


Figure 5

**CAF、N-CAF の SCD mRNA 発現量**

5人のがん患者由来のN-CAF、CAFそれぞれのSCD mRNA発現量  
 各実験のn数は3であり、エラーバーは標準偏差を示す。試験値と  
 有意差は両側t-検定によって同一患者由来のCAFとN-CAFの  
 SCD mRNA発現量を比較し定義した(\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )。



**Figure 6**

**CAF 化に伴う線維芽細胞のがん細胞培養上清応答変化**

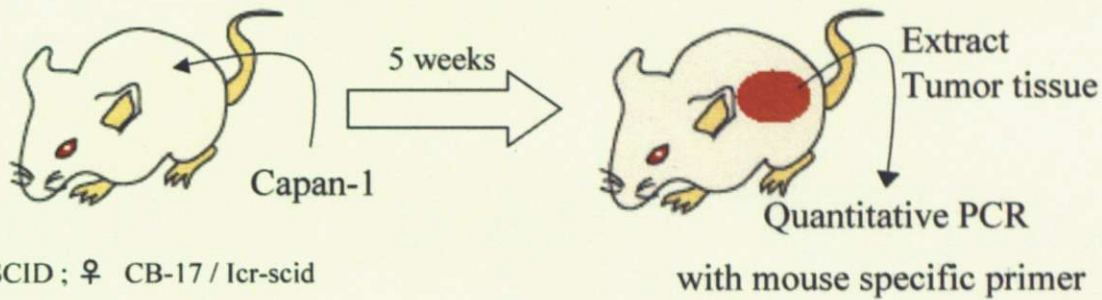
A. 5 人のがん患者由来の CAF に DMEM または Capan-1 の培養上清を添加し 24 時間後それぞれの SCD mRNA の発現量 ( C.M. ; Capan-1 の培養上清 )

B. DMEM または Capan-1 の培養上清を KM104 に添加し、継代後再び DMEM または Capan-1 の培養上清を KM104 に添加し 24 時間後の KM104 の SCD mRNA の発現量

各実験の n 数は 6 であり、エラーバーは標準偏差を示す。試験値と有意差は両側 t- 検定によって DMEM 添加後の発現量と比較し定義した ( \* ;  $p < 0.05$  , \*\* ;  $p < 0.01$  )。



