

博士論文

生物発光イメージングを応用した
がん細胞移植モデルにおける腫瘍微小環境の解析

高橋 恵生

目次

第1章 研究背景と目的.....	2
第2章 マウス乳がん細胞移植モデルを用いた炎症反応の時空間的解析	
要旨.....	8
序論.....	9
方法.....	12
結果.....	15
考察.....	24
第3章 ヒト膵臓がん細胞移植モデルを用いた腫瘍微小環境での獲得形質の解析	
要旨.....	28
序論.....	29
方法.....	32
結果.....	37
考察.....	51
第4章 高悪性株を用いた膵がん進展における悪性化因子の探索	
要旨.....	54
序論.....	55
方法.....	57
結果.....	60
考察.....	68
第5章 結語.....	70
参考文献.....	71

第1章 研究背景と目的

はじめに

「がん」は日本人の死因の約3分の1を占めており、その割合は年々増加傾向にある。がんによる死亡の直接的な原因は、原発巣の進展によるもののみならず、進行期に生じる転移である。早期診断技術や外科的手術の進歩、抗体医薬をはじめとした分子標的治療薬の開発などにより、がんの進行をコントロールすることができる症例や根治する症例が増えてきている。一方で、治療後の再発・転移により予後不良となる症例も未だ多いことも事実である。こうした状況を打開するために、新たな治療標的として、がん細胞とその周囲の微小環境すなわち「腫瘍微小環境」が着目され、そのがんの進展における役割についての詳細な理解が期待されている。

腫瘍微小環境の役割

腫瘍はがん細胞のみならず、マクロファージや線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球などさまざまな種類の間質細胞によって構成されている¹⁻³(図1)。このようながん細胞を取り囲む微小環境は「腫瘍微小環境」と呼ばれており、近年新たながん治療の標的として注目されている。腫瘍微小環境下では、さまざまな種類の細胞間での直接的な相互作用に加え、サイトカインやケモカインといった液性因子を介した間接的な相互作用が活発であり、これらの相互作用ががんの進展に寄与しているという報告が多数なされている^{1,4-6}。例えば、腫瘍内に存在する線維芽細胞ががん細胞の増殖や血管新生を促進するという報告や⁷、腫瘍内に浸潤してきたマクロファージが免疫抑制作用を示すといった報告などが挙げられる⁸。このようながん細胞と間質細胞との相互作用に着目した治療薬の開発も進んでおり、代表的な例としてVascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)を介した血管新生を阻害する薬剤などが挙げられる^{2,9,10}。一方で、がん細胞の浸潤能に重要であると考えられているマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase; MMP) に対する阻害剤など、基礎研究を通して想定された効果が臨床的には認められない薬剤も少なくない⁹。十分な効果が得られない理由として、病態の進行に従い、標的である腫瘍微小環境を構成する細胞が複雑に変化することや、その変化に伴ってがん細胞の獲得形質が多様化していることが挙

げられる¹ (図 2)。がん細胞の化学療法抵抗性の獲得を含め、腫瘍微小環境ががんの悪性化に寄与していることは広く認識されてはいるものの、実際の生体内におけるその役割については不明な点も未だ多い。このような現状から、腫瘍微小環境の役割を理解し、それを制御することが新たな治療へとつながるとして期待されている。

がん細胞移植モデル

従来から、がん転移のメカニズム解析や抗がん剤の有用性評価を行うために、マウス由来もしくはヒト由来の培養がん細胞を実験動物であるマウスへと移植し、腫瘍の増殖や転移を観察するがん細胞移植モデルが利用されてきた¹¹。最もよく汎用されるがん細胞移植モデルとして、がん細胞をマウスの皮下組織へと移植する皮下移植モデルが挙げられる。このモデルは移植の手技が簡便であり、再現性が高く、腫瘍体積の評価が容易であることから広く使用されている¹² (表 1)。しかしながら、乳がんや膵がん、肺がんなどは皮下組織に発生する腫瘍ではないことから、このようにがん細胞を由来組織と異なる組織へと移植するモデルは「異所性移植」と呼ばれている。しかし、異所性移植では、各種がん特異的な腫瘍微小環境を再現することは困難であることから、がん細胞を由来組織へと移植する「同所性移植」の重要性が再認識されるようになった。皮下移植と比較すると、同所性移植の場合は深部臓器に移植を行う必要があるため、高度な技術を要することや、形成された腫瘍の観察が困難であることなど、不便な点も多い。しかし、このモデルではがん細胞と同じ組織の間質細胞との相互作用を再現できることから、より本来の病態に近い条件で解析ができると考えられている¹²⁻¹⁵ (表 1)。また、生物発光イメージングをはじめとした非侵襲的な可視化技術が進歩し、宿主生体内における腫瘍増殖の観察が可能となった。それに伴い、より実際の病態に近いモデルである同所性移植が、抗がん剤の評価をはじめとした多くの実験に用いられるようになってきている。

生物発光イメージング

近年、生体内を観察する技術は各研究分野において目覚ましい発展を遂げ、生きたままの動物から多くの情報を得られるようになってきた。中でも光を使ったイメージングは人体への影響を伴う放射性同位体などを用いることなく、簡便かつ安全に使用できることから

汎用されつつある。光を検出するイメージングは、Green fluorescent protein (GFP) をはじめとした蛍光タンパクを使用した蛍光イメージングと、ルシフェラーゼとルシフェリンの酵素-基質反応を利用して生じる酵素発光を捉える発光イメージングに分けられる。いずれの方法も動物を生きのまま観察することができるため、同一個体における経時的かつリアルタイムでシグナルを可視化する非侵襲的な手法である。発光イメージングはホタル由来ルシフェラーゼを使用したものが主流であるが、それ以外にもウミシイタケ由来ルシフェラーゼを使用する場合もある。ホタルルシフェラーゼは ATP、酸素およびマグネシウム存在下でルシフェリンと反応し、562 nm をピークとした光を生じる。この発光シグナルは細胞が持つ自家蛍光と異なる波長をもつため、シグナルの減弱が少なく、高感度である。

本研究の目的

「がん細胞移植モデルに生物発光イメージングを応用することで、腫瘍微小環境ががん細胞に及ぼす変化を理解し、新たな治療戦略の創出を目指す」

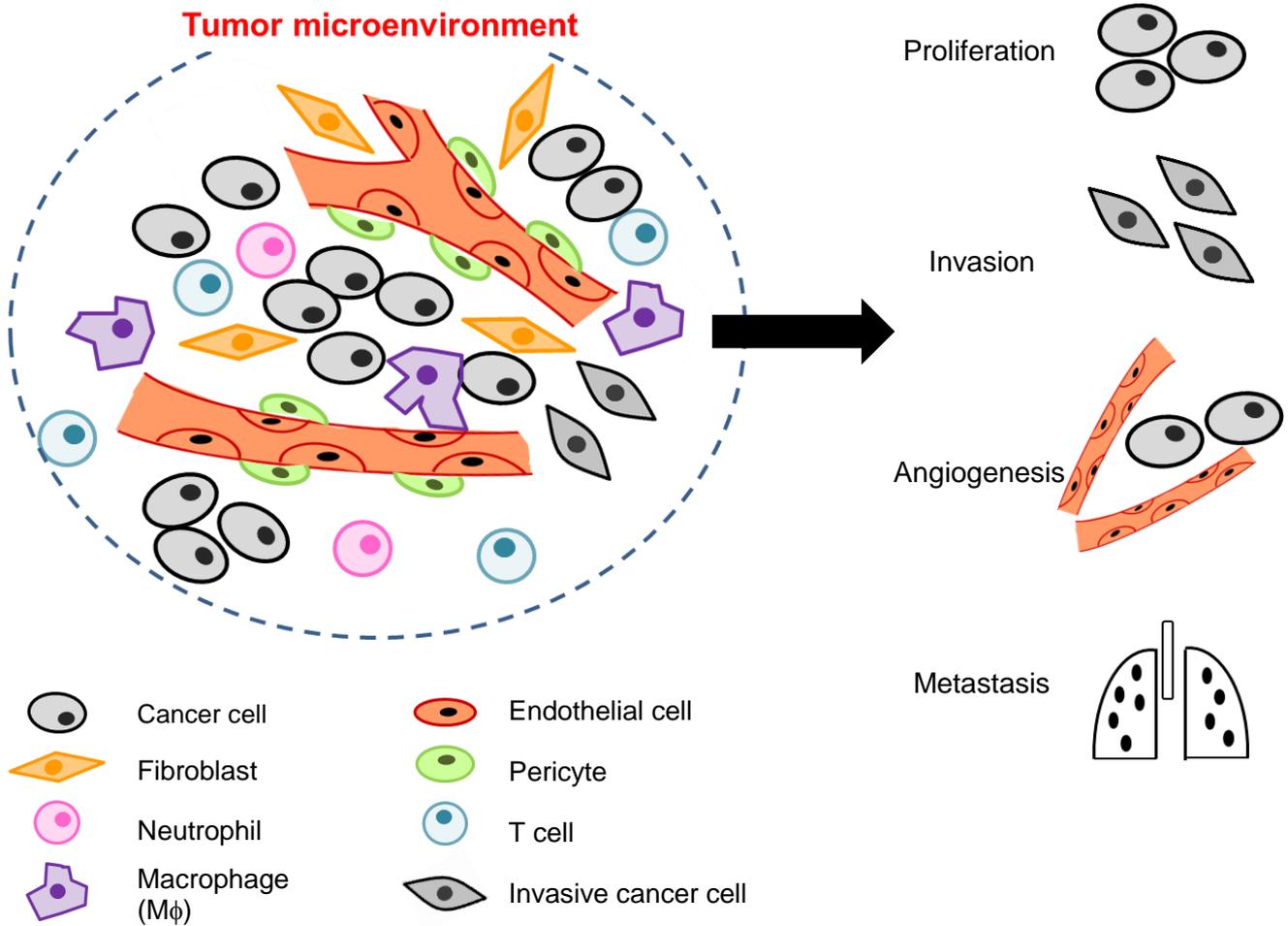
なお、短期的には以下を目標とする。

腫瘍微小環境下でのがん細胞に着目し、

「①炎症反応の経時的変化の解析」

「②獲得形質の解析」

を行う。



Modified from Hanahan D and Weinberg RA, *Cell*, 2011

図 1. 腫瘍微小環境

腫瘍はがん細胞に加え、マクロファージやT細胞、さらには線維芽細胞など種々の細胞から構成されており、このようながん細胞を取り巻く環境は腫瘍微小環境と呼ばれている。腫瘍微小環境内のさまざまな細胞間での相互作用が増殖、浸潤、血管新生、転移といったがんの悪性化に寄与していることが示唆されている。

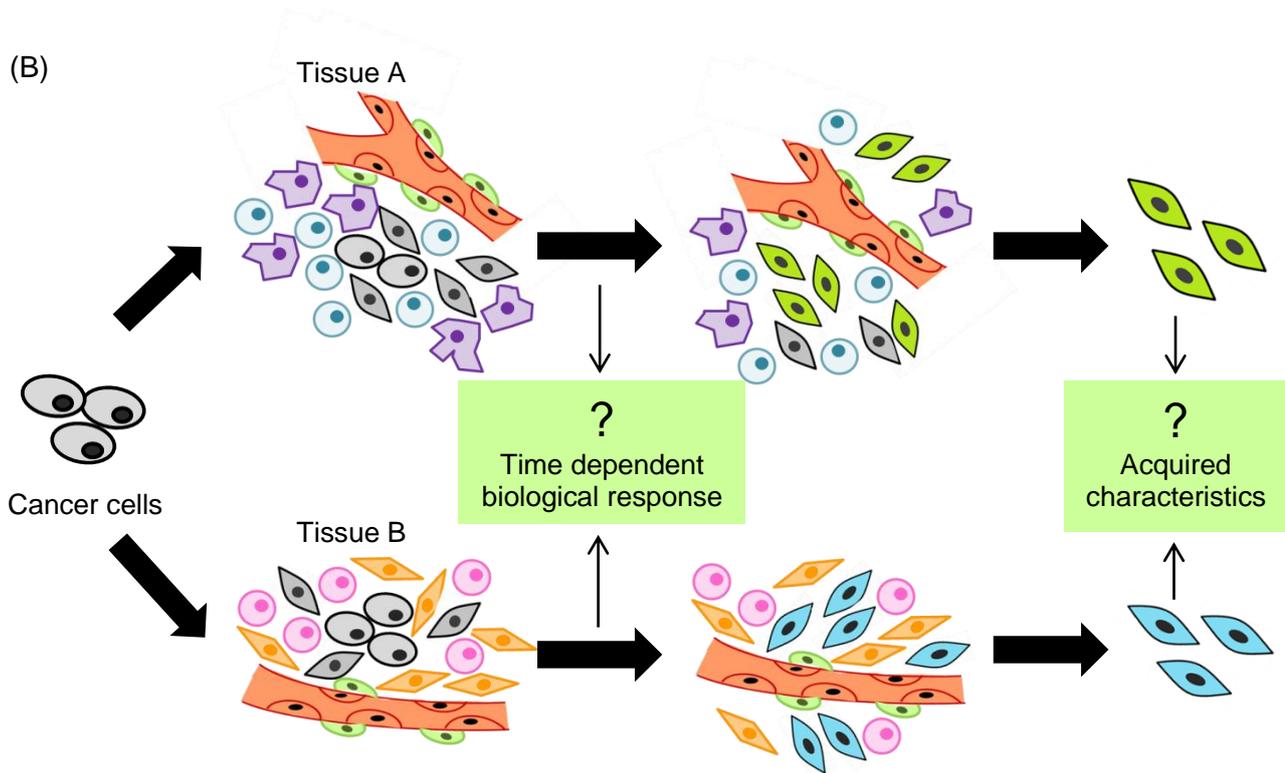
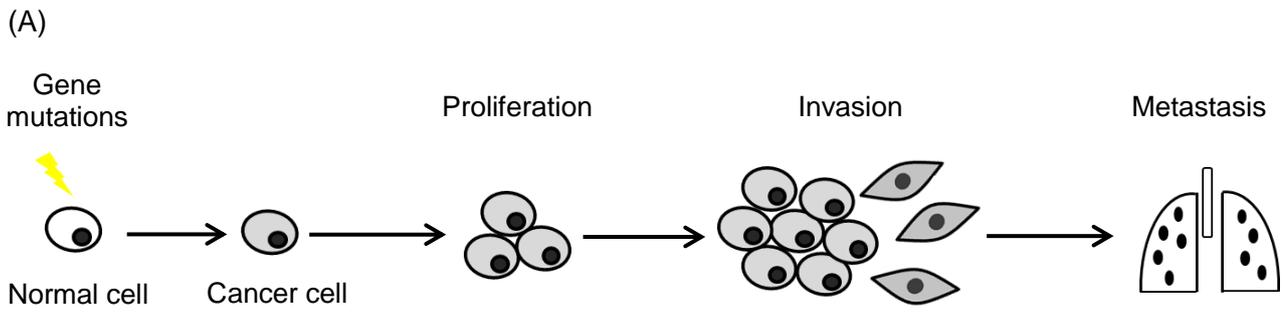


