

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

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 がん先端生命科学分野

2012 年度 修士論文

47106312 伊藤傑

指導教官 落合淳志

## 目次

I.	要旨	1
II.	略語表	3
III.	背景	6
	(1) がん微小環境	
	(2) がん間質線維芽細胞 (CAFs)	
	(3) CAFs が腫瘍の進展に及ぼす影響	
	(4) Podoplanin (PDPN) 分子	
	(5) CAFs における PDPN 発現	
IV.	本研究の目的	10
V.	実験材料及び方法	11
	(1) 線維芽細胞の単離と初代培養	
	(2) 細胞培養	
	(3) レンチウイルスベクターの作製	
	(4) レンチウイルスベクターのトランスフェクション	
	(5) フローサイトメトリー	
	(6) マウス皮下移植実験	
	(7) 定量的 RT-PCR	
	(8) ウェスタンブロット法	

- (9) コロニーアッセイ
- (10) 免疫染色
- (11) RhoA の活性化を評価する ELISA (G-LISA)
- (12) ケモアトラクタントアッセイ
- (13) 統計処理

## VI. 実験結果

23

- (1) 線維芽細胞に発現する PDPN の腫瘍生着促進作用
- (2) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の細胞内ドメインの重要性
- (3) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の ERM 結合ドメインの重要性
- (4) PDPN を発現する線維芽細胞によるコロニー形成促進能の検討
- (5) PDPN を発現する線維芽細胞の RhoA 活性
- (6) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の作製
- (7) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の遊走能の検討
- (8) RhoA を活性化した線維芽細胞による腫瘍生着促進作用

## VII. 考察

29

- (1) 線維芽細胞に発現する PDPN の腫瘍生着促進作用
- (2) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の細胞内ドメインの重要性
- (3) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の ERM 結合ドメインの重要性
- (4) PDPN を発現する線維芽細胞によるコロニー形成促進能の検討
- (5) PDPN を発現する線維芽細胞の RhoA 活性
- (6) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の作製
- (7) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の遊走能の検討

(8) RhoA を活性化した線維芽細胞による腫瘍生着促進作用

VIII.	結論	37
IX.	今後の予定	38
X.	参考論文	40
XI.	謝辞	44
XII.	図表	45

## I. 要旨

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  
47106312 がん先端生命科学分野  
伊藤 傑

### 〔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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ CT、hFbs-Control をそれぞれ  $1 \times 10^5$  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 $\Delta$ 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持上で、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 $\Delta$ 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 $\Delta$ CT、hFbs-PCTQN.N、hFbs-Control をそれぞれ  $1 \times 10^5$  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持上で、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 $\Delta$ CT、hFbs-PCTQN.N、hFbs-Control をそれぞれ  $5 \times 10^3$  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  $\mu$ 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 $\Delta$ 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)。

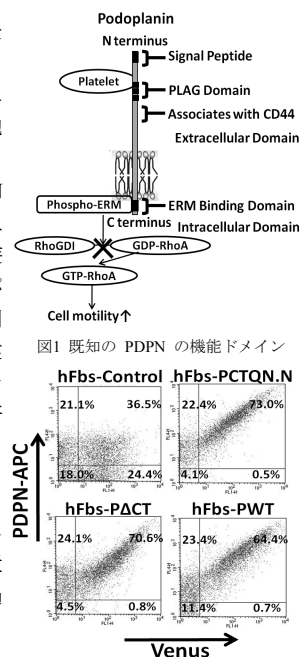


図1 既知の PDPN の機能ドメイン

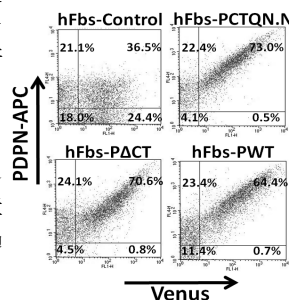


図2 変異型 PDPN の発現を確認した。

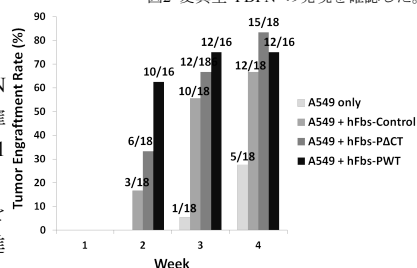


図3 A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群の腫瘍生着率は A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した。

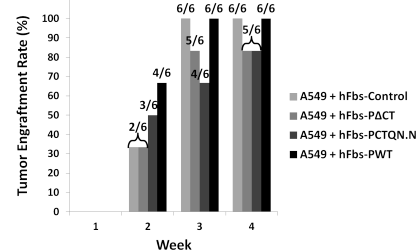


図4 A549 + hFbs-PCTQN.N 群の腫瘍生着率は A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した。

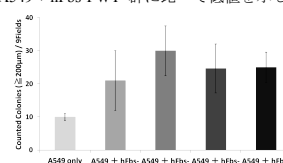


図5 各群のコロニー数に顕著な差はなかった。

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)。

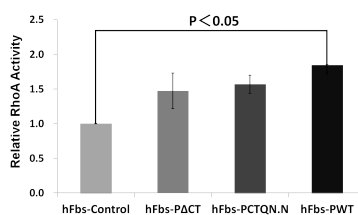


図6 hFbs-PWT では hFbs-Control に比べて、RhoA 活性が上昇していた。

(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  $1 \times 10^5$  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。

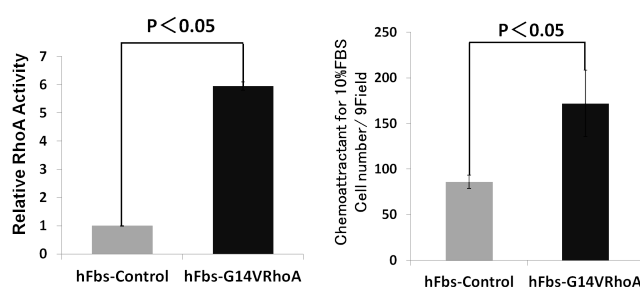


図7 hFbs-G14VRhoA は、hFbs-Control に比べて、RhoA 活性の上昇と遊走能の亢進が起こっていた。

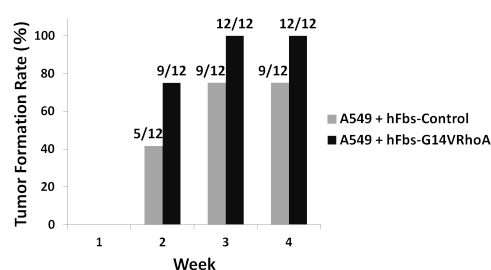


図9 A549 + hFbs-G14VRhoA 群の腫瘍生着率は、A549 + hFbs-Control 群に比べて高値を示した。

#### [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-P Δ CT 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、P Δ CT 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-P Δ CT 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。

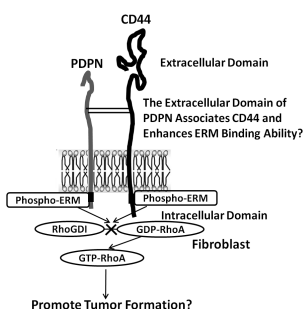


図10 PDPN は CD44 と協調して、RhoA の活性を制御している可能性もある。

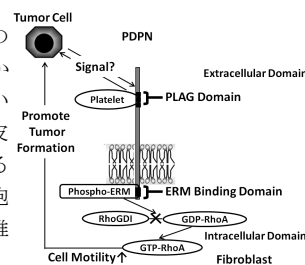


図11 PDPN を発現する線維芽細胞による腫瘍生着促進機構

## II. 略語表

APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine Serum Albumin
hCAFs	human Cancer Associated Fibroblasts
cDNA	complementary DNA
CD44	Cluster of Differentiation 44
CLEC-2	C-type lectin-like receptor
CXCL-12	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12
DAB	3,3-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride
DDW	Deionized Distilled Water
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERM	Ezrin , Radixin , Moesin
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
hFbs	human Fibroblasts
FCS	Fetal Calf Serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phospate dehydrogenase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GTP	Guanosine triphosphate

HRP	Horseradish peroxidase
LB	Lesogeny Broth
hLFs	human Lung Fibroblasts
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEM	Minimum Essential Medium
MMPs	Matrix Metalloproteinases
mRNA	messenger RNA
NaOAc	Sodium Acetate
PΔCT	Podoplanin Δ Cytoplasmic Tail
PΔEC	Podoplanin Δ Ectodomain
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDPN	Podoplanin
PLAG	Platelet-Aggregation-stimulating
PWT	Podoplanin Wild Type
RhoGDI	Rho GDP Dissociation Inhibitor
RNA	Ribonucleic acid
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAM	Sequence Alignment and Modeling
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
shRNA	short hairpin RNA
SOC	Super optimal broth + catabolite gel electrophoresis



TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween20
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
hVAFs	human Vascular Adventitial Fibroblasts

### III. 背景

#### (1) がん微小環境

がん組織は、がん細胞およびがん細胞の周りに存在する血管構成細胞や線維芽細胞、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 [1,2,3]。ヒトのがん組織は、がん細胞とがん間質細胞が種々の割合で混在して形成されており、その性状は症例により様々である。がん間質細胞の中でも、血管構成細胞は、酸素・栄養供給ルートとしてがん組織の進展に寄与していることが、Folkmanらにより明らかにされている [4]。線維芽細胞は、従来、がん細胞間を充填する結合組織構成細胞として認識されてきたが、近年の研究では、がん細胞の進展（増殖・浸潤・転移）に促進的に働く役割を有することが報告されている [2,5,6,7]。

#### (2) がん間質線維芽細胞 (CAFs)

Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) はがん間質組織を構成する線維芽細胞として定義され、その機能は多くの研究者の注目を浴びるところである。CAFs の起源としては、1) 既存組織の間質を充填する線維芽細胞、2) がん近傍組織の血管平滑筋細胞や血管周皮細胞由来である [8,9] と考えられてきたが、近年の研究で 1) 骨髄細胞由来の線維芽細胞、2) 血管外膜由来の線維芽細胞もまた CAFs の起源になり得る [10,11,12,13] ことが報告されている。CAFs は、がん細胞との相互作用により新たな生物像を獲得し、がん細胞から隔離しても、一定期間その性質を保ち続けることが知られている [14,15]。

#### (3) CAFs が腫瘍の進展に及ぼす影響

多くの動物実験は、CAFs が様々なメカニズムで腫瘍の進展に促進的に働

くことを示している。Orimo らは、CAFs が SDF-1 / CXCL12 の分泌を介して、末梢血中を流れる血管内皮細胞の増殖や動員を促進し、血管新生を起こすことで、腫瘍の進展に寄与することを報告した [16]。また、Stuelten らは、CAFs が MMPs を分泌し、細胞外マトリックスを破壊することで、がん細胞の浸潤を促進させることを示している [17]。さらに、Gaggoli らは、線維芽細胞が Rho 依存的に細胞収縮し、マトリックス中にトラックを形成することで、がん細胞の浸潤を直接的に先導することを *in vitro* の実験系で示した [18]。したがって、がんの悪性度を考慮する上で、がん細胞だけでなく、CAFs の生物像を解析することもまた重要であり、CAFs が腫瘍の進展に促進的に働く分子機構を集積することが、がん治療の新たな展開になると考えられる。

#### (4) Podoplanin (PDPN) 分子

Podoplanin (PDPN) は 44kDa の分子量をもつ膜一回貫通型タンパク質である。162 アミノ酸から成っており、細胞内ドメインはわずか 8 アミノ酸である。正常組織ではリンパ管内皮細胞、中皮細胞、扁平上皮の基底細胞などに発現している。当研究室の Atsumi らは、PDPN がヒト扁平上皮がん細胞株 A431 のがん幹細胞マーカーであることを報告した [19]。Sugimoto らは、PDPN の細胞外ドメイン (PLAG ドメイン) は、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を示した [20]。がん細胞に発現する PDPN は、血小板の CLEC-2 に結合することで、転移能が上昇することも示されている [21]。また、PDPN は細胞外ドメインで CD44 と結合し、遊走能の亢進を起こすことも近年報告されている [22]。一方、Martin-Villar らは、PDPN の細胞内ドメインに phospho-ERM (PDPN

と結合するのは Ezrin と Moesin のみ) が結合し、RhoA を活性化することを報告した [23] (Figure.1)。しかし、これらは上皮細胞及びがん細胞に発現する 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。

#### (5) CAFs における PDPN 発現

CAFs における PDPN の発現は、種々のがんで病理学的に検討されており、その予後に相関することが報告されている。我々の研究室では、Kawase らが、肺腺がんの間質中に PDPN を発現する CAFs が多く含まれる症例は、リンパ節転移症例が多く、予後不良であることを報告した [24]。以来、当研究室では hCAFs に発現する PDPN の機能に着目してきた。Aigaki らは、がん細胞の培養上清でヒト線維芽細胞を刺激することにより PDPN の発現が上昇することを報告した。この結果は、がん組織内の線維芽細胞で PDPN の発現が誘導されることを示唆している。

Hoshino らは、A549 (ヒト肺腺がん細胞株) とヒト血管外膜由来線維芽細胞である hVAFs (human Vascular Adventitial Fibroblasts) を共移植した群では、A549 と正常肺組織由来の hLFs (human Lung Fibroblasts) を移植した群よりも腫瘍の生着が有意に早いことを示した。cDNA マイクロアレイにて検討した結果、hLF よりも hVAFs において PDPN の発現が高いことが判明した。そこで、hVAFs を PDPN 陽性 / 陰性で sorting した後、それぞれを A549 とマウスに共移植した結果、PDPN 陽性の hVAFs を共移植した群で顕著に腫瘍の生着が促進されていた。また、PDPN をノックダウンした hVAFs を共移植すると、腫瘍の生着が抑制され、野生型の PDPN を過剰発現させた hVAFs と共移植すると、腫瘍の生着が促進されることを見出し

た [25]。以上から、Hoshino らは、線維芽細胞に発現する PDPN が、腫瘍の生着に促進的に働く機能分子であると結論付けた。

#### IV. 本研究の目的

線維芽細胞に発現する PDPN 分子が腫瘍生着に働く分子機構の解明を本研究の目的とした。実験は以下のステップで進めた。

- (1) 腫瘍の生着に促進的に働く PDPN の機能ドメインを同定するため、変異型 PDPN を過剰発現させ、A549 とマウスに共移植することで、腫瘍生着の変化を検討する。
- (2) (1) で同定した PDPN の機能ドメインを基に、PDPN を発現する線維芽細胞が、腫瘍生着に促進的に働くメカニズムを類推し、分子生物学的手法を用いてその仮説が正しいかを検討する。

## V. 実験材料及び方法

### (1) 線維芽細胞の単離と初代培養

当初、本研究では、線維芽細胞に発現する PDPN の腫瘍生着促進機構を解明するために、線維芽細胞株である KM104 (ヒト骨髓由来線維芽細胞株)(千葉大学医学研究科 張ヶ谷健一教授より提供)、MRC-5 SV-TG (ヒト胎児肺由来線維芽細胞株)(理化学研究所)、IMR-90-SV (ヒト胎児肺由来線維芽細胞株)(理化学研究所) を用いた。しかし、いずれの細胞株に PDPN を過剰発現させても、腫瘍の生着を促進しなかった。そこで、Hoshino が扱い、PDPN の腫瘍生着促進作用があることが確認されていた hVAFs を本研究でも使用した。なお、一部の実験では hCAFs も使用している。

hVAFs は、外科的に切除された肺組織より分離培養した。具体的には、肺組織とともに摘出された肺動脈の外膜を慎重に剥ぎ取り、滅菌したはさみで 2mm 以下に細かく切断したものを 10cm dish (日本 BD) に播種した。hVAFs は、調整した間葉系幹細胞増殖培地 (TOYOBO) を 2ml 添加し培養した。それぞれの組織片が線維芽細胞に取り囲まれるまで、2 日に 1 回同量の間葉系幹細胞増殖培地に交換した。組織を播種した 2 週間後、組織を取り除き、細胞を 0.05% Trypsin/ EDTA (SIGMA) で剥がして回収した。この細胞を 10cm dish に播いたものを Passage 0 とし、以降の実験には Passage 4~8 を用いた。なお、hVAFs は、6cm dish に  $2 \times 10^5$ 、10cm dish に  $6 \times 10^5$  播いた日を Day 0 として、Day 3 に実験に供した。

hCAFs は、外科的に切除された肺がん組織より分離培養した。肺がん組織を滅菌したはさみで 2mm 程度に細かく切断し、10cm dish に播種した。培地は、 $\alpha$ -MEM (SIGMA) に 10% FBS (SIGMA) と 1% Penicilin /