A



B

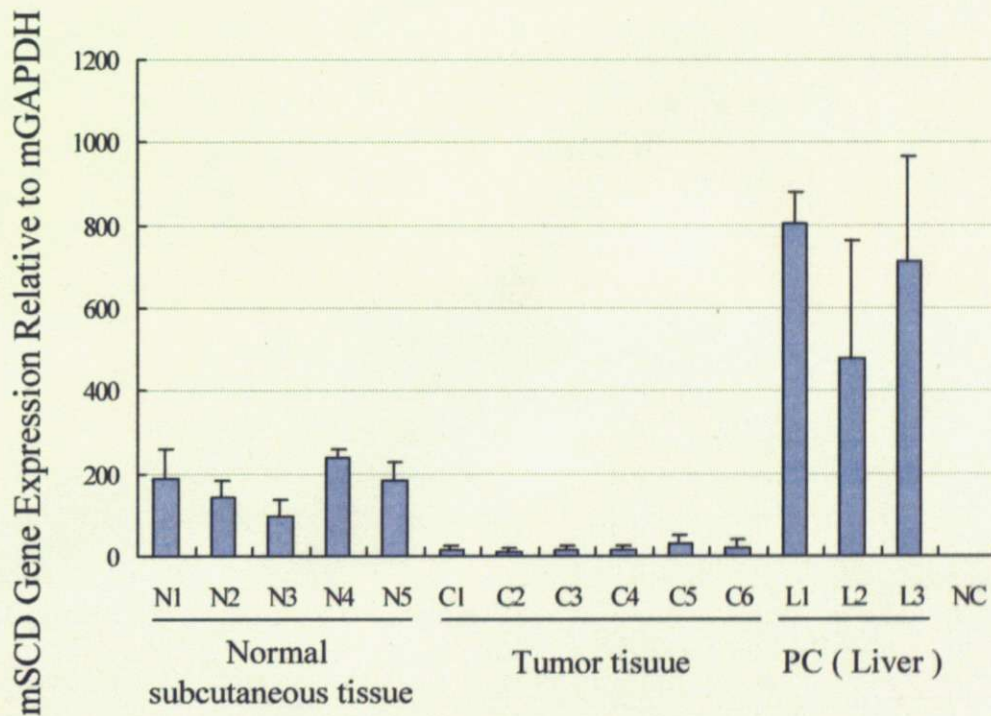


Figure 7

**マウスヒトがん移植モデルでの SCD mRNA 発現量**

A. マウスヒトがん移植モデル ; Capan-1 を実験方法に即して異種移植し、5 週間後にがん組織を解剖によって取り出し、マウス特異的プライマーを用いて定量的 PCR を行った。

B. 偽手術したマウスの皮下組織、肝臓 (PC ; ポジティブコントロール)、モデルマウスより摘出したがん組織あるいはヒト線維芽細胞 (NC ; ネガティブコントロール) の SCD mRNA 発現量。各実験の n 数は 3 であり、エラーバーは標準偏差を示す。