図 2. 病態の進行に伴う腫瘍微小環境の変化

腫瘍は増殖、浸潤、転移といったプロセスを経て、進展する (A)。その各プロセスでは腫瘍微小環境も変化すると考えられているが、経時的な変化や組織の違いによる獲得形質の変化などは未だ不明な点が多い (B)。

	Ectopic inoculation (Subcutaneous)	Orthotopic inoculation
Technical skills of inoculation	Easy	Difficult
Detection of tumor volume	Easy	Difficult
Frequencies of metastasis	Low	High
Reproducibility	High	Not high
Analysis in original tumor microenvironment	Inappropriate	Appropriate

表 1. 異所性移植モデルおよび同所性移植モデル

由来組織とは異なる組織へのがん細胞の移植は異所性移植 (Ectopic inoculation) モデルと呼ばれ、皮下移植モデルがその代表である。またがん細胞を由来組織へと移植するモデルは同所性移植 (Orthotopic inoculation) モデルと呼ばれる。表ではそれぞれのモデルの特徴を示す。

第2章 マウス乳がん細胞移植モデルを用いた炎症反応の時空間的解析

要旨

乳がんでは原発腫瘍における炎症が転移に寄与していると考えられているが、生体内における炎症性微小環境の形成の時空間的な解析は行われていない。そこで本章では、マウス乳がん細胞 4T1 を用いた移植モデルに生物発光イメージングを応用し、経時的な炎症反応の可視化を試みた。その結果、4T1 細胞の由来組織である乳腺脂肪組織へ同所性移植を行った場合、移植後早期に一過性の強い炎症反応が認められた。一方で皮下組織への異所性移植の場合には、このような炎症反応は観察されなかった。さらに乳腺脂肪移植特異的な炎症反応の発生機序を解析した結果、T 細胞による免疫応答依存的な反応であることがわかった。また、皮下移植の場合に比較して、同所性移植では MIP-1、IL-1 といった炎症性メディエーターの産生やマクロファージの浸潤が亢進していることが示唆された。以上の結果から 4T1 細胞の乳腺脂肪移植モデルでは、移植後早期に炎症反応が生じることが明らかとなった。さらにこの炎症反応の形成には T 細胞に加え、マクロファージを含む乳腺脂肪組織の間質とがん細胞の相互作用が不可欠であることが示唆された。

序論

がんの進展において、腫瘍微小環境が重要な役割を果たしていると考えられているが、その中でも宿主免疫担当細胞とがん細胞の相互作用から生じる炎症反応が注目されている。19世紀に Rudolf Virchow が腫瘍内にリンパ球が存在することを明らかにして以来、炎症とがんの関係については長年解析がなされてきた^{3, 16, 17}。がん細胞に対する宿主免疫応答は、がん細胞を異物と認識して排除しようとする腫瘍抑制的な側面を持つ一方、がん細胞の増殖や浸潤転移、さらには血管新生を誘導する腫瘍促進的な側面も持ち、その役割に二面性を示す。近年の報告から、炎症性の免疫応答が種々のがんにおいて、発がんや病態の悪性化、さらには化学療法抵抗性に寄与していることがわかってきている¹⁸⁻²⁰。がんの悪性化に寄与している炎症の種類もさまざま、肥満や喫煙といった生活習慣によって引き起こされるものや^{21, 22}、ヘリコバクターピロリや肝炎ウイルス、パピローマウイルスなどの感染による慢性的な炎症^{23, 24}、さらには放射線照射や化学療法による組織損傷に起因するものなどが挙げられる³。

乳がんに関しても慢性炎症ががんの再発と関係しているとの報告や²⁵、血液中の炎症性メディエーターの濃度が予後と逆相関しているといった報告などがあり、炎症の腫瘍促進的な作用が指摘されている²⁶。乳がんは世界的に女性の罹患率が最も多いがんであり、日本では毎年1万人以上の方が亡くなっている²⁷ (<http://ganjoho.jp>)。診断技術の発達によって早期発見が可能となっており、5年生存率も上昇しているが、一方で再発や転移が起こる例も少なくない。また、乳がんでの腫瘍微小環境の形成には、線維芽細胞やマクロファージ、脂肪細胞 (アディポサイト) が深く関わっていると考えられており、さらにはそれらの相互作用が腫瘍局所での炎症反応を惹起し、転移を促進しているとの見方もある。このように炎症の乳がんへの寄与は多く報告されているものの、一方でその炎症性微小環境の形成過程について経時的な観察はこれまでほとんど行われていない。

転写因子 Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) は炎症性メディエーターの制御を介して、炎症反応促進の中核を担っている^{3, 28-31}。当初、NF- κ B は B 細胞の核内にて免疫グロブリン κ 鎖のエンハンサーへ結合するタンパク複合体として発見されたが、現在ではほとんどすべての細胞に発現しており、多様な生物学的機能を担っていることが知られている³²。またマウス肝臓がんモデルおよび大腸がんモデルにおいて NF- κ B ががんと炎症を関連づける分子として初めて認識されて以来、NF- κ B は炎症を制御

し、がんの悪性化に寄与する代表的な転写因子とされている³³⁻³⁵。NF- κ B を活性化するシグナル伝達経路としては Canonical 経路と Non-canonical 経路の二つが存在する^{30, 36} (図 3)。Canonical 経路は Tumor necrosis factor- α (TNF- α) や Interleukin (IL) -1 などの炎症性サイトカインによる刺激、感染や DNA 損傷などにより、受容体を介して活性化される。TNF- α などのサイトカインが受容体へ結合すると、Inhibitor of nuclear factor κ -B (I κ B) kinase (IKK) 複合体 (IKK α 、IKK β および IKK γ) が活性化され、I κ B をユビキチン化により分解する。I κ B と複合体を形成していた p65 と p50 は I κ B が分解された後、核内へと移行し、下流の遺伝子の発現を誘導する。Non-canonical 経路ではリンフォトキシン β (Lymphotoxin- β ; LT- β) などが活性化に関与していると考えられており、LT- β が受容体に結合した後、NF- κ B inducing kinase (NIK) により活性化された IKK 複合体 (IKK α) により p100 がリン酸化され、p52 への分解が起こる。その後、p52 と RelB の複合体が核へと移行し、遺伝子発現を誘導する。Canonical 経路では NF- κ B が活性化されると Cyclooxygenase 2 (COX2) や Inducible nitric oxide synthase (iNOS)、IL-6 といった炎症性メディエーターに加え、細胞の生存に関わる Cellular inhibitors of apoptosis (cIAPs) や B-cell lymphoma 2 (BCL2)、細胞浸潤に関わる MMP-9、さらには血管新生に関わる Vascular endothelial growth factor (VEGF) や Chemokine receptor type 4 (CXCR4) などのがん細胞の転移に関係する様々な遺伝子の発現が誘導される^{28, 30, 31}。このように NF- κ B は炎症とがんを関連付ける重要な転写因子であり、この活性が炎症の一つの大きな指標となる。

本章では転写因子 NF- κ B の活性を炎症のセンサーとした生物発光イメージングを用いて、マウス乳がん細胞 4T1 の移植モデルでの炎症反応を時空間的に可視化することを試みた。さらにはがん細胞を取り囲む組織が炎症反応の経時的変化にどのような違いをもたらすか、皮下移植と乳腺脂肪移植の二つのモデルを用いて観察することとした。

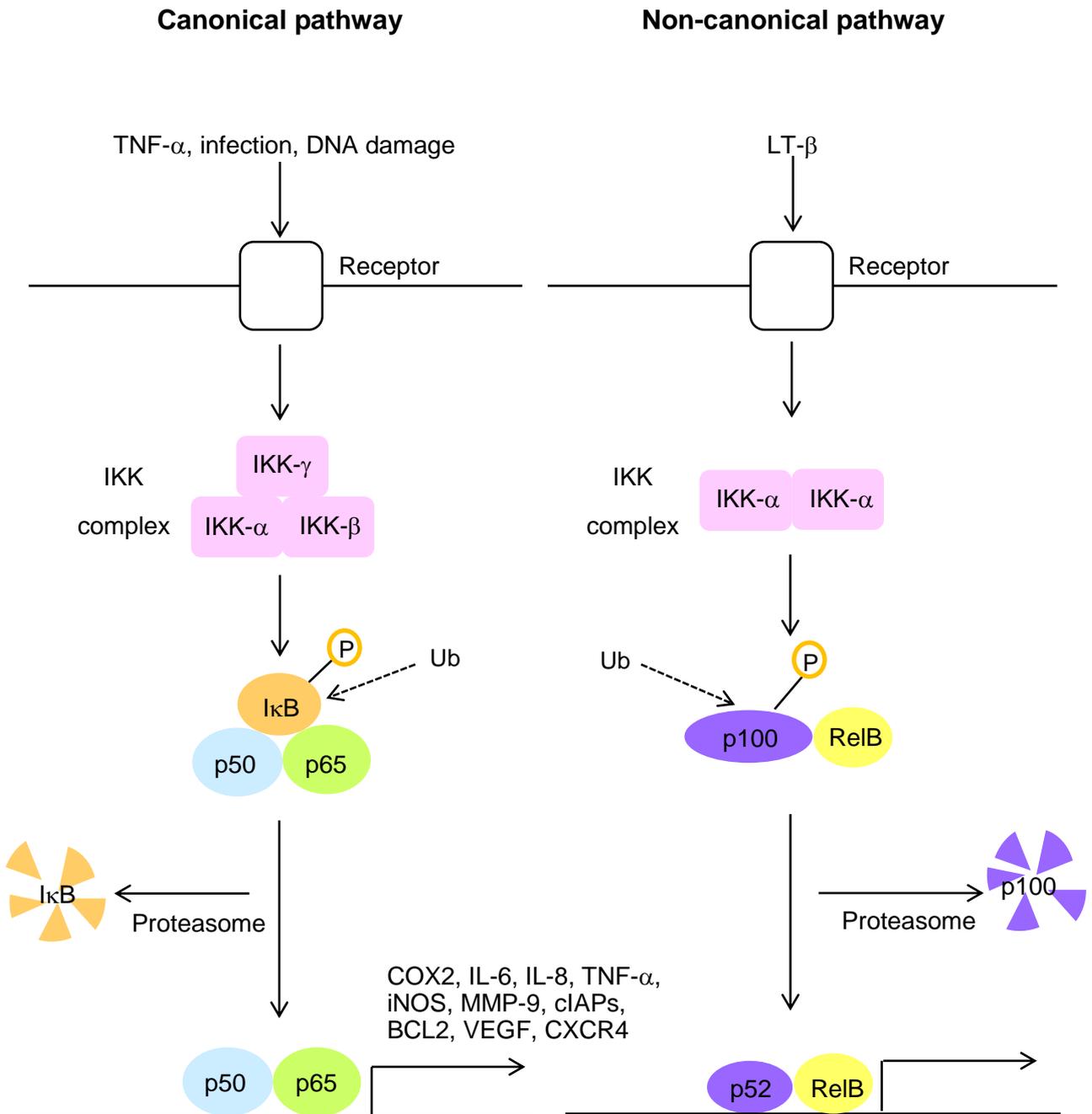


図 3. 転写因子 NF- κ B の活性化経路

TNF- α や DNA 損傷によって活性化される **Canonical** 経路と、LT- β などによって活性化される **Non-canonical** 経路の二つが存在する。**Canonical** 経路では I κ B が IKK 複合体によってリン酸化を受けてユビキチン化された後、プロテアソームによる分解を受ける。その後、p50-p65 複合体が核へと移行し、転写活性が起こる。また、**Non-canonical** 経路においては p100 が IKK 複合体によりリン酸化を受けて、ユビキチン化された後、プロテアソーム依存的に分解を受け p52 となる。その後 p52-RelB 複合体が核へと移行し、転写を調節する。