Streptomycin (SIGMA) を加えたものを用いた。以降は、hVAFs と同様の条件で培養を行い、実験に供した。

ヒト由来の材料の採取及びその実験への利用については、予め患者からのインフォームドコンセントを得ており、本研究は、国立がん研究センター内の倫理委員会の承認を得ている。使用した hVAFs、hCAFs は線維芽細胞のマーカーである I 型 collagen、Vimentin を発現していた。また、hVAFs 及び hCAFs は、単球マーカーである CD14、血管内皮マーカーである CD31、リンパ球マーカーである CD45、造血系前駆細胞マーカーである CD34、CD117 は発現していなかった [26]。

## (2)細胞培養

使用した細胞株は A549 (ヒト肺腺がん細胞株)(ATCC) と HEK 293T (ヒト胎児腎細胞株) である。A549 は DMEM (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicilin / Streptomycin を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。HEK 293T は RPMI (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicilin / Streptomycin を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。hVAFs は、間葉系幹細胞増殖培地に添付の 0.2% Growth Factor Supplement (線維芽細胞増殖刺激因子を豊富に含む)、1% FCS を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。hCAFs は、 $\alpha$ -MEM に 10% FBS と 1% Penicilin / Streptomycin を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

## (3)レンチウイルスベクターの作製

レンチウイルスベクターに組み込んだ遺伝子を Table.1 にまとめた。変異型 PDPN を発現するレンチウイルスベクターは、以下の手順で作製した。



PDPN 発現 pcDNA3 ベクター (公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 藤田直也博士より提供) を template DNA とし、i) PCR 法にて増幅した。使用したプライマーを Table.2 にまとめた。いずれのプライマーも、Sense 鎖には *BamHI*、Antisense 鎖には *EcoRI* の制限酵素サイトを末端に付けた。PΔCT は、細胞外ドメインから膜貫通ドメインまでを増幅した。また、PCTQN.N は、ERM 結合ドメインにアミノ酸置換を入れたプライマーで全ドメインを増幅した。次に、増幅産物を ii) アガロースゲル電気泳動にかけ、目的のバンドの iii) 切り出しを行うことで insert cDNA を得た。pENTR 2β ベクター (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) については、*BamHI*/*EcoRI* で iv) 制限酵素処理後、アガロース電気泳動により、目的とする長さのバンドの切り出しを行い、先述の insert cDNA との v) ライゲーション反応を行った。組み換えプラスミドを大腸菌へ vi) 形質転換して、vii) プラスミドを精製した後、viii) LR 組換え反応により、insert cDNA を pENTR 2β ベクターから CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus ベクター (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) に導入した。

RhoA variant を発現するレンチウイルスベクターは、以下の手順で作製した。RhoA variant 発現 pcDNA3 ベクター (コスモ・バイオ) を *ApaI* で制限酵素処理後、アガロースゲル電気泳動にかけ、DNA が制限酵素で切断されたことを確認した。これを ix) フェノール・クロロホルム抽出／エタノール沈殿処理し、精製した DNA を x) Blunting 処理することで、制限酵素切断部位を平滑化した後、再度フェノール・クロロホルム抽出／エタノール沈殿処理を行った。さらに、精製した DNA を *KpnI* で制限酵素処理後、アガロースゲル電気泳動にかけ、目的のバンドの切り出しを行うことで

insert cDNA を得た。pENTR 2 $\beta$  ベクターについては *KpnI* / *EcoRV* で制限酵素処理後、アガロース電気泳動により、目的とする長さのバンドの切り出しを行い、先述の insert cDNA とのライゲーションを行った。組み換えプラスミドを大腸菌へ形質転換して、プラスミドを精製した後、LR 反応により、insert cDNA を pENTR 2 $\beta$  ベクターから CS II -CMV-RfA-IRES2-Venus ベクターに導入した。

レンチウイルスベクターのコンストラクトは全て、xi) シークエンスを行い、正しい配列が組み込まれていることを確認した。

PDPN のノックダウンには、shPodoplanin (GGATCTGCCAACTTCAGAAAT) を発現する CS-RfA-EG (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) を用いた。コントロールには、shluc (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) を発現する CS-RfA-EG を用いた。

#### i) PCR 法

25 $\mu$ l の 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix (Takara)、3 $\mu$ l の 5 $\mu$ M Sense Primer (Invitrogen)、3 $\mu$ l の 5 $\mu$ M Antisense Primer (Invitrogen)、100ng/ $\mu$ l の Template DNA 1 $\mu$ l、18 $\mu$ l の DDW (GIBCO) を混合し、PCR Thermal Cycler (Takara) を用いて ((98 $^{\circ}$ C 10 秒, 50 $^{\circ}$ C 5 秒, 72 $^{\circ}$ C 5 秒) $\times$ 5cycles、(98 $^{\circ}$ C 10 秒, 60 $^{\circ}$ C 5 秒, 72 $^{\circ}$ C 5 秒) $\times$ 15 cycles) の条件で PCR 反応を行った。

#### ii) アガロース電気泳動

DNA サンプルに 1/9 量の 10 $\times$ Loading buffer (Takara) を加えたものを 0.8% または 1.5% アガロースゲルにアプライして、泳動バッファー

[1×TAE buffer [40mM Tris / 40mM 酢酸 / 1mM EDTA(pH 8.0) ] / 500ng / mL 臭化エチジウム] 中で 100V の電圧をかけて電気泳動を行った。

### iii) DNA 産物の切り出し

泳動したアガロースゲルに 312 nm の波長の紫外光をあててバンドを確認して、メスで目的のバンド部分を切り取った。切り取ったゲルの重量を測定して、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製した。

### iv) 制限酵素処理

*BamHI* / *EcoRI* による制限酵素処理では、sample DNA を 15units/μl *BamHI* (Takara)、15units/μl *EcoRI* (Takara) を含む 10×H buffer (Takara) にて懸濁し、37℃で2時間インキュベートした。

*ApaI* による制限酵素処理では、sample DNA を 15units/μl *ApaI* (Takara) を含む 10×L buffer (Takara) にて懸濁し、37℃で2時間インキュベートした。

*KpnI* による制限酵素処理では、sample DNA を 10units/μl *KpnI* (Takara) を含む 10×L buffer (Takara) にて懸濁し、37℃で2時間インキュベートした。

*KpnI* / *EcoRV* による制限酵素処理では、sample DNA を 10units/μl *KpnI* (Takara)、15units/μl *EcoRV* (Takara) を含む 10×K buffer (Takara) にて懸濁し、37℃で2時間インキュベートした。

### v) ライゲーション反応

25fmol の pENTR 2β ベクター及び 75fmol のインサート DNA に、等量の DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) I 液を加えて、16℃で8時間インキュ

ベートした。

#### vi) 形質転換

50 $\mu$ l の competent High DH5 $\alpha$  細胞 (TOYOBO) と 1ng 相当のプラスミド DNA とを混合して、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、42 $^{\circ}$ C で 90 秒間インキュベートして、さらに氷上で 2 分間インキュベートした。そこへ 200 $\mu$ l の SOC 培地 [2.0% トリプトン / 0.5% yeast extract / 10mM NaCl / 2.5mM KCl / 10mM MgCl<sub>2</sub> / 10mM MgSO<sub>4</sub> / 20mM グルコース] を加えて、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した。LB 寒天培地 [20mg/mL LennoxXL Broth Base / 15mg/mL Agar / 50 $\mu$ g/ml Ampicilin 又は 20 $\mu$ g/ml Kanamycin] に 25 $\mu$ l 及び 225 $\mu$ l の菌液を塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養してコロニーを生着させた。

#### vii) プラスミド精製 (ミニプレップ)

LB 寒天培地上で生着させた大腸菌コロニーを 1 個ずつ採取して、それぞれのコロニーを 2ml の LB 液体培地 [20mg/mL LennoxXL Broth Base / 50 $\mu$ g/ml Ampicilin 又は 20 $\mu$ g/ml Kanamycin] 中で 37 $^{\circ}$ C にて 12 時間振盪培養した。その後、Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

#### viii) LR 組換え反応

100ng のエントリーベクター及び 100ng のターゲットベクターに、2 $\mu$ l の Gateway LR clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を添加して、25 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、1 $\mu$ l の Proteinase K (Invitrogen) を添加して、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。その後、反応液を 50 $\mu$ l の Max Efficiency DH10B  $\beta$  competent cell (Invitrogen) に i) と同様の操作で形

