

線維芽細胞に発現する Podoplanin の細胞内ドメインが腫瘍生着に促進的に働く分子機構の解明

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野
2012 年 3 月修了 47-106312 伊藤 傑
指導教官 落合 淳志 教授

[キーワード] がん微小環境, Podoplanin, 線維芽細胞, RhoA

[背景と目的]

がん組織は、がん細胞及びがん細胞の周りに存在する血管構成細胞、線維芽細胞、炎症細胞（リンパ球、単球 / マクロファージ）などの間質細胞（がん間質細胞）から構成される。がん間質の主要な構成要素である線維芽細胞は、腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移に影響していることが多数報告されている。当研究室においては、A549（ヒト肺腺がん細胞株）と線維芽細胞をマウス皮下に移植することにより、線維芽細胞に発現する Podoplanin (PDPN) が、腫瘍の生着に促進的に働く機能分子であることを見出した。PDPN は、細胞外ドメイン (PLAG ドメイン) で血小板上のレセプター (CLEC-2) に結合し、血小板凝集を促進することが知られている。また、PDPN は CD44 と細胞外で結合し、遊走能の上昇に働くことも示されている。一方、PDPN は、細胞内において ERM タンパクに結合し、RhoA を活性化することで、遊走能を上昇させることが報告されている (図1)。しかし、これらの報告は、がん細胞や上皮細胞に発現する PDPN の機能について述べたものであり、線維芽細胞に発現する PDPN の機能についての報告は皆無である。そこで、線維芽細胞に発現する PDPN が腫瘍の生着に促進的に働く分子機構の解明を本研究の目的とした。

[方法]

- (1) PDPN の細胞内ドメインが、腫瘍の生着に促進的に働く上で重要であるかを検討した。細胞内ドメインを欠損させた PDPN (P Δ CT) 及び ERM 結合ドメインにアミノ酸置換を入れ、ERM との結合能を失った PDPN (PCTQN.N) をヒト線維芽細胞 (hFbs) に過剰発現させ、A549 とマウス皮下に共移植することで、腫瘍生着の変化を検討した。
- (2) PDPN を発現する線維芽細胞は、RhoA を活性化することで、腫瘍の生着に促進的に働くのではないかと仮説を立て、その仮説が正しいかを検討した。

[結果]

- (1) ①細胞内ドメインを欠損させた PDPN (P Δ CT) が、野生型の PDPN (PWT) と同様に細胞膜に局在していることをフローサイトメトリーにて確認した (図2)。A549 と hFbs-PWT、hFbs-P Δ CT、hFbs-Control をそれぞれ 1×10^5 個マウス皮下に共移植し、腫瘍の生着率を経時的に観察したところ、A549 + hFbs-P Δ CT 群の腫瘍生着率は、A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した (図3)。したがって、線維芽細胞における PDPN が腫瘍の生着を促進する機能を保つ上で、細胞内ドメインは重要であると考えられる。

- ② PDPN (PCTQN.N) が、PWT、P Δ CT と同様に細胞膜に局在していることをフローサイトメトリーにて確認した (図2)。A549 と hFbs-PWT、hFbs-P Δ CT、hFbs-PCTQN.N、hFbs-Control をそれぞれ 1×10^5 個マウス皮下に共移植し、腫瘍の生着率を経時的に観察した。A549 + hFbs-PCTQN.N 群の腫瘍生着率は、A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した (図4)。したがって、線維芽細胞における PDPN が腫瘍の生着を促進する機能を保つ上で、ERM 結合ドメインは重要であると考えられる。

- ③ 1) PDPN を発現する線維芽細胞は、可溶性因子を分泌することで、A549 の腫瘍生着を促進しているのか、2) PDPN を発現する線維芽細胞が、A549 の腫瘍生着を促進する上で、ホストマウスの細胞が必要かを検討するために、Colony Assay を行った。A549 と hFbs-PWT、hFbs-P Δ CT、hFbs-PCTQN.N、hFbs-Control をそれぞれ 5×10^3 個ずつ細胞が自由に運動できないアガー中に懸濁し、2週間培養した。長径 $200 \mu\text{m}$ 以上の細胞塊をコロニーとして、9視野測定した結果、A549 + hFbs-Control 群、A549 + hFbs-P Δ CT 群、A549 + hFbs-PCTQN.N 群、A549 + hFbs-PWT 群のコロニー数に顕著な差は確認されなかった (図5)。