方法

細胞

マウス乳がん細胞 4T1 は 0.03% L-glutamine、0.01 M HEPES、0.2% NaHCO₃ および 10% Fetal calf serum (FCS) 含有 RPMI1640 (日水) 培地で 37°C 5% CO₂ 下にて培養し、0.05% Trypsin-0.02% EDTA-PBS により継代した。

ルシフェラーゼ安定発現細胞株 (4T1-CMV および 4T1-NF-κB) の樹立

マウス乳がん細胞 4T1 に CMV プロモーター下流もしくは転写因子 NF-κB レポーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定発現した細胞株を作製した。はじめに 4T1 細胞を 6 well plate に播種し (5 x 10⁵ cells/well)、翌日に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] (Promega) もしくは pGL4.32 [luc2/NF-κB-RE/Hygro] (Promega) のトランスフェクションを行った。培養開始後 1~2 日から 100 μg/ml Hygromycin B (Nacalai Tesque) を使用し、安定発現細胞の薬剤選択を行った。さらに限界希釈法を用いて、シングルコロニーを取得し、安定発現細胞株 (4T1-CMV および 4T1-NF-κB) を樹立した。なお、樹立した各安定発現株を 96 well black plate に播種し、ルシフェリン (Promega) を加えた後、マルチプレートリーダー (2030 ARVO X, Perkin Elmer) によって発光活性を測定し、細胞数と相関があることを確認した (図 4 (A), (B))。また樹立した安定発現株を TNF-α (100 ng/ml) で 6 時間刺激した後、4T1-NF-κB 細胞特異的にルシフェラーゼ活性が上昇することを確認した (図 4 (C))。

マウスへのがん細胞移植および発光活性の経時的変化の観察

全ての動物実験は東京大学大学院薬学系研究科実験動物委員会の定める指針、および富山大学実験動物委員会の定める指針に従った。樹立した安定発現細胞 4T1-CMV もしくは 4T1-NF-κB を使用し、同系マウス BALB/cAJcl (BALB/c, ♀ 6w 日本クレア)、BALB/cAJcl-nu/nu (nude, ♀ 6w 日本クレア)、C.B-17/Icr-scid (SCID, ♀ 6w 日本クレア) の背部皮下組織もしくは由来組織である乳腺脂肪組織へ移植した。移植後、経時的に IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences) により発光活性を測定し、発光イメージを撮影した。毎回の撮影 15 分前にマウスに D-ルシフェリン (150 mg/kg, Promega) を腹腔内投与した。撮影および測定中、マウスに 2.5% イソフルランによる吸入麻酔を行い、体温保持のためステージは

37°Cに設定した。またデータ解析は Image Software (Caliper Life Sciences) により行った。発光活性の経時変化については各個体の移植後 0 日の発光活性を基準とした各時点の相対的な発光活性を算出した。

炎症性サイトカインの測定

4T1-NF- κ B 細胞を BALB/c マウスの背部皮下組織もしくは乳腺脂肪組織へと移植した。移植後 7 日に原発腫瘍を摘出し、腫瘍を細かく刻んだ後、2 mg/ml コラゲナーゼ (Roche Diagnostics) および 0.1 mg/ml DNase I (Roche Diagnostics) を含んだ RPMI1640 に入れ、37°C で 1 時間インキュベートした。さらにメッシュを通過させた後、ディッシュにて 24 時間 37°C で培養した。培養後、上清を回収し、-80°C に保存した。炎症性サイトカインの測定は HOPLEX Analyte Kit (Mouse Inflammation 17-Plex, Collector) を使用し、プロトコールに従って測定した。また、解析は Beadlogic Software (Inivai Technologies) を使用した。

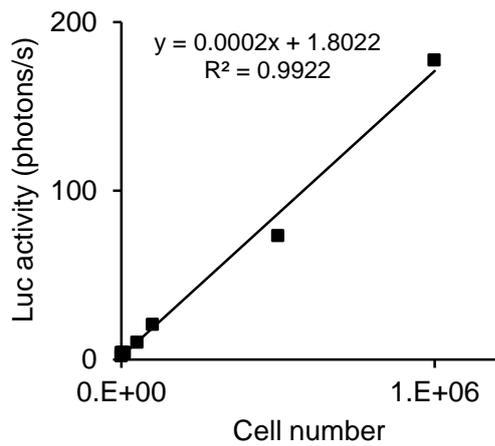
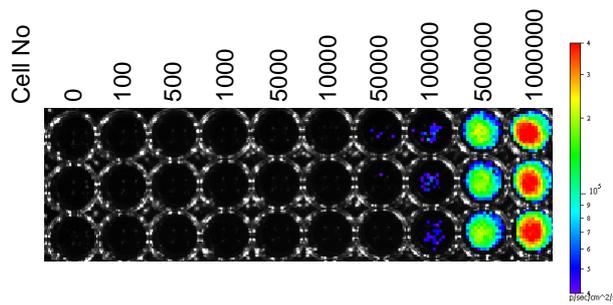
T 細胞およびマクロファージの浸潤解析

4T1-NF- κ B 細胞をマウスの背部皮下組織もしくは乳腺脂肪組織へと移植し、移植後 7 日に腫瘍を摘出し、2 mg/ml コラゲナーゼおよび 0.1 mg/ml DNase I を含んだ RPMI 1640 中で、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、メッシュを通過させ、Percoll Gradient (30%) にて単核球を単離した。フローサイトメトリーを行うにあたり、Fc γ R 非特異的な結合を回避するために、単核球を CD16/32 (2.4G2) で前培養を行った。次に蛍光標識した抗体と培養した。用いた抗体は CD3e (2C11)、NKp46 (29A1.4)、CD4 (GK1.5)、CD8 (2.43)、CD62L (MEL-14)、CD44 (IM7)、CD25 (PC61)、CD11b (M1/70)、CD11c (N418)、F4/80 (BM8.1)、CD206 (C068C2) である。また、細胞内の Foxp3 の染色には Foxp3/Transcription Factor Staining Kit (eBioscience) を使用した。フローサイトメトリーは FACS Canto (BD Biosciences) を用いて行い、またデータ解析は FlowJo Software (Tomy Digital Biology) を使用した。

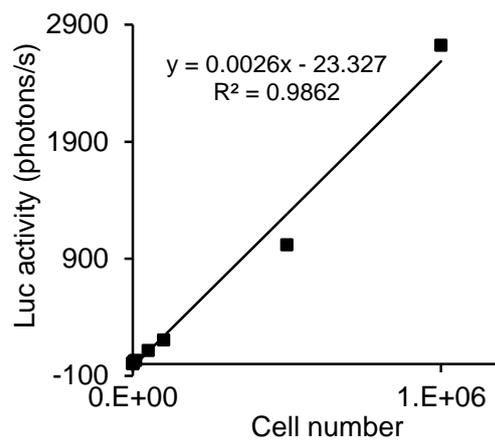
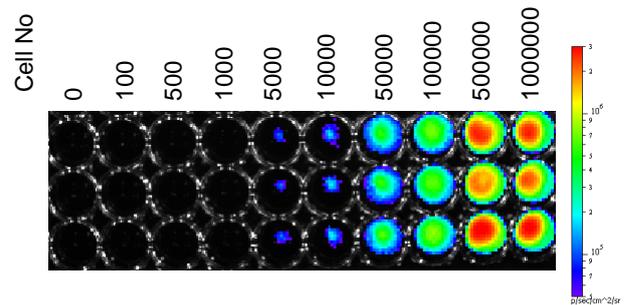
統計処理

Student t-test により $P < 0.05$ を基準とした。

(A) 4T1-CMV



(B) 4T1-NF-κB



(C)

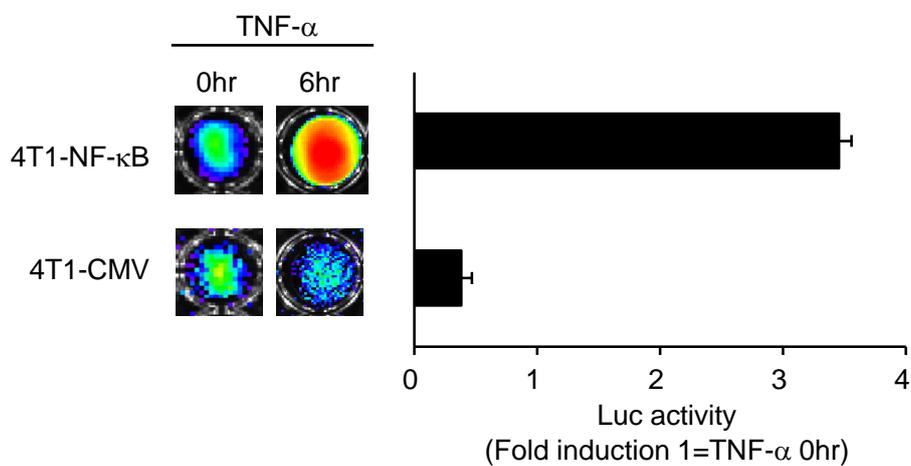


図 4. 4T1-CMV 細胞および 4T1-NF-κB 細胞の樹立

4T1-CMV 細胞もしくは 4T1-NF-κB 細胞を図に示す細胞数でプレートに播種し、発光活性の測定、発光イメージを撮影した。4T1-CMV 細胞 (A) と 4T1-NF-κB (B) の発光イメージ (上) および細胞数と発光活性 (photons/second) の相関 (下) を示す。細胞数と発光活性の相関関係は R^2 により示す。(C) 4T1-CMV 細胞および 4T1-NF-κB 細胞を TNF- α (100 ng/ml) で刺激し、刺激後 0 時間および 6 時間の発光イメージ (左) および発光活性 (右) を示す。データはそれぞれ mean \pm SEM で示す。

結果

皮下移植および乳腺脂肪移植における原発腫瘍の増殖および肺転移頻度の比較

マウス乳がん細胞 4T1 は皮下組織 (皮下移植、異所性移植) および由来組織である乳腺脂肪組織 (乳腺脂肪移植、同所性移植) のいずれに移植した場合でも、肺をはじめとした遠隔転移が起こることが知られているがん細胞である。今回、同数のホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定発現した細胞 (4T1-CMV) を皮下または乳腺に移植したところ、発光活性の測定から、乳腺脂肪移植における原発腫瘍の増殖は皮下移植の場合より遅く、移植後 14 日の腫瘍体積は皮下移植の半分程度であることがわかった (図 5 (A))。一方、生物発光イメージングによって移植後 14 日における肺転移を観察した結果、どちらのモデルにおいてもその頻度は変わらなかった (図 5 (B))。これらの結果は、乳腺脂肪移植においては原発腫瘍の増殖が比較的緩やかにも関わらず、皮下移植の場合と同程度に肺転移が生じると考えることができる。したがって、乳腺脂肪組織下における 4T1 細胞の方が高率に肺転移を引き起こすことが示唆された。

腫瘍体積と NF-κB 活性の経時的変化の観察

4T1-CMV 細胞と NF-κB 応答性にルシフェラーゼを発現する細胞 (4T1-NF-κB) を用いて、皮下移植もしくは乳腺脂肪移植を行い、各モデルでの腫瘍体積および NF-κB 活性の経時的变化を生物発光イメージングによって観察した (図 6)。4T1-CMV 細胞からの発光活性の結果より、皮下移植および乳腺脂肪移植いずれのモデルについても腫瘍体積は単調に増加する傾向であった。一方、NF-κB 活性については、皮下移植と乳腺脂肪移植で大きく異なる活性変化が認められた。皮下移植の NF-κB の活性はコントロールの CMV と同様に単調増加を示したが、乳腺脂肪移植では移植後 7 日前後に NF-κB の一過性の活性上昇が認められた (図 6)。移植後 7 日に着目し、(移植後 7 日の 4T1-NF-κB 細胞の発光活性 / 4T1-CMV 細胞の発光活性) / (移植後 0 日の 4T1-NF-κB 細胞の発光活性 / 4T1-CMV 細胞の発光活性) すなわち、各時点の腫瘍体積に対する NF-κB の発光活性を皮下移植と乳腺脂肪移植の場合で比較した (図 7 (A))。その結果、移植後 7 日では乳腺脂肪組織特異的に NF-κB が活性化されていることが明らかとなった。

また、乳腺脂肪移植では移植後 7 日に NF-κB の活性上昇が認められた後、4T1-CMV 細胞の発光活性が一時的に減少する傾向も認められた (図 6 (B))。