質転換した。

#### ix) フェノール・クロロホルム抽出／エタノール沈殿処理

DNA 溶液に等量のフェノール・クロロホルム溶液 (Wako) を加え、Vortex を用いて激しく懸濁した。遠心後、水層に溶解している DNA を新しいチューブに移し、クロロホルム (Wako) を加えて再び遠心した。水層成分に 3M NaOAc pH5.2 を加え、溶液を酸性にした後に、2.5 倍量のエタノール (Wako) を加え、エタノール沈殿で DNA を精製した。

#### x) Blunting 処理

Blunting 処理には DNA Blunting Kit (Takara) を用いた。0.1pmol ~ 10pmol の突出末端 DNA に 1μl の 10×buffer を加えて、全量 9μl に調整した反応液を 70℃で 5 分間インキュベートした後、37℃の恒温槽に移して 1μl の T4 DNA polymerase を加えてピペッティングで穏やかに混和した。その後、ボルテックスで激しく攪拌して酵素を失活させた。

#### xi) シークエンス

シーケンシングには Big Dye Xterminator Kit (Applied biosystem) 及び Big Dye XTerminator Purification Kit (Applied biosystem) を用いた。8μl の Terminator Ready Reaction Mix、2μl のプラスミド DNA、3.2pmol のプライマー、6.8μl の DW を混合して、PCR Thermal Cycler を用いて 96℃ 1 分、(98℃ 10 秒, 50℃ 5 秒, 60℃ 4 分)×25 cycles の条件で PCR 反応を行った。反応液に SAM 溶液、BigDye Xterminator 溶液を添加し、ボルテックスで攪拌後、室温にて 2000rpm で 2 分間遠心した。測定には Genetic Analyzer

3500 (HITACHI) を用いた。

#### (4) レンチウイルスベクターのトランスフェクション

293T 細胞を  $1.0 \times 10^6$  個ずつ 6cm dish (日本 BD) に播種した。翌日、先述した 5 $\mu$ g のレンチウイルスベクターを、3 $\mu$ g の pCMV-HIV (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) 及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) と共に 500 $\mu$ l の Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) に加えて、5 分間室温でインキュベートした (A 液)。さらに、20 $\mu$ l の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 500 $\mu$ l の Opti-MEM I Reduced Serum Medium に加えて 5 分間室温でインキュベートした (B 液)。A 液と B 液を混合した後、室温で 20 分間インキュベートした。この混合液を 293T 細胞に添加して、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養した後、培地を交換してさらに 24 時間培養した。培養上清を 0.45 $\mu$ m filter (Millipore) に通してから、前日 6cm dish に  $1 \times 10^5$  個播種した線維芽細胞に添加した。3 時間後に hVAF には間葉系幹細胞増殖培地、hCAFs には 10% FBS  $\alpha$ -MEM を加えて、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 48 時間培養した後、細胞を回収した。

#### (5) フローサイトメトリー

$1.0 \times 10^6$  個の線維芽細胞を 100 $\mu$ l の 3% FBS / PBS (SIGMA) に懸濁した。抗 Podoplanin 抗体である gp36 (clone 18H5, Abcam, Cambridge, UK)、Mouse IgG1, k isotype Conttrol (clone P3, eBioscience) を 100 倍希釈し、一次抗体として用いた。二次抗体は、当初 APC Contjugated Donkey anti-mouse IgG (H+L) (polyclonal, eBioscience) を 40 倍希釈して使っていたが、販売中

止となってしまったため、以降は Goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub>-APC (Santa Cruz) を 40 倍希釈して用いた。なお、遺伝子導入した 線維芽細胞の Venus 発現は、抗体を添加せず、FACS Calibur (日本 BD) を用いて検出した。

#### (6) マウス皮下移植実験

A549 は  $1.0 \times 10^6$  個、hVAFs は  $6.0 \times 10^5$  個を 10cm dish に播種し、3 日後にそれぞれの細胞を回収した。シリンジングした  $1.0 \times 10^5$  個ずつの hVAFs と A549 を 200 $\mu$ l の無血清  $\alpha$ -MEM に懸濁し、マウスの両腋の皮下に移植した。移植後 1 週おきに腫瘍の生着を確認した。マウスは移植 50 日目に解剖し、皮下の腫瘍と肺、リンパ節を回収した。

#### (7) 定量的 RT-PCR

細胞をトリプシン処理した後、1500rpm の遠心を行い、得られたペレットに TRIzol reagent (Invitrogen) を加えて total RNA を抽出した。クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により RNA を精製した後、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて cDNA を合成した。その後、SYBR Premix Ex TaqTM (Takara) を用いて、Smart Cycler (Takara) により定量的 RT-PCR 反応を行った。標的遺伝子の mRNA の発現は、GAPDH で標準化した。使用したプライマーは、Table.3 に示した。

#### (8) ウエスタンブロット法

Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics) 及び NaVO<sub>4</sub> (Wako) を含む Lysis Buffer (20mM HEPES-NAOH, 0.5% NP-40, 15% glycerol) で細胞を溶解した。Sample Buffer [2M Tris-HCl (pH6.8), 30% SDS,

Glycerol, 1% Bromophenol blue] 及び 2-メルカプトエタノール (Wako) を懸濁し、煮沸することで S-S 結合を切断した。4-20% ポリアクリルアミドゲル (BIO-RAD) にサンプルを供し、150V で 1 時間電気泳動した。PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、Blocking Buffer (5% skim milk in TBS-T) でブロッキングした後、一次抗体を添加し、4℃で一晩インキュベートした。TBS-T [137mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH7.6), Tween20] で洗浄した後、二次抗体を Blocking Buffer に添加し、室温で 1 時間インキュベートした。バンドの検出には、ECL Western Blotting Reagents (GE Healthcare) を用いた。使用した抗体は Table.4 に示した。

#### (9) コロニーアッセイ

5% と 4% の濃度に Difco Agar Noble (日本 BD) を調整し、オートクレーブをかけ溶解した。5% Agar に、50℃に保温した 10% FBS DMEM (Low Glucose) を 9 倍量加えて 3.5cm dish (日本 BD) に添加し、室温でゲル化させて、下層とした。次に、 $5.0 \times 10^3$  個の A549 及び hVAFs を 1ml の 0.4% agar に懸濁したものを下層に重層し、直ちに 4℃で 15 分間培養した。その後、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 週間培養した。顕微鏡を用いて対物レンズ 10 倍の拡大率で 9 視野を観察して、直径 200μm 以上のコロニー数をカウントした。

#### (10) 免疫染色

マウス皮下移植腫瘍を回収し、組織を滅菌したはさみで 5mm 幅に切断した後、その一部を中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) により固定して、パラフィンに包埋した。4μm の薄切切片を、スライドガラス (松浪ガ



ラス工業) に展開させた。組織切片はキシレン (SIGMA) とエタノール (SIGMA) を用いて脱パラフィン化した後、非特異的結合をブロックするために、2% NSS/PBS に 30 分浸漬した。10mM クエン酸バッファー (pH 6.0) 中でマイクロウェーブ処理を行うことで、抗原を賦活した。その後、0.3% 過酸化水素 (Wako) を含有したメタノール (SIGMA) に 15 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。一次抗体は、clone D2-40 (SIGNET) 及び mouse anti-human MIB-1 抗体 (Dako) を用いた。二次抗体は Envision+System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse (Dako) を用いた。発色には、DAB (3,3-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride)(Wako) を用いた。400 倍の拡大率で、ホットスポット 5 視野の細胞数をカウントすることで、MIB-1 index の評価を行った。

#### (11) RhoA の活性化を評価する ELISA (G-LISA)

$2 \times 10^5$  個の hCAFs を 6cm dish に播種し、10% FBS  $\alpha$ -MEM 中で培養した。3 日後、タンパクライセートを回収し、4℃、10000rpm で 2 分遠心した。RhoA の失活を防ぐため、サンプルは液体窒素中で瞬間凍結した。RhoA の活性化の評価には G-LISA Rho activation kits, for Rho A (Cytoskelton) を用いた。特異的に活性型 RhoA と結合する Rhotekin のコーティングされた 96well-plate でサンプルをインキュベートした。Positive Control には、添付の Rho Control Protein を用いた。発色強度は SPECTRA MAX 190 (Molecular Devices) を用いて測定した。