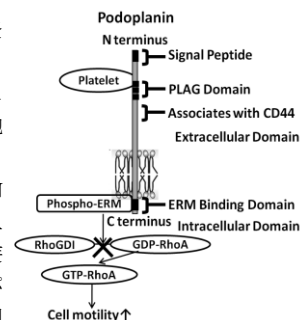


図1 既知の PDPN の機能ドメイン

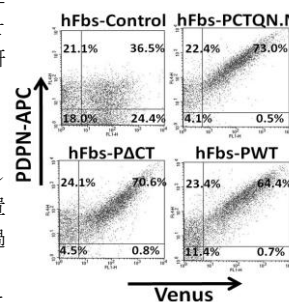


図2 変異型 PDPN の発現を確認した。

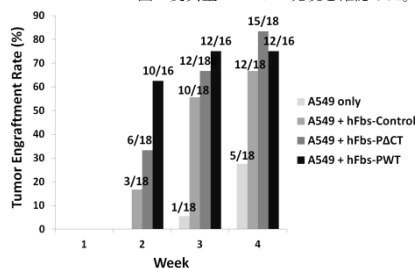


図3 A549 + hFbs-P Δ CT 群の腫瘍生着率は A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した。

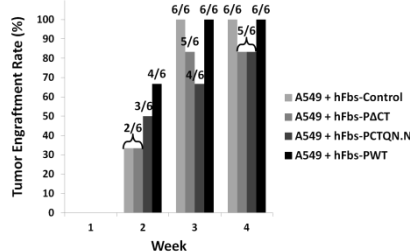


図4 A549 + hFbs-PCTQN.N 群の腫瘍生着率は A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した。

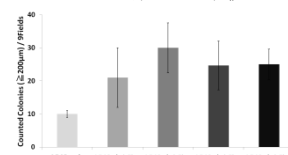


図5 各群のコロニー数に顕著な差はなかった。

④ PDPN を発現する線維芽細胞は、RhoA を活性化することで、腫瘍の生着を促進している可能性を仮説として考えた。PDPN を過剰発現させた線維芽細胞において、RhoA の活性化状態を G-LISA を用いて検討した。hFbs-PWT では hFbs-Control に比べて、RhoA 活性が 1.85 倍上昇していた (図6)。

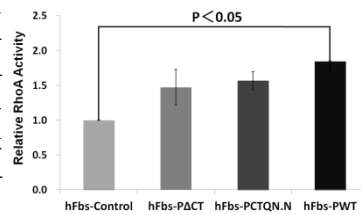


図6 hFbs-PWT では hFbs-Control に比べて、RhoA 活性が上昇していた。

(2) ⑤ Dominant Active 効果を示す G14VRhoA を線維芽細胞に遺伝子導入した。次に、hFbs-Control、hFbs-G14VRhoA の RhoA 活性 (G-LISA) 及び遊走能 (Chemoattractant Assay) を測定した。hFbs-G14VRhoA は、hFbs-Control に比べて、顕著な RhoA 活性の上昇 (図7) と遊走能の亢進 (図8) が起こっていた。

⑥ A549 と hFbs-Control、hFbs-G14VRhoA をそれぞれ 1×10^5 個マウス皮下に共移植し、腫瘍の生着率を経時的に観察した。A549 + hFbs-G14VRhoA 群の腫瘍生着率は、A549 + hFbs-Control 群に比べて高値を示した (図9)。したがって、RhoA を活性化した線維芽細胞は、腫瘍の生着に促進的に働くといえる。