乳腺脂肪移植後早期の NF- κ B 活性の宿主免疫応答依存性

移植後 7 日の乳腺脂肪移植モデル特異的な NF- κ B 活性の上昇について、T 細胞および B 細胞が欠損した SCID マウスおよび T 細胞が欠損した nude マウスを用いて同様の検討を行った。これら免疫不全マウスに対する乳腺脂肪移植では、NF- κ B 活性の一過性の上昇は認められなかった (図 7 (B), (C))。この結果より、乳腺脂肪移植後 7 日に起こる NF- κ B 活性の上昇は T 細胞依存的な免疫応答によることが示唆された。

移植後 7 日の腫瘍内への T 細胞の浸潤

乳腺脂肪移植特異的に惹起される移植後早期の NF- κ B 活性の一過性の上昇は、T 細胞依存的事であることが示唆されたため、次に腫瘍内へ浸潤しているリンパ球について調べることとした。その結果、皮下移植および乳腺脂肪移植のどちらにおいても腫瘍内に浸潤しているリンパ球は CD3⁺CD4⁺T 細胞が main population であり、その割合も同程度であった (図 8)。さらに CD4⁺T 細胞の中でも CD44⁺CD62L⁻で示されるエフェクターメモリー T 細胞、および Foxp3⁺CD25⁺で示される制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) の割合も、どちらの移植モデルでも変わらないことが分かった (図 8)。以上の結果から、今回観察された一過性の NF- κ B 活性の上昇には、T 細胞依存的な免疫応答が必要ではあるが、それだけでは十分ではなく、T 細胞以外の他の間質の作用が不可欠であることが示唆された。

移植後 7 日の腫瘍における炎症性サイトカインの産生およびマクロファージの浸潤

サイトカインアレイを用いて、移植後 7 日の各腫瘍組織内の炎症性サイトカインを調べたところ、乳腺脂肪組織の原発腫瘍では、IL-1 α 、IL-1 β 、Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α (C-C motif ligand (CCL) 3)、MIP-1 β (CCL4)の四つの炎症性サイトカインの産生の亢進が認められた (図 9)。さらに、これらの炎症性サイトカインの産生は、CD4 および CD8 に対する中和抗体を加えることで減少することが分かった (図 9)。したがって、これら炎症性サイトカインの産生は T 細胞による免疫応答に依存しており、乳腺脂肪移植の早期に認められた一過性の NF- κ B 活性上昇に関与していると考えられた。

さらに、炎症性微小環境の形成に必要な T 細胞以外の間質の作用について解析した。乳がんの炎症反応において重要と考えられているマクロファージの浸潤についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。その結果、CD11b⁺F4/80⁺で示されるマクロファージの浸潤が、皮下移植に比べて乳腺脂肪移植由来の腫瘍で亢進していることが認められた

(図 10 (A), (B))。さらにマクロファージには M1 と M2 の亜群が存在するが、腫瘍内に存在するマクロファージ (Tumor-associated macrophage; TAM) は血管新生やがん細胞の増殖に関わる M2 様の形質を示すと考えられている^{8, 37, 38}。4T1 細胞の移植から形成された腫瘍内に浸潤してきているマクロファージは CD206⁺CD11c⁻で示され、M2 様であると考察された (図 10 (A))。

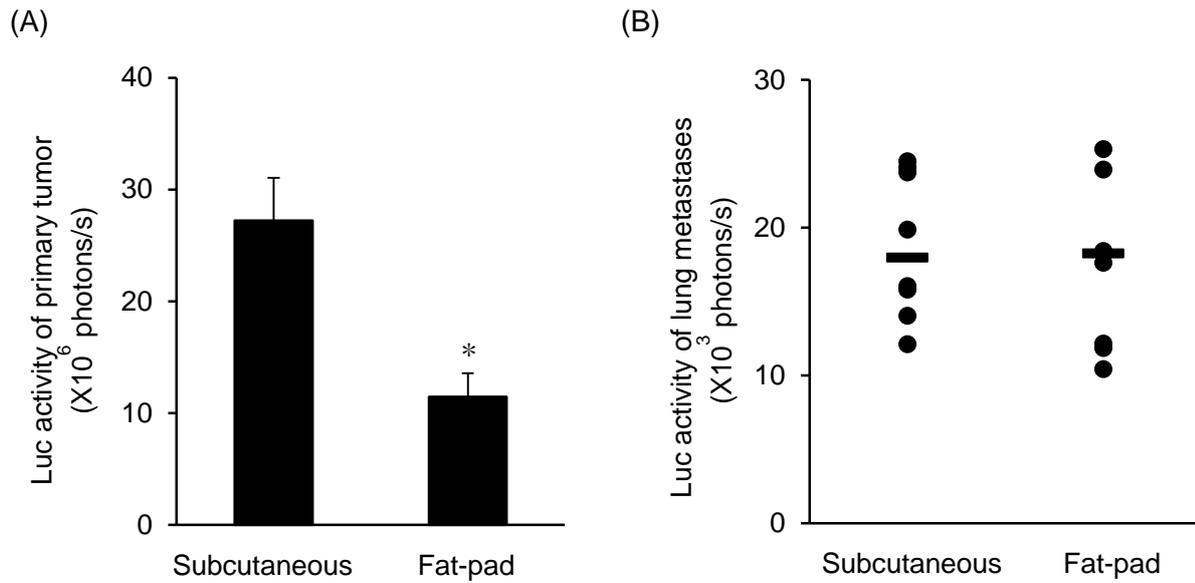
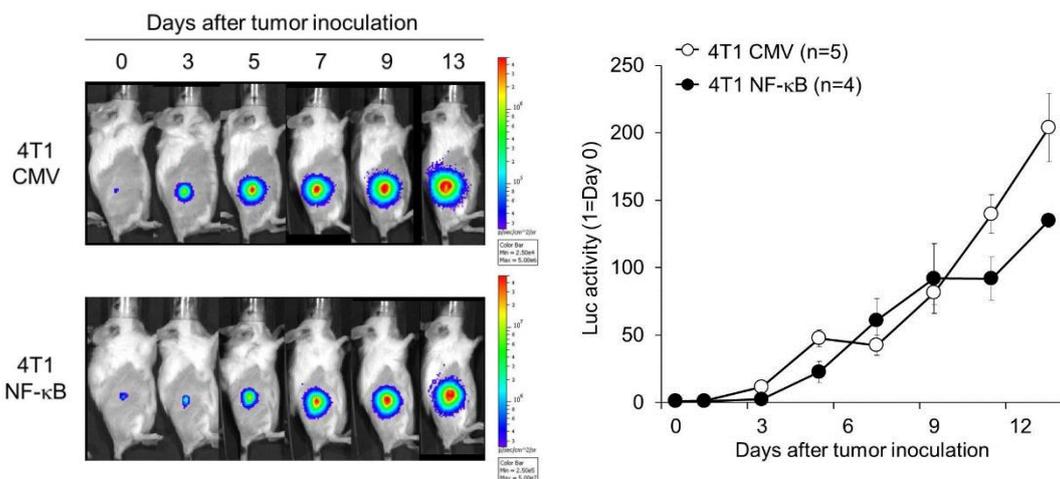


図 5. 皮下移植および乳腺脂肪移植での原発腫瘍の大きさと転移頻度
 同数の 4T1-CMV 細胞を同系マウスである BALB/c マウスの皮下組織もしくは乳腺脂肪組織
 へと移植した。移植後 14 日の原発腫瘍 (A) および転移性肺腫瘍 (B) の発光活性を示す。
 データはそれぞれ mean ± SEM で示す。* $P < 0.05$

(A) Subcutaneous



(B) Fat-pad

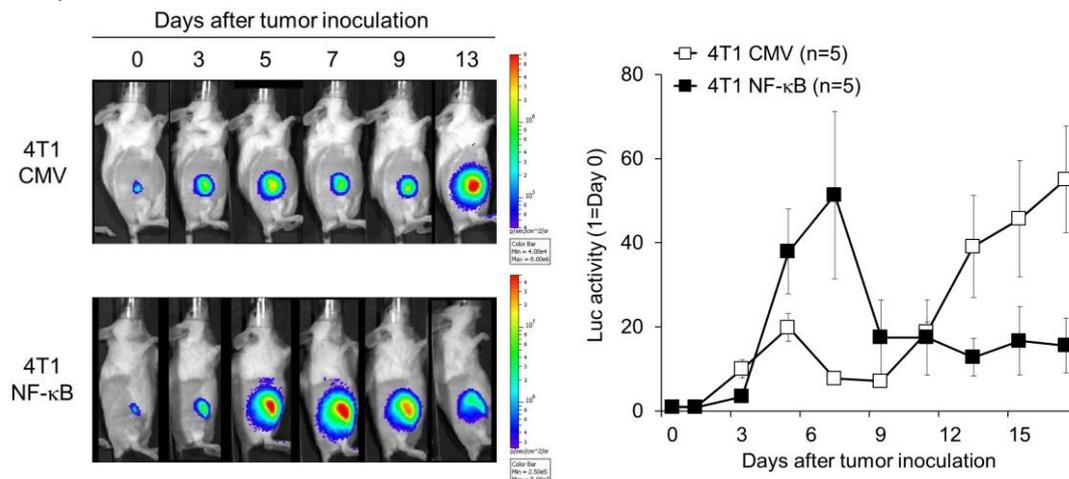


図 6. 皮下移植および乳腺脂肪移植での腫瘍体積および NF-κB 活性の経時的変化
4T1-CMV 細胞もしくは 4T1-NF-κB 細胞を同系マウスである BALB/c マウスの皮下組織もしくは乳腺脂肪組織へと移植した。生物発光イメージングを使用し、その後の発光活性の経時的変化を観察した。なお、4T1-CMV および 4T1-NF-κB 細胞の腫瘍形成には目視で差が認められないことを確認している。それぞれ皮下組織 (A) および乳腺脂肪組織 (B) における経時的変化な発光イメージ (左) および発光活性 (右) にて示す。またデータは mean ± SEM で示す。

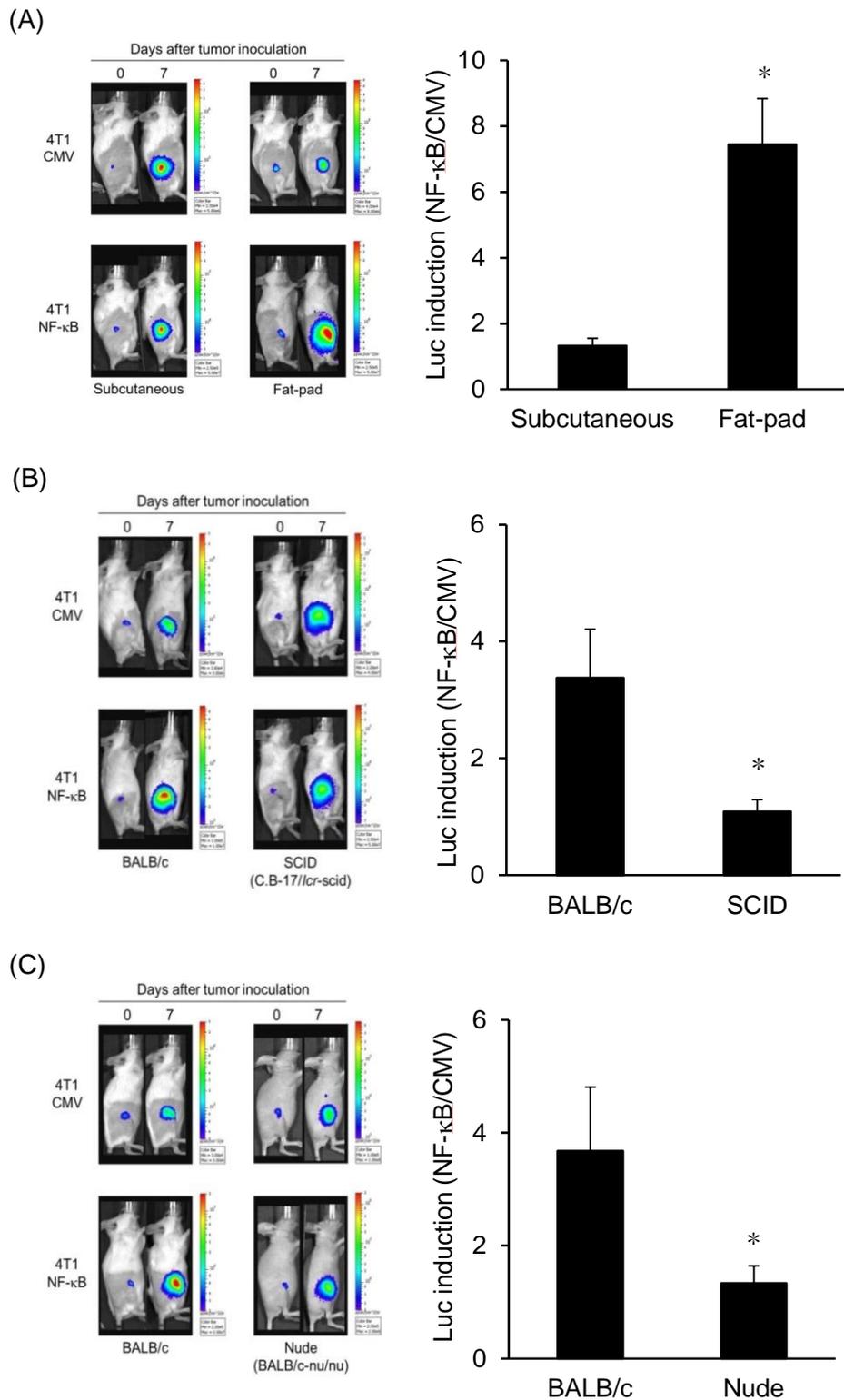


図 7. 炎症性微小環境の宿主免疫応答依存性

4T1-CMV 細胞もしくは 4T1-NF-κB 細胞を同系マウスの BALB/c の皮下移植もしくは乳腺脂肪移植 (A)、また SCID マウスへ乳腺脂肪移植 (B)、nude マウスへ乳腺脂肪移植 (C) を行った。それぞれ移植後 0 日および 7 日の体積当たりの発光イメージ (左) と発光活性 (右) を示す。実験は独立して 2 回試行し、両者の結果を合わせた。n 数は以下の通りである。(A) s.c., n = 8; fat-pad, n = 10; (B) BALB/c, n = 8; SCID, n = 10; (C) BALB/c, n = 9; nude, n = 10 また、グラフは mean ± SEM で示す。*P < 0.05