#### (12) ケモアトラクタントアッセイ

24 well plate (日本 BD) に 10% FBS  $\alpha$ -MEM を 600 $\mu$ l ずつ加えた。Cell

Culture Insert (8.0 $\mu$ m のポアサイズ、日本 BD) を well にセットし、 $2.0 \times 10^5$  個の hVAFs を 100 $\mu$ l の 無血清  $\alpha$ -MEM に懸濁して、Cell Culture Insert の中央に添加した。37°C で 6 時間培養した後、Cell Culture Insert を通り抜けた細胞数をカウントした。

### (13) 統計処理

動物実験 (Figure.3) の結果は、means $\pm$ SE 値で示した。それ以外の結果は、means $\pm$ SD 値で示した。統計比較は、多重比較検定である Tukey-Kramer 法を用いて行い、P 値が 0.05 以下だった場合に有意差ありとみなした。

## VI. 実験結果

### (1) 線維芽細胞に発現する PDPN の腫瘍生着促進作用

線維芽細胞に発現する PDPN が腫瘍の生着に働く機能分子であるかを検討した。レンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞 (hVAFs) に野生型の PDPN (PWT) を遺伝子導入し、感染効率が 60%以上であること、導入した PWT が膜表面に発現していることをフローサイトメトリーで解析した (Figure.2A)。A549 と hFbs-PWT、hFbs-Control をそれぞれ  $1 \times 10^5$  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-Control 群では、移植 2 週目で 2/6 (腫瘍生着率 33.3%) の腫瘍の生着が確認された。一方、A549 + hFbs-PWT 群では、6/6 (腫瘍生着率 100%) の腫瘍の生着が確認された。また、移植 3 週目、4 週目では、A549 + hFbs-Control 群では 4/6 (腫瘍生着率 66.7%) の腫瘍の生着しか確認されなかった (Figure.2B)。

次に、レンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞 (hVAFs) に shPDPN を遺伝子導入し、PDPN の発現及び感染効率をフローサイトメトリーで解析した。hFbs-shluc では、PDPN の発現は 50.3 %であったが、hFbs-shPDPN では 18.7%にノックダウンされていた (Figure.2C)。A549 と hFbs-shPDPN、hFbs-shluc をそれぞれ  $1 \times 10^5$  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-shluc 群では、移植 2 週目で 6/6 (腫瘍生着率 100%) の腫瘍の生着が確認された。一方、A549 + hFbs-shPDPN 群では、3/6 (腫瘍生着率 50%) の腫瘍の生着を確認した。また、A549 + hFbs-shPDPN 群は、移植 3 週目で 4/6 (腫瘍生着率 66.7%)、移植 4 週目で 5/6 (腫瘍生着率 83.3%) の腫瘍の生着しか確認されなかった (Figure.2D)。

## (2) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の細胞内ドメインの重要性

線維芽細胞に発現する PDPN の細胞内ドメインが、腫瘍生着を促進する上で重要であるかを検討した。レンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞 (hVAFs) に細胞内ドメインを欠損させた PDPN (P $\Delta$ CT) を遺伝子導入し、感染効率が 60%以上であること、P $\Delta$ CT は PWT と同様に、膜表面に発現していることをフローサイトメトリーで確認した (Figure.3A)。A549 と hFbs-PWT、hFbs-P $\Delta$ CT、hFbs-Control をそれぞれ  $1 \times 10^5$  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-PWT 群では、移植 2 週目で 10/16 (腫瘍生着率 62.5%) の腫瘍の生着が確認された。一方、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群では、6/18 (腫瘍生着率 33.3%) の腫瘍の生着を確認した。また、移植 2 週目における A549 + hFbs-Control 群では、3/18 (腫瘍生着率 16.7%) の腫瘍が生着しており、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群よりも低値であった。移植 3 週目以降は、各群間の腫瘍生着率の差は縮まっていた (Figure.3B)。

腫瘍生着後の体積は、A549 単独移植群、A549 + hFbs-Control 群、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群、hFbs-PWT 群の間で顕著な差は確認されなかった (Figure.3C)。

移植 50 日目に回収した腫瘍中に、移植した線維芽細胞が残存しているかを、抗ヒト PDPN 抗体を用いた免疫染色により検討した。その結果、A549 + hFbs-Control 群、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群、A549 + hFbs-PWT 群では、ヒト PDPN 陽性細胞を確認できなかった。

MIB-1 抗体を用いて、各群の腫瘍を免疫染色することにより、腫瘍細胞の増殖性の評価を行った。MIB-1 index は、A549 単独移植群で 37.2%、A549 + hFbs-Control 群で 41.4%、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群で 35.5%、A549 +

hFbs-PWT 群で 41.5% であり、各群間に有意な差は認められなかった (Figure.3D)。

### (3) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の ERM 結合ドメインの重要性

ERM 結合ドメインは、PDPN の細胞内における既知の機能ドメインとして、唯一報告されている。そこで、線維芽細胞に発現する PDPN の ERM 結合ドメインが、腫瘍生着を促進する上で重要であるかを検討した。細胞内の ERM 結合ドメインに 3 アミノ酸の置換を入れることで、ERM との結合能を失った PDPN (PCTQN.N) (細胞内ドメイン (N→C) PWT : RKMSGRYSP, PCTQN.N : QNMSGNYSP) を線維芽細胞 (hVAFs) に遺伝子導入し、感染効率が 60% 以上であること、PCTQN.N も PΔCT や PWT と同様に、膜表面に発現していることをフローサイトメトリーで確認した (Figure.4A)。A549 と hFbs-PWT、hFbs-PΔCT、hFbs-PCTQN.N、hFbs-Control をそれぞれ  $1 \times 10^5$  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 群では、移植 2 週目で 3/6 (腫瘍生着率 50%) の腫瘍の生着が確認された。一方、A549 + hFbs-PWT 群では 4/6 (腫瘍生着率 66.7%)、A549 + hFbs-PΔCT 群では 2/6 (腫瘍生着率 33.3%) の腫瘍の生着を確認した。また、移植 3 週目では、A549 + hFbs-PCTQN.N 群では、4/6 (腫瘍生着率 66.7%) の腫瘍の生着が確認されたのに対し、A549 + hFbs-PΔCT 群では 5/6 (腫瘍生着率 83.3%)、A549 + hFbs-PWT 群では 6/6 (腫瘍生着率 100%) の腫瘍の生着が確認された。移植 4 週目においては、A549 + hFbs-PCTQN.N 群で 5/6 (腫瘍生着率 83.3%) の腫瘍の生着が確認され、腫瘍生着率は A549 + hFbs-PΔCT 群と同値であった (Figure.4B)。

#### (4)PDPN を発現する線維芽細胞によるコロニー形成促進能の検討

*In vitro* における A549 の足場非依存性増殖能を評価するため、Colony Assay を行った。線維芽細胞は hVAFs を用い、線維芽細胞単独群で、コロニー形成が起こらないことを確かめた。次に、A549 と hFbs-PWT、hFbs-P $\Delta$ CT、hFbs-PCTQN.N、hFbs-Control をそれぞれ  $5 \times 10^3$  個ずつアガー一中に懸濁し、2 週間培養した。長径 200 $\mu$ m 以上の細胞塊をコロニーとして、9 視野測定した。A549 単独群では  $10 \pm 0.58$  個、A549 + hFbs-Control 群では  $21 \pm 5.2$  個、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群では  $30 \pm 4.4$  個、A549 + hFbs-PCTQN.N 群では  $25 \pm 4.3$  個、A549 + hFbs-PWT 群では  $25 \pm 2.6$  個のコロニーを確認した (Figure.5)。

#### (5)PDPN を発現する線維芽細胞の RhoA 活性

PDPN を発現する線維芽細胞は、RhoA を活性化することで、腫瘍の生着亢進に寄与している可能性を仮説として考えた。そこで、PDPN を過剰発現させた線維芽細胞 (hCAFs) において、RhoA が活性化されているかを G-LISA を用いて検討した。レンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞に P $\Delta$ CT、PCTQN.N、PWT を遺伝子導入し、感染効率が 60%以上であることをフローサイトメトリーで確認した。線維芽細胞のタンパクライセートを回収し、プロトコールに従って ELISA を行い、発色強度をマイクロプレートリーダーで検出した。hFbs-Control の発光強度を 1 としたとき、hFbs-P $\Delta$ CT 群では  $1.47 \pm 0.22$ 、hFbs-PCTQN.N 群では  $1.57 \pm 0.12$ 、hFbs-PWT 群では  $1.85 \pm 0.01$  であった (Figure.6A)。