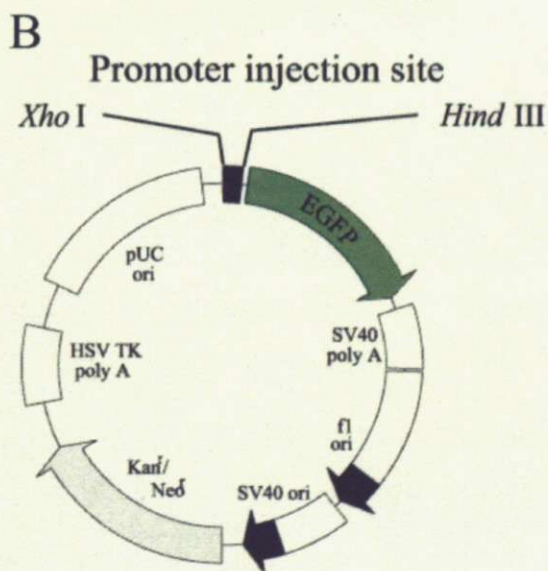
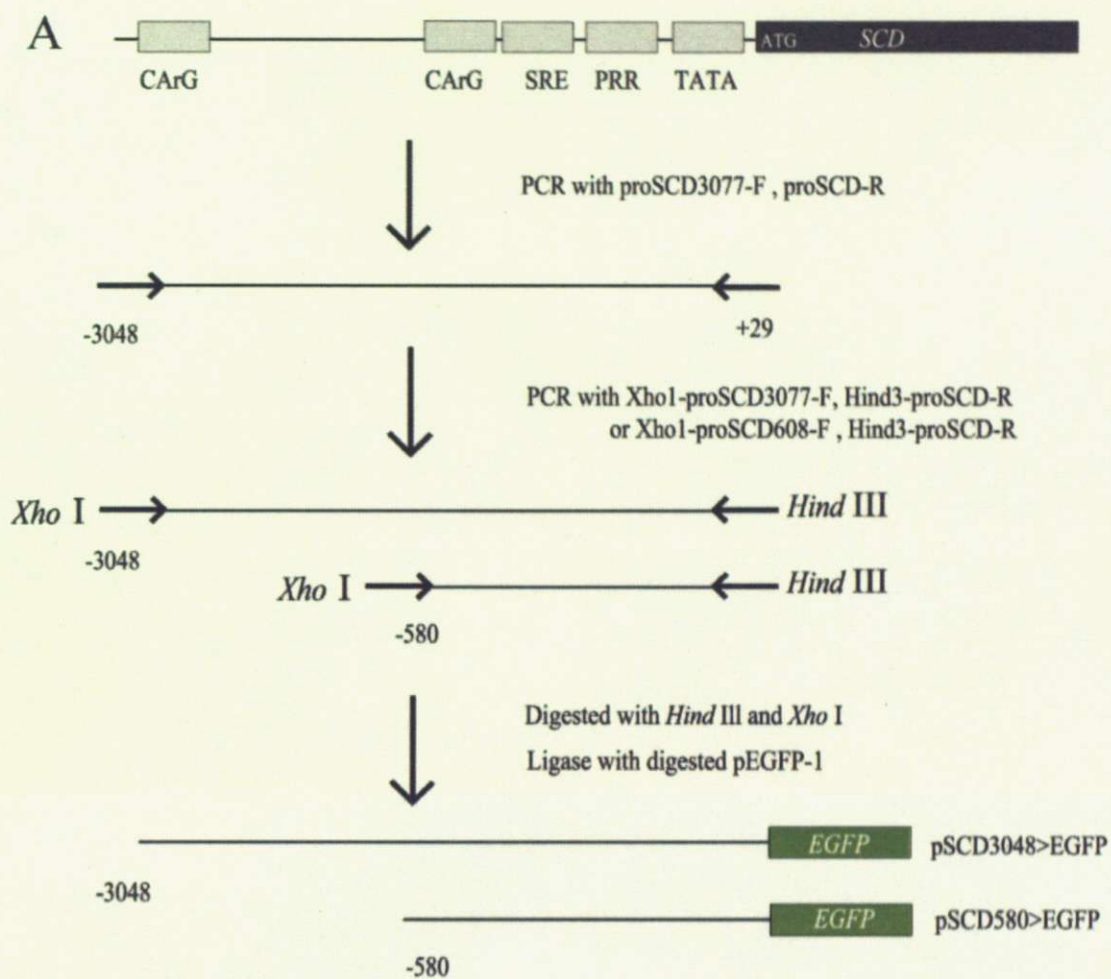