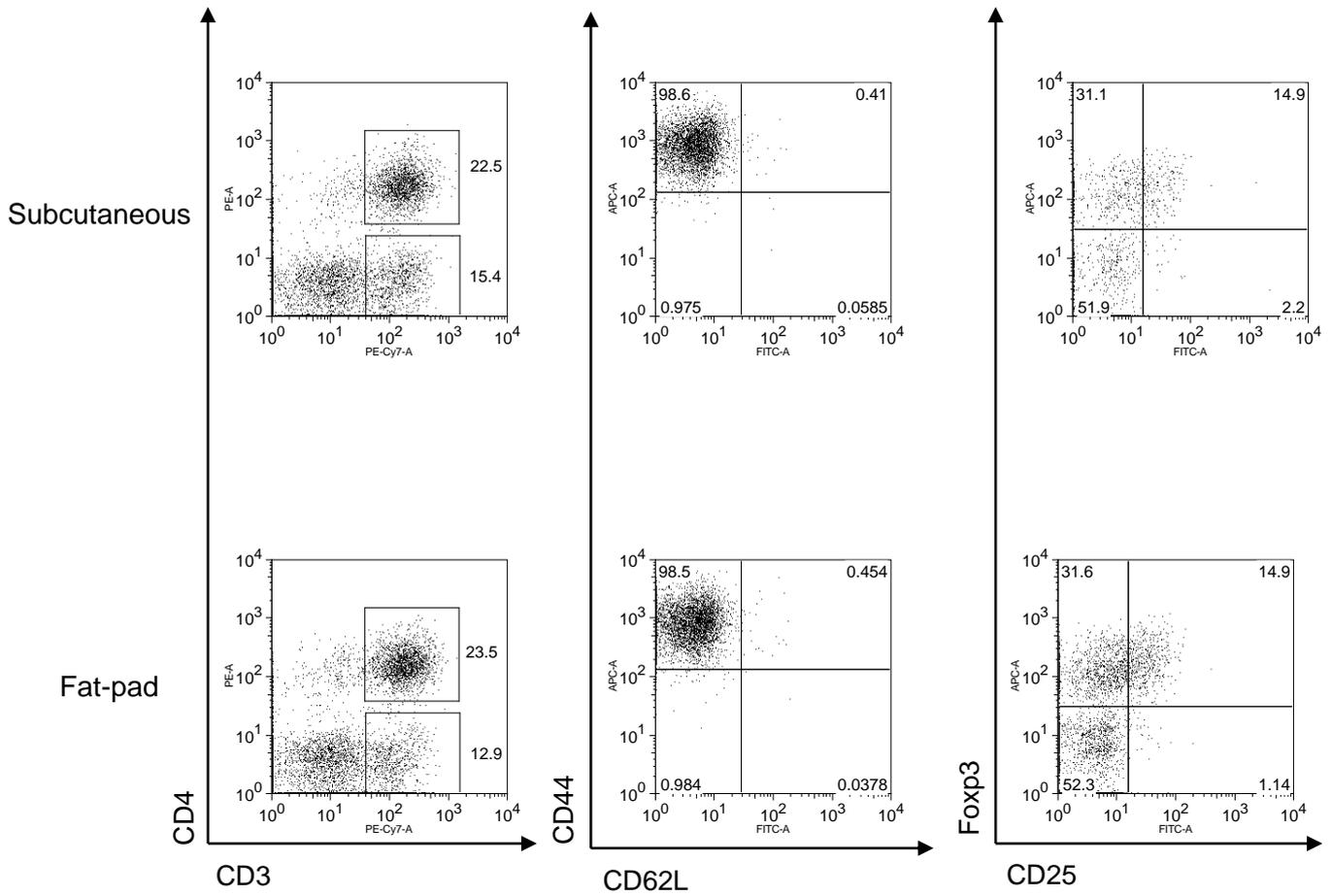


図 8. 皮下移植および乳腺脂肪移植後 7 日の腫瘍内への T 細胞の浸潤
 4T1-NF- κ B 細胞を同系マウスの BALB/c へ皮下移植もしくは乳腺脂肪移植を行い、移植後 7 日に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍から単核球を単離し、フローサイトメトリーを行った。まず、リンパ球から CD3⁺CD4⁺T 細胞の画分を分取し (左)、この画分の CD44 および CD62L (中)、または Fc γ 3 および CD25 の発現を解析した (右)。数字は各ゲート内もしくは画分内の細胞の割合を表す。

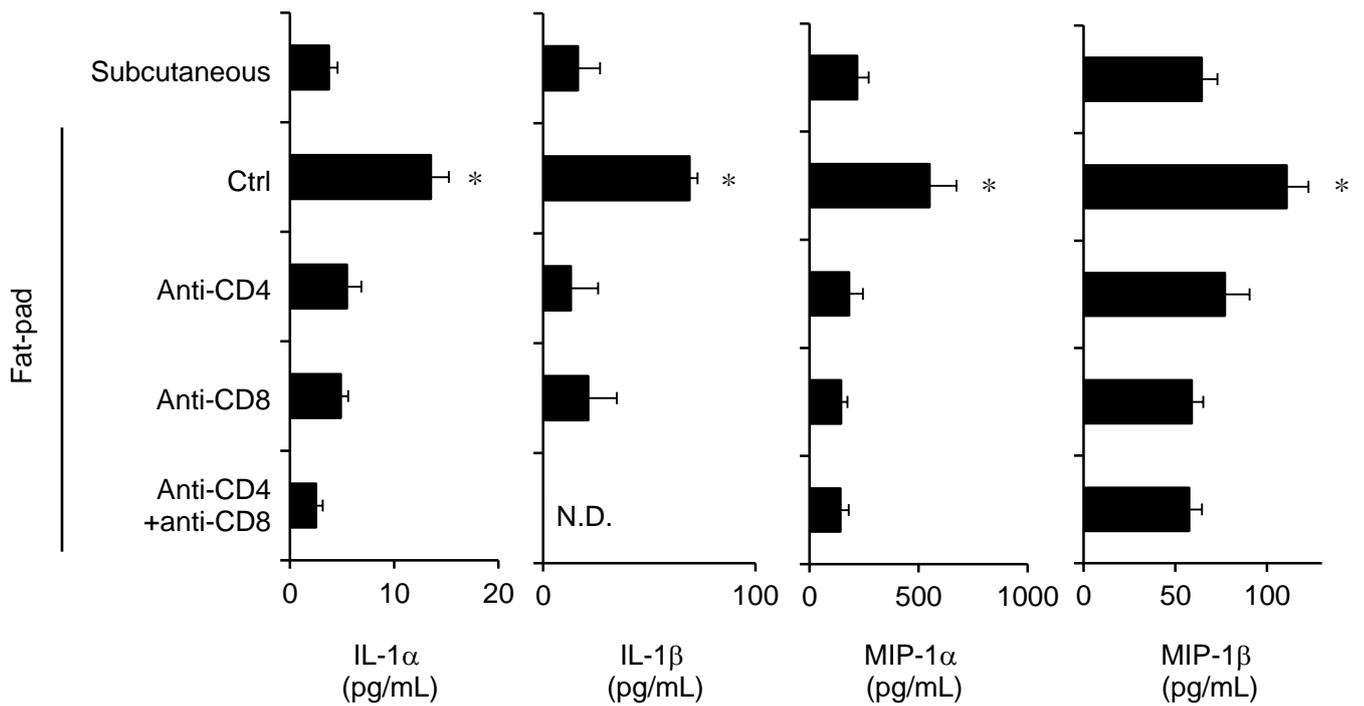


図 9. T 細胞依存的な炎症メディエーターの産生

4T1-NF-κB 細胞を同系マウスの BALB/c へ皮下移植もしくは乳腺脂肪移植を行い、移植後 7 日の腫瘍を摘出した。なお、乳腺脂肪移植したマウスの一部には、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を腫瘍移植 2 日前および 1 日前に前投与した (250 μg/mouse, 腹腔内投与)。摘出した腫瘍から細胞を分離し、24 時間培養した。培養上清を回収し、サイトカインおよびケモカインアレイを行った。データはそれぞれ mean ± SEM で示す。*P < 0.05

IL, interleukin; MIP, macrophage inflammatory protein; N.D., no data

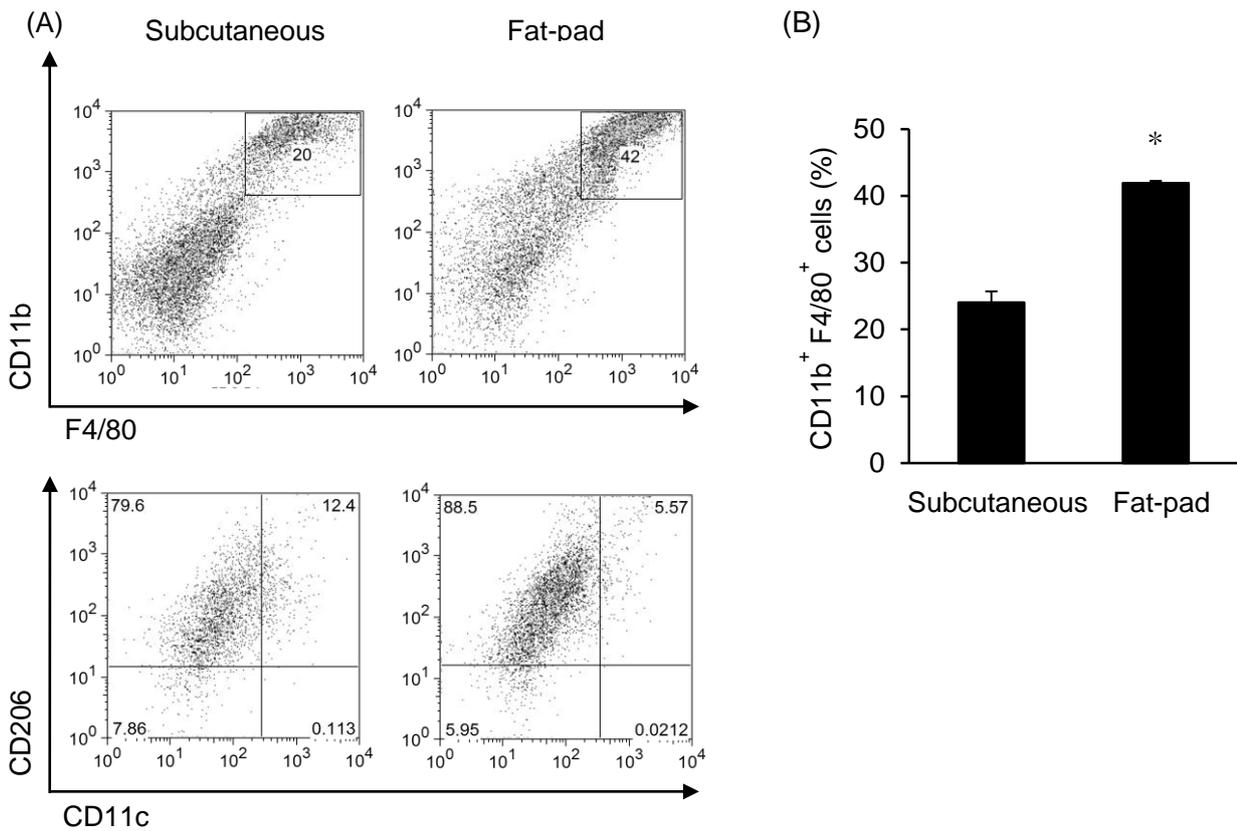


図 10. 皮下移植および乳腺脂肪移植後 7 日の腫瘍内へのマクロファージの浸潤
 4T1-NF- κ B 細胞を同系マウスの BALB/c へ皮下移植もしくは乳腺脂肪移植を行い、移植後 7 日の腫瘍を摘出した。腫瘍内に浸潤している単核球を単離し、フローサイトメトリーを行った。まず骨髄系細胞中の CD11b⁺ F4/80⁺ で示されるマクロファージを分取し、この画分の CD206 および CD11c の発現を解析した (A)。数字は各ゲート内もしくは画分内の細胞の割合を表す。グラフは骨髄系細胞に対する CD11b⁺F4/80⁺ の割合を表し、mean \pm SEM で示す (B)。* $P < 0.05$