#### (6) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の作製

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かを検討するため、レンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞 (hVAFs) に T19NRhoA (Dominant Negative RhoA)、G14VRhoA (Dominant Active RhoA) を遺伝子導入した。感染効率が 60%以上であることをフローサイトメトリーで確認した後 (Figure.7A)、導入した RhoA variant が線維芽細胞で発現しているかをウェスタンブロットで検討した。G14VRhoA の過剰発現は、Total-Rho モノクローナル抗体で検出できたが、hFbs-T19NRhoA は、hFbs-Control に比べて、Total-Rho の発現が低いことが確認された (Figure.7B)。hFbs-T19NRhoA における RhoA の mRNA 発現を定量 RT-PCR で測定したところ、hFbs-Control の 61.5 倍の発現が確認された (Figure.7C)。次に、形質導入した G14VRhoA、T19NRhoA が機能しているかを検討するため、hFbs-G14VRhoA、hFbs-T19NRhoA の RhoA 活性を G-LISA を用いて検討した。その結果、hFbs-Control の発光強度を 1 としたとき、hFbs-T19NRhoA 群では  $1.28 \pm 0.01$ 、hFbs-G14VRhoA 群では  $5.96 \pm 0.01$  であった (Figure.7D)。

#### (7) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の遊走能の検討

RhoA を活性化させた線維芽細胞 (hVAFs) で、遊走能の上昇が起きているかを Chemoattractant assay で検討した。 $2.0 \times 10^5$  個の hFbs-G14VRhoA、hFbs-T19NRhoA、hFbs-Control を無血清  $\alpha$ -MEM に懸濁して、Cell Culture Insert の中央に添加した。37℃で6時間培養した後、Cell Culture Insert を通り抜けた細胞数を9視野測定した。hFbs-T19NRhoA は  $75.7 \pm 34.1$  個、hFbs-Control は  $86 \pm 7.2$  個の細胞が Insert を通り抜けたことが確認された。

一方、hFbs- G14VRhoA は  $172 \pm 36.5$  個の細胞が Insert を通り抜けていることが確認された (Figure.8)。

#### (8) RhoA を活性化した線維芽細胞による腫瘍生着促進作用

RhoA を活性化させた線維芽細胞 (hVAFs) が、腫瘍の生着に促進的に働くかを検討した。A549 と hFbs-G14VRhoA、hFbs-Control をそれぞれ  $1 \times 10^5$  個ずつ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。移植 2 週目で、A549 + hFbs-Control 群では 5/12 (腫瘍生着率 41.7%)、A549 + hFbs-G14VRhoA 群では 9/12 (腫瘍生着率 75%) の腫瘍の生着を確認した。また、移植 3 週目では、A549 + hFbs-Control 群では 9/12 (腫瘍生着率 75%) の腫瘍の生着が確認されたのに対し、A549 + hFbs-G14VRhoA 群では、12/12 (腫瘍生着率 100%) の腫瘍の生着が確認された。また、移植 4 週目において、A549 + hFbs-Control 群は、9/12 (腫瘍生着率 75%) の腫瘍しか生着していなかった (Figure.9)。



## VII. 考察

### (1) 線維芽細胞に発現する PDPN の腫瘍生着促進作用

当初、本実験では、線維芽細胞に発現する PDPN の腫瘍生着促進機構を解明するために、線維芽細胞株である KM104、MRC-5 SV-TG、IMR-90-SV を用いた。KM104-Control と KM104-PWT、MRC5-Control と MRC5-PWT を作製し、A549 と  $5 \times 10^4$  個ずつ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。移植 4 週目まで観察したものの、いずれの群でも腫瘍の生着率には差は認められなかった。また、IMR-90SV は、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入により、多くの細胞が生存できなくなり、実験に用いることが困難であった。そこで、前任者である Hoshino が扱い、PDPN の腫瘍生着促進作用があることが確認されていた初代培養線維芽細胞 (hVAFs、hCAF s) を本研究でも使用することにした。hLFs に発現する PDPN にも、腫瘍生着促進作用があることは確認されているが、hLFs に比べて内因性の PDPN を高発現する hVAFs の方が、PDPN をノックダウンする実験系にも適していると考えた。

マウスの皮下移植実験においては、線維芽細胞に PDPN を過剰発現させると腫瘍の生着を促進し、PDPN をノックダウンすると腫瘍の生着が抑制された。つまり、線維芽細胞の腫瘍生着促進能は、発現する PDPN に規定されており、線維芽細胞に発現する PDPN は腫瘍生着に関わる機能分子であることが示された。これは、Hoshino の実験結果を再現するものである。今回行った PDPN の過剰発現系 (Figure.1B)、ノックダウン系 (Figure.1D) では、 $1 \times 10^5$  の A549 と線維芽細胞をマウス皮下に移植している。しかし、PDPN の過剰発現系における A549 + hFbs-Control 群では移植 2 週目で 2/6

(腫瘍生着率 33.3%) の腫瘍しか生着していないにも関わらず、ノックダウン系における A549 + hFbs-shluc 群では移植 2 週目時点ですでに 6/6 (腫瘍生着率 100%) の腫瘍が生着している。この差は、使用したレンチウイルスベクターの違いによる可能性とも考えられた。

## (2) 腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の細胞内ドメインの重要性

① A549 には CLEC-2 が発現していないこと、② C 末端に Flag-tag をつけた PDPN を線維芽細胞に過剰発現させても、腫瘍の生着を促進しないこと (Unpublished Data) から、PDPN の細胞内ドメインが、腫瘍の生着に促進的に働く上で、重要であるとの仮説を立てた。

マウス皮下移植実験において、特に移植 2 週目時点で、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群の腫瘍生着率は、A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した。したがって、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、細胞内ドメインは重要であると考えられる。ただし、移植 2 週目以降、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群と A549 + hFbs-PWT 群の腫瘍生着率の差は縮まった。また、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も、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群と A549 + hFbs-PWT 群の間に顕著な差が認められなかった。以上から、PDPN を発現する線維芽細胞は、生着する腫瘍組織内で腫瘍の増殖性に寄与している可能性は低いと考えられる。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、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群では、A549 + hFbs-Control 群に比べて腫瘍生着率が高かった。したがって、今回の検討

から、腫瘍生着の促進には PDPN の細胞外ドメインも重要である可能性が示唆された。

### (3)腫瘍生着促進作用を保つ上での PDPN の ERM 結合ドメインの重要性

マウス皮下移植実験においては、移植 2 週目以降、A549 + hFbs-PCTQN.N 群の腫瘍生着率が、A549 + hFbs-PWT 群に比べて低値を示した。したがって、線維芽細胞に発現する PDPN の ERM 結合ドメインは、腫瘍生着を促進する上で、一部寄与していると推察された。この検討は n = 6 しか行っていない。追試を行うことが今後の課題である。

以上の動物実験から、PDPN を発現する線維芽細胞は、細胞内で ERM タンパクと結合し、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。

### (4)PDPN を発現する線維芽細胞によるコロニー形成促進能の検討

①PDPN 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、②PDPN を発現する線維芽細胞が、A549 の腫瘍生着を促進する上で、A549 と線維芽細胞以外の細胞（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。今回の検討では、A549 + hFbs-Control 群、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群、A549 + hFbs-PCTQN.N 群、A549 + hFbs-PWT 群のコロニー数に顕著な差はなかった。線維芽細胞に PDPN を過剰発現させても、A549 のコロニー形成能は上昇しないといえる。しかし、A549 + hFbs-Control 群、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群、A549 + hFbs-PCTQN.N 群、A549 + hFbs-PWT 群のコロニー数は、A549 単独群に

比べて多く、線維芽細胞そのものは、A549 のコロニー形成能を上昇させることが確かめられた。細胞が自由に運動できないアガー中で、線維芽細胞が A549 のコロニー形成能を上昇させることは、線維芽細胞が増殖因子などの可溶性因子を放出することを示唆している。また、この結果は、マウス皮下移植実験で、A549 + hFbs-Control 群の腫瘍生着率が、A549 単独移植群に比べて高いことに一致している (Figure.3B)。一方で、PDPN を発現する線維芽細胞が、A549 の腫瘍生着を促進するには、①がん細胞と線維芽細胞が自由に運動し、相互作用が可能な環境②ホストマウスの細胞③マウス皮下の特別な微小環境 のいずれかが必要条件であることが示唆された。