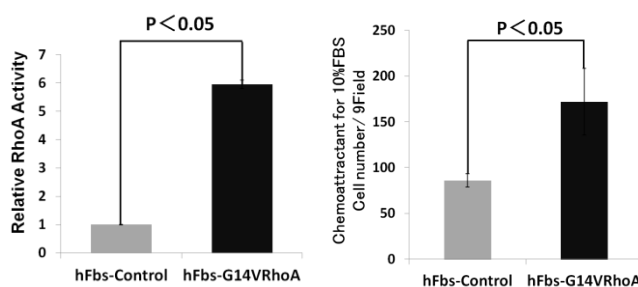


図7 hFbs-G14VRhoA は、hFbs-Control に比べて、RhoA 活性の上昇と遊走能の亢進が起こっていた。

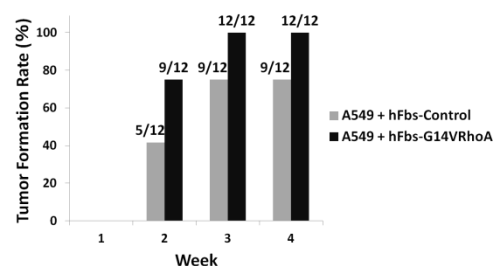


図9 A549 + hFbs-G14VRhoA 群の腫瘍生着率は、A549 + hFbs-Control 群に比べて高値を示した。

[考察]

図3、図4 のマウス皮下移植実験の結果から、線維芽細胞における PDPN が腫瘍生着を促進する機能を保つ上で、細胞内ドメイン (ERM 結合ドメイン) は重要であると考えた。そこで、PDPN を発現する線維芽細胞は、細胞内で RhoA を活性化することで、腫瘍の生着に促進的に働くのではないかと仮説を立て、以降の実験を行った。図6において、hFbs-PWT の RhoA 活性は、hFbs-Control に比べて高く、PDPN を発現する線維芽細胞は、細胞内で RhoA を活性化していることを確認した。hFbs-PΔCT や hFbs-PCTQN.N の RhoA 活性が、hFbs-Control に比べて高かった理由は不明であるが、細胞内に ERM 結合ドメインを持ち、RhoA の活性化を誘導する CD44 が関与している可能性もある。PDPN と CD44 が細胞外で結合することにより、CD44 の細胞内における ERM 結合能が上昇する可能性も考えられ、PΔCT や PCTQN.N を遺伝子導入することにより、RhoA 活性が上昇したことも説明できる。すなわち、PDPN を発現する線維芽細胞による腫瘍生着促進作用は、1) PDPN を介した RhoA の活性 2) PDPN と結合する CD44 を介した RhoA の活性 の双方の RhoA 活性化機構で定義できる (図10) ことになり、この仮説は本研究にとって非常に魅力的である。

図3のマウス皮下移植実験において、A549 + hFbs-PΔCT 群と A549 + hFbs-PWT 群の間で、腫瘍生着後の体積推移や移植50日目時点での腫瘍の増殖性に、差は認められなかった。くわえて、本研究では、移植50日目時点で腫瘍中に線維芽細胞が残存していないことを確認している。以上より、PDPN を発現する線維芽細胞は、がん細胞がマウス皮下に生着する非常に早い段階で、腫瘍細胞の増殖能ではなく、腫瘍生着を促進していると考えられる。また、図5 の Colony Assay の結果から、PDPN を発現する線維芽細胞が、A549 の腫瘍生着を促進する機構は、可溶性因子の分泌ではなく、がん細胞と線維芽細胞が自由に運動し、相互作用することである可能性を示唆した。さらに、Chemoattractant Assay により、hFbs-G14VRhoA の遊走能が、hFbs-Control に比べて、顕著に亢進していることを示した。以上から、PDPN を発現し、RhoA を活性化した線維芽細胞が、腫瘍の生着に促進的に働く機構は、線維芽細胞が RhoA 依存的に運動し、がん細胞の生着しやすい微小環境を整えることなのではないかと推察する (図11)。

[結論]

PDPN を発現する線維芽細胞は、細胞内で RhoA を活性化することにより、腫瘍の生着に促進的に働く。

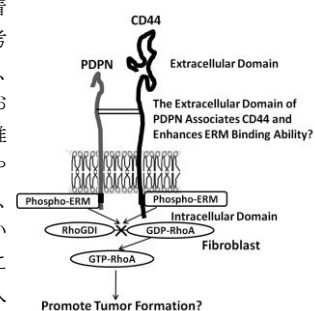


図10 PDPN は CD44 と協調して、RhoA の活性を制御している可能性もある。

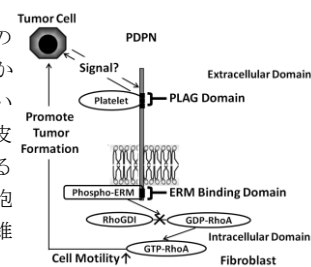


図11 PDPN を発現する線維芽細胞による腫瘍生着促進機構