考察

がんの悪性化における炎症性微小環境の重要性が認識されるようになってきたが、その形成に関する時空間的解析はこれまで行われてこなかった。今回 NF- κ B 活性を炎症のセンサーとして用いた生物発光イメージングにより、マウス乳がん細胞 4T1 移植モデルにおける炎症反応の可視化に成功し、さらに乳腺脂肪移植特異的に炎症が早期に惹起されることがわかった。また、その炎症性微小環境の構築には T 細胞依存的な免疫反応が不可欠であることも示した。一方で、皮下移植の場合にも同質の T 細胞が浸潤してくることから、炎症性微小環境の構築には T 細胞依存的な免疫応答のみではなく、乳腺脂肪組織内におけるがん細胞と間質での複雑な相互作用が不可欠であることが示唆された。

乳がんでは、マクロファージやアディポサイトが炎症性微小環境の構築に寄与していると報告されている³⁹。本実験において、乳腺脂肪組織における原発腫瘍ではマクロファージの浸潤の亢進が認められた (図 10)。マクロファージの浸潤の程度は、乳がん症例における予後と逆相関しているという報告や、炎症性サイトカインの産生を通じてがん細胞の増殖、浸潤転移、さらには血管新生を亢進させるという報告が多数なされている^{8, 20, 37, 40-42}。また、乳がんにおいては、アディポサイトによってマクロファージの浸潤が惹起されるとの報告もある⁴³。アディポサイトは TNF- α 、IL-6、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) などのアディポカインと呼ばれる炎症性メディエーターを産生し、がん細胞の増殖や浸潤、さらには腫瘍微小環境の線維化を促進するなど、その腫瘍促進的な働きが多く報告されている⁴⁴⁻⁴⁶。今回の実験において、病理組織学的観察から 4T1 細胞の乳腺脂肪移植で形成される原発腫瘍内に、脂肪組織が存在していることも確認しており、移植後早期の腫瘍での炎症性微小環境の形成にはアディポサイトが関与している可能性が示唆される。また、マクロファージおよびアディポサイトの浸潤亢進が認められた乳腺脂肪移植特異的に、早期に炎症性微小環境の形成が促進されていたことから考えて、これまでの報告と符号する結果と考えている。

さらに、4T1 細胞移植後の乳腺脂肪組織において、IL-1 やケモカインなどの炎症性メディエーターの産生が亢進していることがわかった (図 9)。これらの炎症性メディエーターは乳がん細胞に直接作用し NF- κ B を活性化する可能性、もしくはそれらの炎症性メディエーターがマクロファージや線維芽細胞等の TNF- α などの産生を促進することにより、がん細胞の NF- κ B が間接的に活性化されている可能性が考察される。これらの結果から、T

細胞がマクロファージなどの間質細胞と協調して作用することで、炎症性微小環境の形成に寄与していることが示唆される。以上の結果をまとめると、乳腺脂肪組織において T 細胞に加え、アディポサイトやマクロファージが複合的に作用し、炎症性メディエーターを産生した結果、今回観察された NF- κ B 活性の急激な上昇が認められたと考えている (図 11)。また、観察された NF- κ B 活性の上昇は継続的なものではなく、一過性であった。これは移植後早期に T 細胞やマクロファージの浸潤により急性の免疫応答が起こった後、Treg などの抑制性の免疫担当細胞がこの免疫応答を抑制していることに起因していると考えている。

乳がんの進展では、原発腫瘍での炎症性微小環境が転移に寄与していると認識されている²⁶。特に今回用いた 4T1 細胞についてはマウスの移植モデルにおいて、リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide; LPS) の投与により全身性の炎症を惹起した際に肺転移が増加するという報告がなされている^{47, 48}。また、マクロファージから産生された TNF- α が乳がん細胞の NF- κ B を活性化し浸潤性が高めるとの報告や、さらには乳がんモデルにおいて CD4⁺T 細胞がマクロファージの形質を変化させ、転移を促進するという報告もある^{49, 50}。今回、皮下組織と乳腺脂肪組織での移植モデルでの造腫瘍能および肺転移について比較を行った結果、乳腺脂肪移植モデルの方が皮下組織の場合に比べより高率に転移巣が形成されていると考えられた (図 5)。これらの結果から、今回観察することができた移植後早期の炎症反応が肺転移に寄与している可能性も示唆される。また、腫瘍体積を示す 4T1-CMV 細胞の発光活性は、乳腺脂肪移植後 7 日前後でその発光活性が一時的に抑制されることが観察された (図 6)。これは免疫応答の結果、がん細胞が炎症性シグナルにより活性化されると同時に、一部のがん細胞は殺傷され、悪性度の高いがん細胞だけが選択されていることを示していると考えられる。それと同時に炎症性微小環境下で、一部のがん細胞が炎症メディエーターにより活性化され腫瘍促進的な作用を示す可能性も考察される。例えば、乳腺脂肪組織特異的に産生上昇が認められた IL-1 β は、がん細胞の浸潤性の亢進および転移の促進作用を持つことが報告されており²⁰、今回の 4T1 細胞の乳腺脂肪移植で高率に肺転移が認められることと一致する。

また、4T1 細胞移植モデルにおいて炎症を経時的に可視化した結果、予想していたよりも早期に強い炎症が惹起されていることもわかった (図 6)。このように生物発光イメージングを用いて、炎症をはじめとした生体反応の経時的变化を観察することで、いつがん細胞と宿主組織が相互作用しているのかなど、腫瘍微小環境を理解する上で重要と思われる情報を得られることが示唆された。

より詳細な分子メカニズムの解析が必要ではあるが、本研究により 4T1 細胞による腫瘍内の炎症の惹起には、T 細胞依存的な宿主免疫応答に加え、微小環境内の細胞間でなされる様々な相互作用が重要であることが示された。

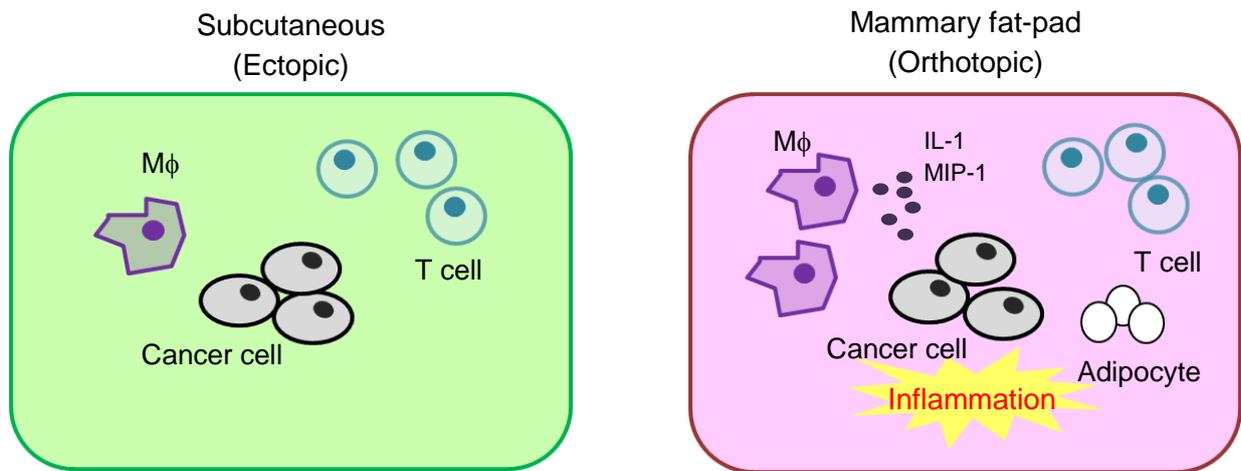


図 11. 炎症反応の組織依存性

皮下組織への異所性移植の場合、T細胞の浸潤は認められるが、移植後早期に炎症反応は観察されなかった(左)。一方で、乳腺脂肪組織への同所性移植の場合は、移植後早期にT細胞依存的な免疫応答由来の一過性の強い炎症反応が観察された(右)。これらはT細胞のみならず、マクロファージや脂肪組織などの複合的な働きにより、惹起されたものであることが示唆された。

第3章 ヒト膵臓がん細胞移植モデルを用いた腫瘍微小環境での獲得形質の解析

要旨

腫瘍微小環境ががんの進展に重要であると考えられているが、実際の生体内において組織の違いががん細胞の獲得形質にどのような影響しているか、あまり解析がなされていない。そこで本章ではヒト膵臓がん細胞を用いた二つの移植モデルの比較を行った。ヒト膵臓がん細胞 SUIT-2 を皮下組織への異所性移植もしくは由来組織である膵臓組織への同所性移植を行い、形成された原発腫瘍もしくは転移巣からそれぞれ悪性度の高い細胞株を樹立してその獲得形質を解析した。その結果、皮下移植から得られた細胞株 (3sc 細胞) と膵臓移植から得られた細胞株 (3P 細胞, 3L 細胞) は親株 P 細胞と比較して、細胞形態、造腫瘍能、浸潤能などの獲得形質に大きな違いが認められた。さらに 3sc 細胞の増殖能や浸潤能は 3P 細胞および 3L 細胞と比較すると限局されていることから、3P 細胞および 3L 細胞の方がより悪性度が高いことがわかった。また、遺伝子発現解析を行ったところ、P 細胞と 3P 細胞や 3L 細胞、3sc 細胞の間でその発現プロファイルが大きく異なること、さらには 3P 細胞および 3L 細胞特異的に高発現している遺伝子が多数存在し、これらには幹細胞マーカーを含むがん促進遺伝子が含まれていることがわかってきた。以上の結果から、がん細胞を取り囲む腫瘍微小環境の違いが、がん細胞の獲得形質に大きな影響を与えていること、さらには膵臓組織とがん細胞との相互作用が膵臓がん進展に寄与していることが示唆された。

序論

膵がんは世界のがんによる死亡者数の中で第 7 位を占めている。日本でも膵がんの罹患者数および死亡者数は増加傾向にあり、がんによる死亡者数の第 4 位となっている²⁷ (<http://ganjoho.jp>)。膵がんの診断時にはすでに肝臓や肺などをはじめとした遠隔臓器に転移していることが多く、5 年生存率が未だ 5% 前後と低い難治性がんの代表である^{51,52}。膵がんの特徴はその悪性度の高さにあり、高転移性や化学療法抵抗性がしばしば見られる⁵¹。

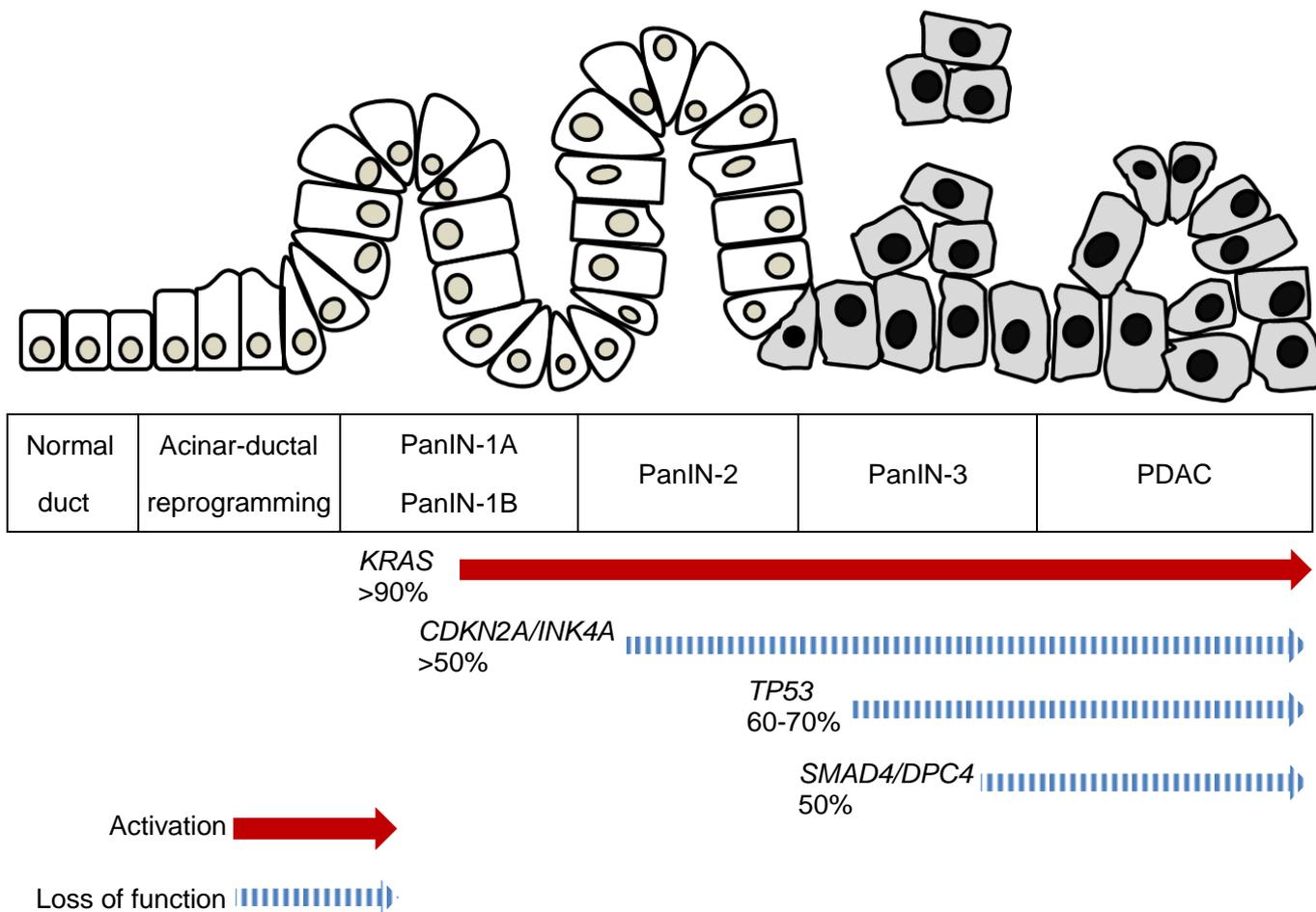
膵がんは複数のがん関連遺伝子に変異が入ることにより、発がんのプロセスが多段階に進行する。*KRAS* の変異が入り、前駆病変である膵上皮内腫瘍性病変 (Pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN) が現れた後、病変の異型の程度が高度になり段階的に PanIN-1 から PanIN-2 を経て PanIN-3 へと進行し、最終的に膵管腺癌 (Pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC) が生じる^{52,53} (図 12)。膵がん患者ではその 90% 以上にがん遺伝子 *KRAS* の変異が認められることに加え、*TP53* の変異は 60-70%、*CDKN2A (p16/INK4A)* は 50% 以上、さらには *SMAD4 (DPC4)* や *TGFBR2* (Transforming growth factor- β (TGF- β) type II receptor) といった TGF- β シグナル経路の変異は 50% 程度など、代表的ながん抑制遺伝子に高頻度に変異が入っている^{51,53-55} (図 12)。*KRAS*、*TP53* などの変異を利用した膵がん自然発がんマウスモデルが樹立されていることから、これらの遺伝子が膵がんの発生および悪性化へ大きく寄与していることが示されている⁵⁶⁻⁵⁹。