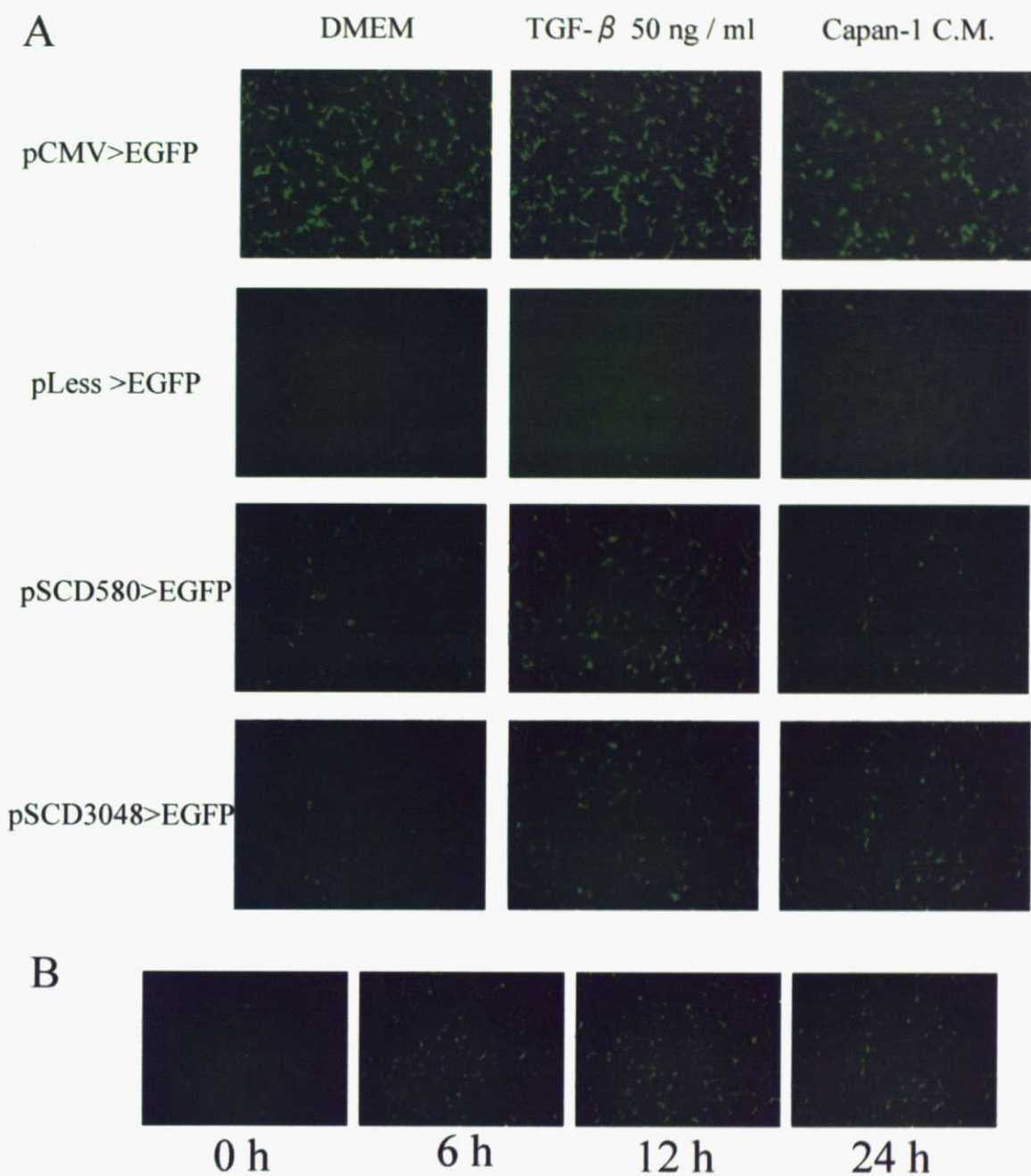