#### (5)PDPN を発現する線維芽細胞の RhoA 活性

PDPN は、細胞内の ERM 結合ドメインで phospho-ERM と結合し、RhoA を活性化することが報告されている [23]。PDPN に結合することにより、膜に局在した phospho-ERM は、RhoGDI (Rho GDP Dissociation Inhibitor) に結合することで、不活型の GDP-RhoA を解離させる [27,28,29]。GDP-RhoA は、GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) により活性化され、活性型の GTP-RhoA になる。さらに、RhoA のエフェクタータンパクである ROCK は、 $\text{Na}^+\text{H}^+$ 交換体を活性化し、ERM のリン酸化に働くことが報告されている [30,31]。そこで、PDPN を過剰発現させた線維芽細胞において、RhoA が活性化されているかを検討した。

hVAFs を用いて、hVAFs-PWT、hVAFs-P $\Delta$ CT、hVAFs-PCTQN.N、hVAFs-Control の RhoA 活性を測定したところ、各群で顕著な差は確認できなかった (Data not shown)。PDPN を過剰発現させた hVAFs で RhoA の活性化ができなかった原因は、0.2% Growth Factor Supplement を添加した

間葉系幹細胞増殖培地で培養したことである可能性も考えられた。そこで、タンパクライセートを回収する前日に、無血清の  $\alpha$ -MEM あるいは 10% FBS  $\alpha$ -MEM に培地交換し、同様に RhoA 活性を測定したが、いずれも各群で顕著な差は確認できなかった (Data not shown)。次に、初代培養から 10% FBS  $\alpha$ -MEM で培養した hCAFs を実験に用いた。hCAFs-PWT では hCAFs-Control に比べて、RhoA 活性が 1.85 倍上昇していた。また、hCAFs-P $\Delta$ CT や hCAFs-PCTQN.N と比べても、hCAFs-PWT の RhoA 活性は高かった。以上から、線維芽細胞においても、PDPN は細胞内で、RhoA を活性化していることが示唆された。今回の検討において、hCAFs-P $\Delta$ CT や hCAFs-PCTQN.N の RhoA 活性が、hCAFs-Control に比べて高かった理由は不明である。しかし、以下の仮説が可能性として考えられた。PDPN と同様に、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である [27,32,33,34]。Martin-Villar らは、PDPN と CD44 が協調して、遊走能の上昇に働くことを示している [22]。以上から、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、P $\Delta$ CT 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、①PDPN を介した RhoA の活性 ②PDPN 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 (Figure.6B) 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。

#### (6) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の作製

RhoA は、200 アミノ酸から成る低分子量 G タンパク質の 1 つであり、本

研究で遺伝子導入した G14VRhoA や T19NRhoA は 1 アミノ酸置換を起こした RhoA variant である。G14VRhoA は、14 番目の Guanine が Valine に置換されており、この point mutation は nucleotide binding pocket 中にある。G14VRhoA は、GTP の加水分解を妨害することで Dominant Active 効果を示す [35]。一方、T19NRhoA は、19 番目の Threonine が Asparagine に置換されており、GEF と強固に結合するため、内因の RhoA と GEF の結合に競合し、Dominant Negative 効果を示す [36]。Total Rho モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットでは、遺伝子導入された G14VRhoA を検出することができた。しかし、線維芽細胞に T19NRhoA を遺伝子導入しても、Total Rho の発現上昇を認めなかった。また、C 末端を認識する複数の Total Rho モノクローナル抗体や Total Rho ポリクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロットを試行したが、結果は同様に、Total Rho の発現上昇を確認できなかった (Data not shown)。一方で、hFbs-T19NRhoA における RhoA の発現を定量 RT-PCR で測定したところ、hFbs-Control に比べて、顕著に発現が上昇していたことから、T19NRhoA の遺伝子導入は成功しているとみられる。以上から、T19NRhoA はタンパクに翻訳されると同時に、何らかの機構で分解されている可能性も否定できない。次に、G-LISA を用いて、hFbs-G14VRhoA、hFbs-T19NRhoA の RhoA 活性を測定した結果、hFbs-G14VRhoA で顕著に RhoA 活性が上昇していることが確認された。一方で、hFbs-T19NRhoA における RhoA 活性は hFbs-Control と有意な差を認めず、我々が使用した系では、T19NRhoA が Dominant Negative 体として機能していることを証明できなかった。

#### (7) 恒常活性化型 RhoA を発現する線維芽細胞の遊走能の検討

RhoA の活性化は、細胞接着斑やストレスファイバーの形成につながるということが知られている。GTP 結合型の RhoA は、ROCK や mDia といったエフェクタータンパクに結合する [37,37,39]。ROCK を介する Actomyosin の収縮は、移動する細胞における rear の乖離を促進する [40,41]。また、mDia は、進展縁でアクチンフィラメントの重合を促進することで、細胞体の牽引に働く [42]。今回の検討においては、RhoA 活性の高い hFbs-G14VRhoA の遊走能が、hFbs-T19NRhoA、hFbs-Control に比べて、顕著に亢進していた。また、RhoA 活性に Dominant Negative 効果を認められなかった hFbs-T19NRhoA は、hFbs-Control と比べて、遊走能に顕著な差は見られなかった。以上から、形質導入した T19NRhoA は、線維芽細胞において機能していない可能性も考えられたが、G14VRhoA は機能していることが確かめられた。

#### (8) RhoA を活性化した線維芽細胞による腫瘍生着促進作用

マウス皮下移植実験において、移植 2 週目、移植 3 週目で、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。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。この分子機構は、マウス皮下移植実験 (Figure.3)、Colony Assay (Figure.5)、Chemoattractant Assay (Figure.8) の考察から、以下の仮説を立てた。マウス皮下移植実験の考察において、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可能性を示唆した。また、Colony Assay の考察では、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、線維芽細胞の RhoA 依存的な運動が、がん細胞の生着に貢献している可能性が示唆された。Gaggoli らは、線維芽細胞が Rho 依存的に細胞収縮し、マトリックス中にトラックを形成することで、がん細胞の浸潤を直接的に先導することを *in vitro* の実験系で示している [18]。また、Shieh らは、Rho を介して線維芽細胞が細胞収縮することによって、ECM を刺激し、腫瘍細胞の浸潤能を高めることを報告している [43]。さらに、最近の研究において、Goetz らは、RhoA を活性化した線維芽細胞が、細胞外マトリックスを再構成し、腫瘍の生着を促進する可能性を示した [44]。Lopez らは、線維芽細胞が、Rho を介して、細胞外マトリックスを再構成することにより、がん細胞の生存、増殖、浸潤を制御していることを報告している [45]。

本研究においても、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 依存的に収縮し、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。



## VIII. 結論

線維芽細胞が腫瘍の生着を促進する機構としては、線維芽細胞が可溶性因子を放出することにより、腫瘍細胞の生存 / 増殖に促進的に働くと考えるのが一般的であった。本研究では、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可能性を示した (Figure.10)。本研究の画期的な点は、がん微小環境を構成する間質細胞の運動性の変化により、物理的 / 機械的に腫瘍の生着を促進する可能性を示唆した点にある。腫瘍組織における間質の運動エネルギー（流動性）が、がん患者の予後に相関する可能性もあり、病理学の新たな境地への飛躍につながると考える。

## IX. 今後の予定

今回の検討では、線維芽細胞に発現する PDPN の細胞内ドメインが、腫瘍生着に促進的に働く可能性を検討した。Martin-Villar らは、細胞外ドメインの欠損した PDPN (P $\Delta$ EC) を MDCK 細胞に遺伝子導入しても、ERM と結合することを示しており、PDPN が RhoA を活性化する上で、PDPN の細胞外ドメインは必要ないと考えられる。しかし、マウス皮下移植実験 (Figure.3) で考察した通り、PDPN の細胞外ドメインも、腫瘍生着を促進している可能性がある。考えられる一つ目の仮説としては、(Figure.6) の考察で述べたように、PDPN と CD44 が細胞外で結合し、CD44 の ERM 結合が強くなることで、RhoA 活性が上昇した可能性である。この場合、腫瘍生着を促進する PDPN の機能を RhoA の活性化機構に収束することができる可能性もある。P $\Delta$ CT を線維芽細胞に遺伝子導入した後、CD44 で免疫沈降し、結合する ERM タンパクが上昇しているかを確認すれば、この仮説が正しいか検討できる。二つ目の仮説としては、線維芽細胞に発現する PDPN の PLAG ドメインに血小板が凝集し、血小板から増殖因子が放出されることで、腫瘍細胞の生存、生着に促進的に働いた可能性である。この場合、PLAG ドメインにアミノ酸置換を入れた PDPN (T34A、T52A) を線維芽細胞に遺伝子導入し、PWT を遺伝子導入した線維芽細胞と腫瘍生着促進能を比較すれば、仮説が正しいか検証することができる。三つ目の仮説としては、PDPN に対するリガンドが存在し、PDPN を介して線維芽細胞内にシグナルが入ることで、増殖因子を放出し、腫瘍の生着に促進的に働いた可能性である。ただしこの場合、線維芽細胞に遺伝子導入した P $\Delta$ CT は、内因の PDPN に対して、Dominant Negative に働くと考えられる。しかし、