また、膵がん組織では間質が多く、線維化が認められることも特徴として知られており、腫瘍微小環境内に存在する細胞間での相互作用が活性化されていることを示唆している。膵がんの微小環境中には線維芽細胞をはじめ、免疫担当細胞、膵星細胞、ヒアルロナンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM)、さらには MMP など存在している^{55,60-62}。これら間質とがん細胞間の複雑な相互作用が、がんの悪性化に寄与しているという報告が多くなされている。例えば、線維芽細胞とヒト膵がん細胞の *in vitro* 共培養では、Hepatocyte growth factor (HGF) を介してがん細胞の浸潤能が亢進するという報告がある⁶³。また、ヒト膵がん細胞を膵星細胞と混合し、マウスへと移植したモデルでは腫瘍形成能の増大が認められること⁶⁴、ECM や線維芽細胞とがん細胞の相互作用が化学療法抵抗性を示すことなども知られている⁶⁵⁻⁶⁸。さらには、間質が多いことが抗がん剤のデリバリーを阻止するという物理的なバリア機能を果たし、化学療法抵抗性に寄与しているとの報告もある^{62,69,70}。このように膵がんにおいては間質の腫瘍促進的な作用が指摘されて

いる一方で、線維芽細胞を欠損したマウス膵がんモデルではその生存率が大きく低下するなど、線維化を含む間質との相互作用の腫瘍抑制的な働きも近年報告されている⁷¹⁻⁷³。このように膵がんにおける腫瘍組織の間質の役割については未だ明確にされていない。

がん細胞と個々の間質細胞との相互作用については、これまでも *in vitro* の共培養系などを用いた解析が多数なされてきた。一方で、複合的な間質の作用すなわち組織全体の違いが、がん細胞の獲得形質にどのように影響を与えているかについては未だデータが乏しい。そのような組織全体の違いを解析するためには、マウスを用いた移植モデルが有用であると考えられる。

したがって、今回私はヒト膵がん細胞を用いて皮下組織へ移植するモデル（皮下移植，異所性移植）および由来組織である膵組織へ移植するモデル（膵移植，同所性移植）を比較することで、腫瘍微小環境の違いががん細胞の獲得形質へと与える影響を調べることとした。



Modified from
 Bardeesy N and DePinho RA, *Nat Rev Cancer*, 2002,
 Perera RM and Bardeesy N, *Cancer Discov*, 2015,
 Maitra A and Hruban RH, *Annu. Rev. Pathol Mech. Dis*, 2008

図 12. 膵がんの多段階進展

前駆病変である膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) において *KRAS* や *TP53* などの遺伝子に変異が生じ、異型が段階的に高度になり、最終的に膵管腺癌 (PDAC) まで進行する。

方法

細胞

ヒト膵がん細胞 SUIT-2 は DMEM (GIBCO) に 10% Fetal bovine serum (FBS, HyClone) および Penicillin/Streptomycin (GIBCO) を加えた培地で 37°C 5% CO₂ 下で培養し、0.05% trypsin/EDTA (GIBCO) により継代した。

レンチウイルスベクターの作製および感染 (遺伝子導入)

発現ベクターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子をレンチウイルスベクター作製用コンストラクト CSII-CMV-RfA へ組み込まれたものを使用した。また、GFP 発現コンストラクトは CS-CDF-CG-PRE は三好浩之博士 (理化学研究所) より供与していただいた。ウイルスの作製には 293FT 細胞を I 型コラーゲンがコートされている 75 cm² フラスコ (Corning) へ播種し、作製用コンストラクトと pCAG-HIVgp および pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理研バイオリソースセンター) を Lipofectamine 2000 によってトランスフェクションした。翌日に培地を交換し、さらに 2~3 日培養後、上清を回収し、Lenti-X concentrator (Clontech) 使用して 20~40 倍に濃縮し、レンチウイルスベクターとして使用した。濃縮したレンチウイルスベクターをそれぞれヒト膵がん細胞へと感染させ、恒常的に GFP およびルシフェラーゼを安定発現する細胞株を樹立した。

マウスへのがん細胞移植および発光活性の経時的変化の観察

全ての動物実験は東京大学大学院医学系研究科の実験動物委員会の定める指針に従った。SUIT-2 細胞を免疫不全マウスの BALB/cAJcl-nu/nu (♀ 6w 日本クレア) の左背部皮下組織もしくは由来組織である膵組織へ移植した (2.5 x 10⁵ cells/mouse)。移植後、経時的に NightOWL II LB983 (ベルトールド) により発光活性の測定および発光イメージの撮影を行った。毎回撮影 10~15 分前に D-ルシフェリンカリウム (2.5 mg/mouse) を腹腔内投与した。また、撮影時は Avertin (2,2,2-Tribromoethanol in 2-Methyl-2-butanol) の腹腔内投与により麻酔を行った。データ解析は IndiGO2 (ベルトールド) を使用した。

病理組織学的解析

マウスより摘出した原発腫瘍を 10 N マイルドホルム (Wako) を用いて固定し、パラフィン包埋した。薄切した組織切片を脱パラフィン処理した後、ヘマトキシリン/エオジン (HE) 染色もしくは Azan 染色を行った。

高悪性株の樹立

GFP およびホタルルシフェラーゼを安定発現する SUIT-2 細胞を左背部皮下組織へと移植した (2.5×10^5 cells/mouse)。移植後約 1 ヶ月で原発巣を摘出した。摘出した腫瘍組織をカミソリによってミンチ状にし、0.25% trypsin/EDTA (GIBCO) を加え 37°C にて 10 分間インキュベートした。その後、遠心して回収した細胞を数日間培養することで、混在する血球や線維芽細胞を除去した。GFP の蛍光から、がん細胞のみになったことを確認した後、再び皮下移植を行った。このプロセスを 3 回繰り返し、原発巣から樹立した細胞を 3sc 細胞と名付けた。同様の方法で、腓組織への移植からも細胞株を作製し、3 回目の移植の原発巣から樹立した細胞株を 3P 細胞、および肺転移巣から樹立した細胞株を 3L 細胞と名付けた。また、3sc 細胞、3P 細胞および 3L 細胞は複数のマウスの原発巣および肺転移巣から樹立しているため、宿主の個体をそれぞれ#で区別する。

細胞増殖アッセイ

細胞を 96 well plate (IWAKI) へ播種し、数日培養した。その後、Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を加えて反応させた後、450 nm (参照波長 595 nm) の波長の吸光度を測定し、生細胞数を定量化した。

RNA の抽出および cDNA の合成

それぞれの細胞から、Isogen (Nippon Gene) によりプロトコールに従って RNA を抽出した。抽出した RNA は Diethylpyrocarbonate (DEPC, Nacalai Tesque) 処理水を用いて濃度を合わせた後、Prime Script II cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を使用して cDNA を合成した。

定量的リアルタイム PCR

定量的リアルタイム PCR は FastStart Universal SYBR Green (Roche) および Step One Plus (Applied Biosystems) を用いて行った。Internal control には Hypoxanthine

phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した。

使用したプライマーは以下の通りである。

<i>HPRT1</i>	Forward	5'-tttgccttccttggtcaggc-3'
	Reverse	5'-gcttgcgaccttgaccatct-3'
<i>CDH1</i>	Forward	5'-attttccctcgacacccgat-3'
	Reverse	5'-tcccaggcgtagaccaaga-3'
<i>ABCG2</i>	Forward	5'-agatgggttccaagcgttcat-3'
	Reverse	5'-ccagtcccagtagcactgtgaca-3'
<i>MMP2</i>	Forward	5'-tggcgatggatacccctt-3'
	Reverse	5'-ttctccaaggtccatagctcat-3'
<i>KRT5</i>	Forward	5'-ccaaggttgatgactgatgg-3'
	Reverse	5'-tgtcagagacatgctctgc-3'
<i>SOX2</i>	Forward	5'-cgagtggaaactttgtcgga-3'
	Reverse	5'-tgtgcagcgtcgcag-3'

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) およびウエスタンブロットティング

プレートに播種した培養細胞に Lysis Buffer (1% Nonidet P40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris HCl) を加えて、細胞を溶解させた。溶解液を氷上にて 10 分以上静置した後、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清のタンパクを回収した。SDS sample buffer (Tris pH8.8, 1% BPB, Glycerol) を上清の 3 分の 1 量加え、98℃で 3 分間ボイルした。8.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後、セミドライ式にてメンブレン Fluoro TransW.3.3 Meter Rolle (PALL, Life Sciences) へタンパクを転写した。メンブレンは 5% スキムミルク (Megmilk Snow Brand) によって 1 時間ブロッキングし、その後、一次抗体を加え、4℃で一晩振とうした。また、二次抗体は室温で 1 時間振とうした。Loading control には抗 α -tubulin 抗体 (Sigma) を使用した。バンドの検出には Enhanced chemiluminescence (ECL) を使用し、ルミノイメーリアナライザ

ー LAS4000 (Fujifilm) によって画像を撮影した。データ解析には MultiGauge (Fujifilm) を使用した。

使用した抗体は以下の通りである。

一次抗体	二次抗体
抗 E-cadherin 抗体 (BD)	Horseshoe peroxidase (HRP) 標識抗 mouse
抗 α -tubulin 抗体 (Sigma)	IgG 抗体 (Cell Signaling)

接着能の評価

Fibronectin (Wako, 0.5 μ g/well) をコートした 96 well plate (NUNC) を 4°C で一晩インキュベーションした後、0.1% BSA を含む培地による細胞懸濁液を (5×10^4 cells/well) 加え、37°C にて 30 分培養した。その後、Fibronectin に接着した細胞を 1% グルタルアルデヒド水溶液 (Nacalai Tesque) により固定、クリスタルバイオレットにて染色を行った。さらに 33% 酢酸により、接着した細胞を抽出し、570 nm の吸光度をプレートリーダー (Bio-Rad) にて測定した。

浸潤能の評価

0.8 μ m ポアのフィルターを有する chamber (Falcon) を使用し、chamber の上層に細胞液を (1×10^5 cells/well) 加え、37°C にて 24 時間培養した。培養後、10 N マイルドホルムにて固定した後、0.5% クリスタルバイオレットにて染色した。下層に浸潤した細胞数を 5 視野からカウントし、また Fiji ImageJ にてクリスタルバイオレットで染まった細胞の占める領域の割合を定量化した。

In vivo の造腫瘍能の評価

P 細胞、3sc#1 細胞、3sc#3 細胞、3P#2 細胞、3L#2 細胞を nude マウスの皮下組織もしくは臍組織へと移植し、移植後約 1 ヶ月にマウスを解剖し、原発腫瘍の質量を比較した (1×10^5 cells/mouse)。

RNA-sequencing (RNA-seq)