Figure 8

プラスミド構築

A. プロモーターコンストラクトは2回のPCR、更に *Xho* I / *Hind* III 消化により作製した。

B. 増幅されたPCR断片は *Xho* I / *Hind* III 消化された領域に挿入された。



**Figure 9**

**SCD mRNA 発現の可視化**

A. DMEM、TGF- $\beta$ 、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。

B. Capan-1 の培養上清による刺激 0、6、12、24 時間後の SCD3048>EGFP の蛍光顕微鏡写真。

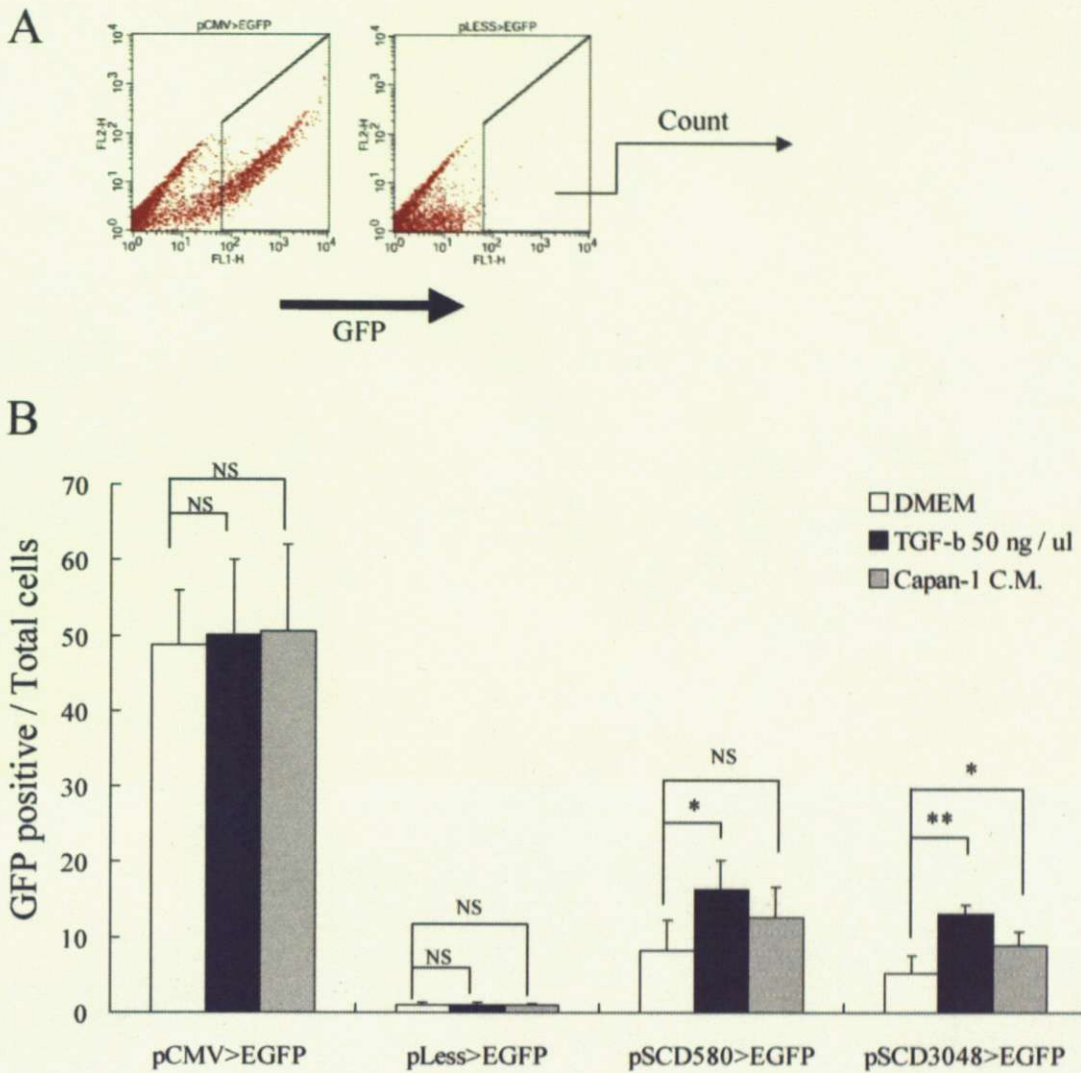


Figure 10

**SCD mRNA 発現の可視化の定量性**

A. GFP 陽性細胞の定義 ; DMEM を添加した pLess>EGFP の蛍光強度上位 1% 以上の蛍光強度を持つ細胞

B. FACS による DMEM、TGF-β、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 GFP 陽性細胞数。

各実験の例数は 4 回であり、それぞれのエラーバーは標準偏差を示す。コントロールとの有意差と test value は Bonferroni 補正した両側 t 検定により決定した (3 群中 2 回比較, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$  )。

## 参考文献

1. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
2. Park, C.C., Bissell, M.J., and Barcellos-Hoff, M.H. (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* *6*, 324-329.
3. Wernert, N. (1997). The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* *430*, 433-443.
4. van den Hooff, A. (1983). Connective tissue changes in cancer. *Int Rev Connect Tissue Res* *10*, 395-432.
5. Rohan, R.M., Fernandez, A., Udagawa, T., Yuan, J., and D'Amato, R.J. (2000). Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *Faseb J* *14*, 871-876.
6. Vaccariello, M., Javaherian, A., Wang, Y., Fusenig, N.E., and Garlick, J.A. (1999). Cell interactions control the fate of malignant keratinocytes in an organotypic model of early neoplasia. *J Invest Dermatol* *113*, 384-391.
7. Okusa, Y., Ichikura, T., and Mochizuki, H. (1999). Prognostic impact of stromal cell-derived urokinase-type plasminogen activator in gastric carcinoma. *Cancer* *85*, 1033-1038.
8. Liotta, L.A., and Kohn, E.C. (2001). The microenvironment of the tumour-host