マウス皮下移植実験 (Figure.3B) の結果は、A549 + hFbs-P $\Delta$ CT 群は、A549 + hFbs-Control 群に比べて腫瘍生着率が高く、この仮説は信憑性が低いと考えられる。また、Colony Assay (Figure.5) においても、PDPN を発現する線維芽細胞が、可溶性因子を放出することで、がん細胞の増殖に影響を与える可能性は低いと考察している。最後の仮説としては、線維芽細胞に発現する PDPN がリガンドとして働き、レセプターを介して腫瘍細胞内にシグナルが入ることで、腫瘍細胞の生存、生着に関わった可能性である。ただし、Hoshino らが、PDPN を過剰発現させた線維芽細胞上に、がん細胞を播種する実験系で、がん細胞の増殖能が上昇しないことを確かめているので、この仮説も信憑性は高くないと考える。以上の仮説を検討し、腫瘍生着を促進する上で PDPN の細胞外ドメインも重要であるかに迫ることが、今後の課題である。

## X. 参考論文

1. Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer 6(5): 392-401.
2. Tlsty, T. D. and L. M. Coussens (2006). "Tumor stroma and regulation of cancer development." Annu Rev Pathol 1: 119-150.
3. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
4. Folkman, J. (1982). "Angiogenesis: initiation and control." Ann N Y Acad Sci 401: 212-227
5. Morrissey, C. and R. L. Vessella (2007). "The role of tumor microenvironment in prostate cancer bone metastasis." J Cell Biochem 101(4): 873-886.
6. Patocs, A., L. Zhang, et al. (2007). "Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases." N Engl J Med 357(25): 2543-2551.
7. Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." Nature 454(7203): 436-444.
8. Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen, et al. (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(2): 859-873.
9. Bauer, M., G. Su, et al. (2010). "Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast." Oncogene 29(12): 1732-1740.
10. Ishii, G., T. Sangai, et al. (2003). "Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction." Biochem Biophys Res Commun 309(1): 232-240.
11. Ishii, G., T. Sangai, et al. (2005). "In vivo and in vitro characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma." Int J Cancer 117(2): 212-220.
12. Sangai, T., G. Ishii, et al. (2005). "Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma." Int J Cancer 115(6): 885-892.
13. Quante, M., S. P. Tu, et al. (2011). "Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth." Cancer Cell 19(2): 257-272.
14. Ishii, G., H. Hashimoto, et al. (2010). "Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts." Int J Oncol 37(2): 317-325.
15. Nakagawa, H., S. Liyanarachchi, et al. (2004). "Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles." Oncogene 23(44): 7366-7377.
16. Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast

- carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." Cell 121(3): 335-348.
17. Stuelten, C. H., S. DaCosta Byfield, et al. (2005). "Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta." J Cell Sci 118(Pt 10): 2143-2153.
  18. Gaggioli, C., S. Hooper, et al. (2007). "Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells." Nat Cell Biol 9(12): 1392-1400.
  19. Atsumi, N., G. Ishii, et al. (2008). "Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431." Biochem Biophys Res Commun 373(1): 36-41.
  20. Sugimoto, Y., M. Watanabe, et al. (1991). "Suppression of experimental lung colonization of a metastatic variant of murine colon adenocarcinoma 26 by a monoclonal antibody 8F11 inhibiting tumor cell-induced platelet aggregation." Cancer Res 51(3): 921-925.
  21. Kunita, A., T. G. Kashima, et al. (2007). "The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis." Am J Pathol 170(4): 1337-1347.
  22. Martin-Villar, E., B. Fernandez-Munoz, et al. (2010). "Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration." Mol Biol Cell 21(24): 4387-4399.
  23. Martin-Villar, E., D. Megias, et al. (2006). "Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition." J Cell Sci 119(Pt 21): 4541-4553.
  24. Kawase, A., G. Ishii, et al. (2008). "Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma." Int J Cancer 123(5): 1053-1059.
  25. Hoshino, A., G. Ishii, et al. (2011). "Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma tumor formation: podoplanin in fibroblast functions for tumor progression." Cancer Res 71(14): 4769-4779.
  26. Hoshino, A., H. Chiba, et al. (2008). "Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells." Biochem Biophys Res Commun 368(2): 305-310.
  27. Hirao, M., N. Sato, et al. (1996). "Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway." J Cell Biol 135(1): 37-51.
  28. Hamada, K., A. Seto, et al. (2001). "Crystallization and preliminary crystallographic studies of RhoGDI in complex with the radixin FERM domain." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57(Pt 6): 889-890.
  29. Takahashi, K., T. Sasaki, et al. (1997). "Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein." J Biol Chem 272(37): 23371-23375.
  30. Tominaga, T., T. Ishizaki, et al. (1998). "p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H

- exchange." *EMBO J* 17(16): 4712-4722.
31. Denker, S. P., D. C. Huang, et al. (2000). "Direct binding of the Na<sup>+</sup>-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H<sup>+</sup> translocation." *Mol Cell* 6(6): 1425-1436.
  32. Tsukita, S., K. Oishi, et al. (1994). "ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons." *J Cell Biol* 126(2): 391-401.
  33. Lee, J. H., T. Katakai, et al. (2004). "Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation." *J Cell Biol* 167(2): 327-337
  34. Fujita, Y., M. Kitagawa, et al. (2002). "CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect." *FEBS Lett* 528(1-3): 101-108.
  35. Ihara, K., S. Muraguchi, et al. (1998). "Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue." *J Biol Chem* 273(16): 9656-9666.
  36. Wei, Y., Y. Zhang, et al. (1997). "Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications." *Nat Struct Biol* 4(9): 699-703.
  37. Narumiya, S., M. Tanji, et al. (2009). "Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion." *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2): 65-76.
  38. Leung, T., E. Manser, et al. (1995). "A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes." *J Biol Chem* 270(49): 29051-29054.
  39. Watanabe, N., P. Madaule, et al. (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." *EMBO J* 16(11): 3044-3056.
  40. Worthylake, R. A., S. Lemoine, et al. (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." *J Cell Biol* 154(1): 147-160.
  41. Worthylake, R. A. and K. Burridge (2003). "RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions." *J Biol Chem* 278(15): 13578-13584.
  42. Yamana, N., Y. Arakawa, et al. (2006). "The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src." *Mol Cell Biol* 26(18): 6844-6858.
  43. Shieh, A. C., H. A. Rozansky, et al. (2011). "Tumor cell invasion is promoted by interstitial flow-induced matrix priming by stromal fibroblasts." *Cancer Res* 71(3): 790-800
  44. Goetz, J. G., S. Minguet, et al. (2011). "Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis." *Cell* 146(1): 148-163.

45. Lopez, J. I., J. K. Mouw, et al. (2008). "Biomechanical regulation of cell orientation and fate." Oncogene **27**(55): 6981-6993.

## XI. 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心なご指導と御高配を賜りました東京大学新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野教授 兼 国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部長 落合淳志教授に御礼申し上げます。

終始にわたり、有益な御指導と御助言を賜りました国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部 石井源一郎先生に深謝致します。

研究や発表に際し、親身に御指導を賜りました国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部 橋本弘子様、小林真季博士に御礼申し上げます。至らぬ点が多々あったにも関わらず、多くの時間を割いて丁寧な御指導、有益な御助言を戴いたことを心から感謝致します。

本研究を遂行する上で、親身に御指導、御協力を戴いた国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部 星野歩子博士、厚海奈穂博士、桑田健先生、牧野嶋秀樹博士、山内稚佐子先生、藤井誠志先生、千葉政子様、小嶋基寛先生、祢里真也先生に御礼申し上げます。

また、研究生活を支えてくださった臨床腫瘍病理部の皆様感謝致します。

心から尊敬できる先生、先輩方に恵まれ、2年間充実した研究生活を送れたことを幸せに思います。

2012 年 春