- interface. *Nature* 411, 375-379.
9. Miura, S., Kodaira, S., and Hosoda, Y. (1993). Immunohistologic analysis of the extracellular matrix components of the fibrous stroma of human colon cancer. *J Surg Oncol* 53, 36-42.
  10. Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Koteliansky, V.E., and Bissell, M.J. (1995). The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest* 95, 859-873.
  11. Neaud, V., Faouzi, S., Guirouilh, J., Le Bail, B., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., and Rosenbaum, J. (1997). Human hepatic myofibroblasts increase invasiveness of hepatocellular carcinoma cells: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Hepatology* 26, 1458-1466.
  12. Doucet, C., Jasmin, C., and Azzarone, B. (2000). Unusual interleukin-4 and -13 signaling in human normal and tumor lung fibroblasts. *Oncogene* 19, 5898-5905.
  13. Rowley, D.R. (1998). What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev* 17, 411-419.
  14. Lohr, M., Schmidt, C., Ringel, J., Kluth, M., Muller, P., Nizze, H., and Jesnowski, R. (2001). Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia

- in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* *61*, 550-555.
15. Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* *59*, 5002-5011.
  16. Hayward, S.W., Wang, Y., Cao, M., Hom, Y.K., Zhang, B., Grossfeld, G.D., Sudilovsky, D., and Cunha, G.R. (2001). Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res* *61*, 8135-8142.
  17. Cheng, J.D., Valianou, M., Canutescu, A.A., Jaffe, E.K., Lee, H.O., Wang, H., Lai, J.H., Bachovchin, W.W., and Weiner, L.M. (2005). Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther* *4*, 351-360.
  18. Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., and Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* *94*, 715-725.
  19. De Wever, O., and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* *200*, 429-447.
  20. Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth

- and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
21. van der Loop, F.T., Schaart, G., Timmer, E.D., Ramaekers, F.C., and van Eys, G.J. (1996). Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* 134, 401-411.
  22. Lazard, D., Sastre, X., Frid, M.G., Glukhova, M.A., Thiery, J.P., and Koteliansky, V.E. (1993). Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 999-1003.
  23. Nakayama, H., Enzan, H., Miyazaki, E., Naruse, K., Kiyoku, H., and Hiroi, M. (1998). The role of myofibroblasts at the tumor border of invasive colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 28, 615-620.
  24. Masur, S.K., Dewal, H.S., Dinh, T.T., Erenburg, I., and Petridou, S. (1996). Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4219-4223.
  25. Petridou, S., Maltseva, O., Spanakis, S., and Masur, S.K. (2000). TGF-beta receptor expression and smad2 localization are cell density dependent in fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 89-95.
  26. Arora, P.D., Narani, N., and McCulloch, C.A. (1999). The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth



- muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol* *154*, 871-882.
27. Gherzi, G., Dong, H., Goldstein, L.A., Yeh, Y., Hakkinen, L., Larjava, H.S., and Chen, W.T. (2002). Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem* *277*, 29231-29241.
  28. Chang, H.Y., Chi, J.T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P.O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12877-12882.
  29. Ishii, G., Sangai, T., Ito, T., Hasebe, T., Endoh, Y., Sasaki, H., Harigaya, K., and Ochiai, A. (2005). In vivo and in vitro characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma. *Int J Cancer* *117*, 212-220.
  30. Ishii, G., Sangai, T., Sugiyama, K., Ito, T., Hasebe, T., Endoh, Y., Magae, J., and Ochiai, A. (2005). In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* *23*, 699-706.
  31. Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* *15*, 8783-8798.
  32. Matys, V., Kel-Margoulis, O.V., Fricke, E., Liebich, I., Land, S.,

- Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K., Voss, N., Stegmaier, P., Lewicki-Potapov, B., Saxel, H., Kel, A.E., and Wingender, E. (2006). TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* *34*, D108-110.
33. Baker, J.B., and Humphreys, T. (1971). Serum-stimulated release of cell contacts and the initiation of growth in contact-inhibited chick fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 2161-2164.
34. Gasparian, G., Sarkissian, N., Sayadian, A., and Grigorian, R. (1998). Cell-cell contacts accelerate cell colony growth in sparse cultures of chick embryo fibroblasts. *Cell Biol Int* *22*, 51-53.
35. Castro-Malaspina, H., and Jhanwar, S.C. (1984). Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts. *Prog Clin Biol Res* *154*, 307-322.
36. Shats, I., Milyavsky, M., Cholostoy, A., Brosh, R., and Rotter, V. (2007). Myocardin in tumor suppression and myofibroblast differentiation. *Cell Cycle* *6*, 1141-1146.
37. Ntambi, J.M. (1995). The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* *34*, 139-150.
38. Jones, B.H., Standridge, M.K., Claycombe, K.J., Smith, P.J., and Moustaid-Moussa, N. (1998). Glucose induces expression of stearoyl-CoA

- desaturase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 335 ( Pt 2), 405-408.
39. Ntambi, J.M. (1995). Cellular differentiation and dietary regulation of gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52, 117-120.
  40. Casimir, D.A., and Ntambi, J.M. (1996). cAMP activates the expression of stearoyl-CoA desaturase gene 1 during early preadipocyte differentiation. *J Biol Chem* 271, 29847-29853.
  41. Kim, H.J., Miyazaki, M., and Ntambi, J.M. (2002). Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *J Lipid Res* 43, 1750-1757.
  42. Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Sampath, H., Lee, S.H., Man, W.C., Chu, K., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Ntambi, J.M. (2004). Reduced adiposity and liver steatosis by stearoyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J Biol Chem* 279, 35017-35024.
  43. Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Cohen, P., Asilmaz, E., Hardie, D.G., Friedman, J.M., and Ntambi, J.M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6409-6414.
  44. Cohen, P., Miyazaki, M., Socci, N.D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A.A., Sharma, R., Hudgins, L.C., Ntambi, J.M., and Friedman, J.M. (2002). Role

- for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* *297*, 240-243.
45. Moore, S., Knudsen, B., True, L.D., Hawley, S., Etzioni, R., Wade, C., Gifford, D., Coleman, I., and Nelson, P.S. (2005). Loss of stearoyl-CoA desaturase expression is a frequent event in prostate carcinoma. *Int J Cancer* *114*, 563-571.
46. Scaglia, N., and Igal, R.A. (2005). Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem* *280*, 25339-25349.
47. Samuel, W., Nagineni, C.N., Kutty, R.K., Parks, W.T., Gordon, J.S., Prouty, S.M., Hooks, J.J., and Wiggert, B. (2002). Transforming growth factor-beta regulates stearoyl coenzyme A desaturase expression through a Smad signaling pathway. *J Biol Chem* *277*, 59-66.
48. Landschulz, K.T., Jump, D.B., MacDougald, O.A., and Lane, M.D. (1994). Transcriptional control of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* *200*, 763-768.
49. Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* *40*, 1549-1558.
50. Kim, Y.C., and Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase

genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 1-4.

51. Weiner, F.R., Smith, P.J., Wertheimer, S., and Rubin, C.S. (1991). Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J Biol Chem* 266, 23525-23528.
52. Samuel, W., Kutty, R.K., Nagineni, S., Gordon, J.S., Prouty, S.M., Chandraratna, R.A., and Wiggert, B. (2001). Regulation of stearoyl coenzyme A desaturase expression in human retinal pigment epithelial cells by retinoic acid. *J Biol Chem* 276, 28744-28750.
53. Lehr, H.A., Leunig, M., Menger, M.D., Nolte, D., and Messmer, K. (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143, 1055-1062.