細胞を播種し、翌日 total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) によって回収した。また、この際 RNase-Free DNase Set (Qiagen) を使ってゲノム DNA の除去を行った。抽出した 10 μ g の Total RNA から Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Life Technologies) を用いてプロトコールに従って mRNA を抽出した。抽出した 100 ng mRNA から Ion Total RNA-Seq Kit v2 を用いてライブラリを調製した。mRNA の断片化、両端へのアダプター付加、逆転写、増幅の順にプロトコールに従って行った。調製したライブラリの長さをそろえるために、E-Gel Size Select Agarose Gel (Invitrogen) を使って 150~250 bp のライブラリを抽出した。ライブラリの濃度は Ion Library Quantitation Kit (Life Technologies) を用いて測定した。次に調製したライブラリの一部から、Ion One Touch 2 Instrument (Life Technologies) を使用し、エマルジョン PCR を行い、テンプレートを作製した。プロトコールは Ion PI Template OT2 200 Kit v3 に従った。さらに得られたテンプレートを Ion One Touch ES によって濃縮した後、Ion Proton (Life Technologies) を用いて、データを取得した。プロトコールは Ion PI Sequencing 200 Kit v3 に従った。Tophat2/bowtie2 によりマッピングした後、cuffdiff プロトコールにより発現量を定量化した。Heatmap の作製およびクラスタリング解析については TM4 Mev (<http://www.tm4.org/mev.html>) を使用した。

各細胞株での発現遺伝子群の抽出

RNA-seq の結果から、各細胞株の Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) 値を参照し、以下の条件に合致する遺伝子を抽出した。

条件：「3P 細胞もしくは 3sc 細胞での FPKM 値が 3 以上」かつ「3P 細胞もしくは 3sc 細胞での FPKM 値が親株 P 細胞での FPKM 値の 2 倍以上」の遺伝子群
もしくは「親株 P 細胞での FPKM 値が 3 以上」かつ「3P 細胞もしくは 3sc 細胞での FPKM 値が親株 P 細胞での FPKM 値の 1/2 倍以下」の遺伝子群

Gene ontology (GO) 解析には CLC Genomic Workbench 解析ソフト (Qiagen) を使用し、 $P < 0.01$ を満たす biological process を抽出した。

統計処理

Student t-test により $P < 0.05$ を基準とした。

結果

ヒト膵がん細胞の膵移植と皮下移植の比較

SUIT-2 細胞は、元来造腫瘍能が高いがん細胞であり、自身の先行研究の結果から、皮下組織（皮下移植、異所性移植）および由来組織である膵組織（膵移植、同所性移植）のいずれに移植した場合でも、移植したすべての個体においてがん細胞が生着することがわかっている（高橋恵生，他，未発表）。しかし、皮下移植では原発巣のみが形成されたのに対し、膵移植の場合には原発巣の形成のみならず、腹膜播種および肺転移が認められ、より進行が速いことがわかった（図 13）。この結果より、同じがん細胞の移植においても移植される宿主の組織の違いによって原発腫瘍の形成速度や転移形成などその進行に差があることがわかった。

また HE 染色から、皮下移植においては宿主皮下組織とがん細胞が、膵移植においては宿主膵組織とがん細胞が接していることを確認した（図 14）。さらに Azan 染色から、両者とも腫瘍組織内の間質の線維化が観察され、形成される腫瘍の病理組織学的な違いは目立たないと考えられた（図 14）。

以上の結果から、皮下組織と膵組織における各移植モデルでは、組織学的に明確な差は認められないものの、膵移植モデルの方が早くがんが進行し、播種・転移が生じるなど悪性度の高い形質を示すと考えられた。

新規細胞株の樹立およびその形態変化、E-cadherin の発現

SUIT-2 細胞を皮下組織もしくは膵組織の間質と長期間にわたって相互作用させ、その獲得形質を安定化するために、それぞれの移植を 3 回繰り返して細胞を樹立した（図 15）。各細胞の形態を顕微鏡下にて観察した結果、約半数の細胞が円形を示す親株 P 細胞に比べ、3sc 細胞、3P 細胞、3L 細胞では紡錘形の細胞が増加していることがわかる（図 16）。特に、3P 細胞および 3L 細胞においてその割合が非常に高いことがわかった。次に、細胞株の形態変化が、上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) の誘導と相関があるか調べるため、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現低下が観察されたか確認した。その結果、3P 細胞および 3L 細胞では P 細胞に比較して、E-cadherin をコードする *CDH1* mRNA ならびに E-cadherin タンパクの発現が顕著に低下していることが確認され、3P 細胞および 3L 細

胞は EMT により間葉系細胞の形質を獲得していると考えられた。一方で、3sc 細胞でのその発現は P 細胞と同レベルで保たれていることが示された (図 17)。

新規細胞株の造腫瘍能、浸潤能、接着能の亢進

樹立した新たな細胞株について、次にその増殖能、造腫瘍能、浸潤能、接着能を調べた。In vitro における増殖能については、FBS 存在下では 3P 細胞、3L 細胞、3sc 細胞のいずれにおいても親株 P 細胞と同程度であった (図 18 (A))。一方で、FBS を含まない培養条件では 3P 細胞、3L 細胞、3sc 細胞のどの株においても親株と比較して、増殖能の亢進傾向が認められたが、その差は顕著なものではなかった (図 18 (B))。

次に *in vivo* における造腫瘍能を比較した。P 細胞、3P 細胞、3sc 細胞を皮下移植した場合、親株 P 細胞と比較して、3sc 細胞の造腫瘍能の亢進が認められた。しかし、その造腫瘍能亢進の程度は 3P 細胞に比べると限定的であった (図 19 (A))。この結果より、いずれの移植モデルから樹立した細胞株も高悪性株であることがわかったが、臍移植由来の 3P 細胞の方がより悪性度が高いがん細胞であることが示唆された。また、これら細胞株について同様の造腫瘍能の評価を、臍移植を用いて行った。その結果、皮下移植と同様、P 細胞と比較して 3sc 細胞の造腫瘍能は同程度もしくは軽度の亢進が認められたが、3P 細胞には及ばなかった (高橋恵生, 他, 未発表)。なお、3L 細胞についても臍移植を行い P 細胞と比較した結果、P 細胞と比較して原発腫瘍の形成能が 3P 細胞と同程度に大きく亢進していることも確認できた (図 19 (B))。

さらに各高悪性株の *in vitro* における浸潤能および接着能を調べた。Chamber を用いて P 細胞、3P 細胞、3L 細胞、3sc 細胞の 24 時間の浸潤能を計測した結果、P 細胞と比較して 3P および 3L 細胞においてその浸潤能が高くなっていることが示された (図 20 (A))。一方、3sc 細胞については浸潤能の亢進は認められなかった。がん細胞の浸潤能は、上皮細胞の形質を喪失し、間葉系細胞の形質を獲得することで亢進することが知られており、3P 細胞および 3L 細胞が EMT を起こしている結果 (図 17) と合致するものであると思われた。また、フィブロネクチンが存在する足場に対する接着能の測定も行った。その結果、P 細胞と比較して、3P 細胞および 3L 細胞では接着能が亢進していることがわかった (図 20 (B))。一方で皮下移植から樹立した 3sc 細胞の接着能は P 細胞と同程度または軽度の亢進であった。

以上の結果から、皮下移植から樹立された細胞株について増殖能や造腫瘍能など一部悪性度の亢進は認められるが、臍移植から樹立された細胞株の方が増殖能、造腫瘍能、浸潤能、接着能などにおいてより高い悪性度を示すことが示唆された。

網羅的遺伝子解析

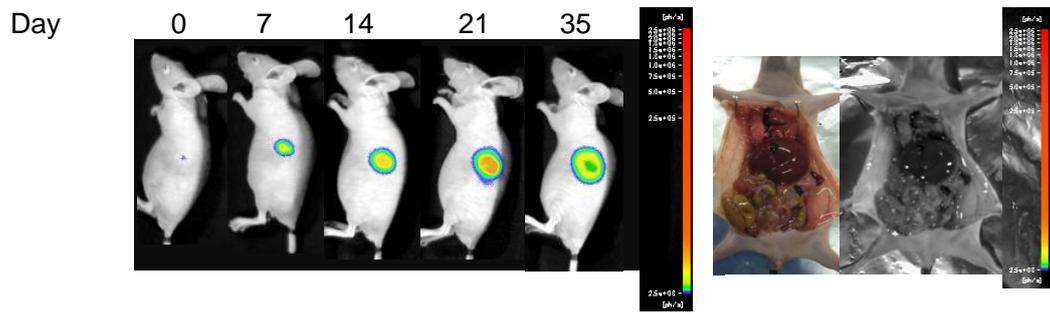
次に、樹立した各細胞株の遺伝子発現を調べた。今回は、親株 P 細胞に加え、臍移植由来の細胞株として 3P#1 細胞、3P#2 細胞、3L#1 細胞、3L#2 細胞、また皮下移植由来の細胞株として 3sc#1 細胞、3sc#3 細胞の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析した。その結果、親株 P 細胞と比較して、3P 細胞、3L 細胞、3sc 細胞のそれぞれの遺伝子について、親株 P 細胞と比較して発現が亢進しているもの、低下しているものが多く認められた (図 21 (A))。さらに、皮下移植から樹立した 3sc 細胞と臍移植から樹立した 3P 細胞および 3L 細胞ではその遺伝子発現プロファイルが大きく異なることもわかった。また、クラスタリング解析を行った結果、P 細胞、3sc 細胞、3P 細胞および 3L 細胞、と 3 グループにクラスター化できることがわかった (図 21 (B))。さらに、遺伝子発現パターンにおける P 細胞との類似性は、3sc 細胞、3P 細胞、3L 細胞の順に低くなることも示され、臍移植モデルにおいて遺伝子発現のより大きな変化が生じることが示唆された。また、親株 P 細胞と比較して、3P 細胞もしくは 3sc 細胞で高発現もしくは低発現している遺伝子群を抽出した (図 21 (C))。その結果、3P 細胞と 3sc 細胞との間で共通して発現上昇する遺伝子群は 100 個程度認められた。一方で 3P 細胞特異的な発現上昇遺伝子群は 150 個程度、3sc 細胞特異的な発現上昇遺伝子群も 60 個程度存在することがわかった。したがって、P 細胞から 3sc 細胞での変動に比べ、P 細胞から 3P 細胞での発現変動が見られた遺伝子数の方が多く、臍組織下での遺伝子発現の変動が大きいことが示唆された (図 21 (C))。以上の結果から、二つの移植モデルがもたらす獲得形質の違いが遺伝子発現レベルにおいても認められることが明らかとなった。

組織特異的に発現亢進している遺伝子の存在

RNA-seq の解析結果に基づき、定量的リアルタイム PCR を用いて代表的な遺伝子発現の再現性を確認した。その結果、MMP-2 などの一部のがん促進遺伝子については臍移植から得られた 3P 細胞および 3L 細胞、皮下移植から得られた 3sc 細胞のいずれにおいても親株 P 細胞と比較してその発現が顕著に亢進していることが示された (図 22 (A))。一方で、ATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2) や Sex determining region Y-box 2 (SOX2)

など、3P 細胞および 3L 細胞特異的に発現が亢進している遺伝子も複数得られている (図 22 (A))。また、Keratin 5 (*KRT5*) など 3sc 細胞特異的に発現が亢進している遺伝子も少数ながら存在することがわかった (図 22 (A))。さらに、GO 解析により、親株 P 細胞と比較して、3P 細胞、3sc 細胞に共通して活性化されている biological process にはコラーゲン産生や ECM の再形成が含まれていることがわかった。一方で、3P 細胞特異的に活性化されているものとして幹細胞様形質などが認められた (図 22 (B))。

(A) Subcutaneous (Ectopic)



(B) Pancreas (Orthotopic)

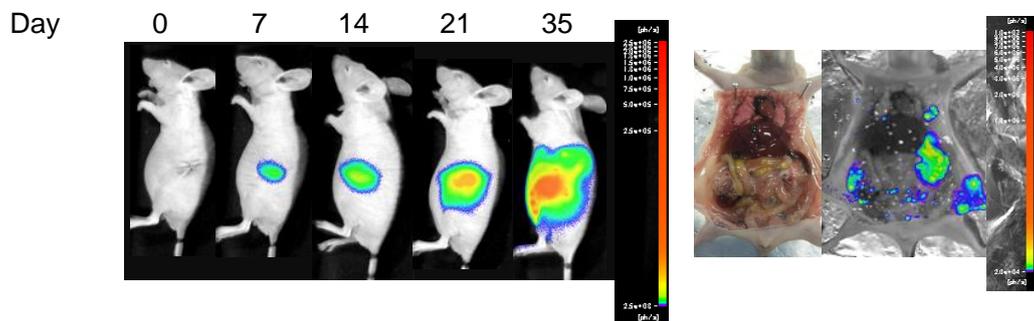


図 13. 皮下移植および膵移植の進展の比較

ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的発現した同数のヒト膵がん細胞 SUIT-2 を nude マウスへ皮下移植 (A) もしくは膵移植 (B) を行った。その後、腫瘍の増殖を生物発光イメージングによって観察した (左)。また、移植後 35 日に解剖し、発光イメージングを行った (右)。

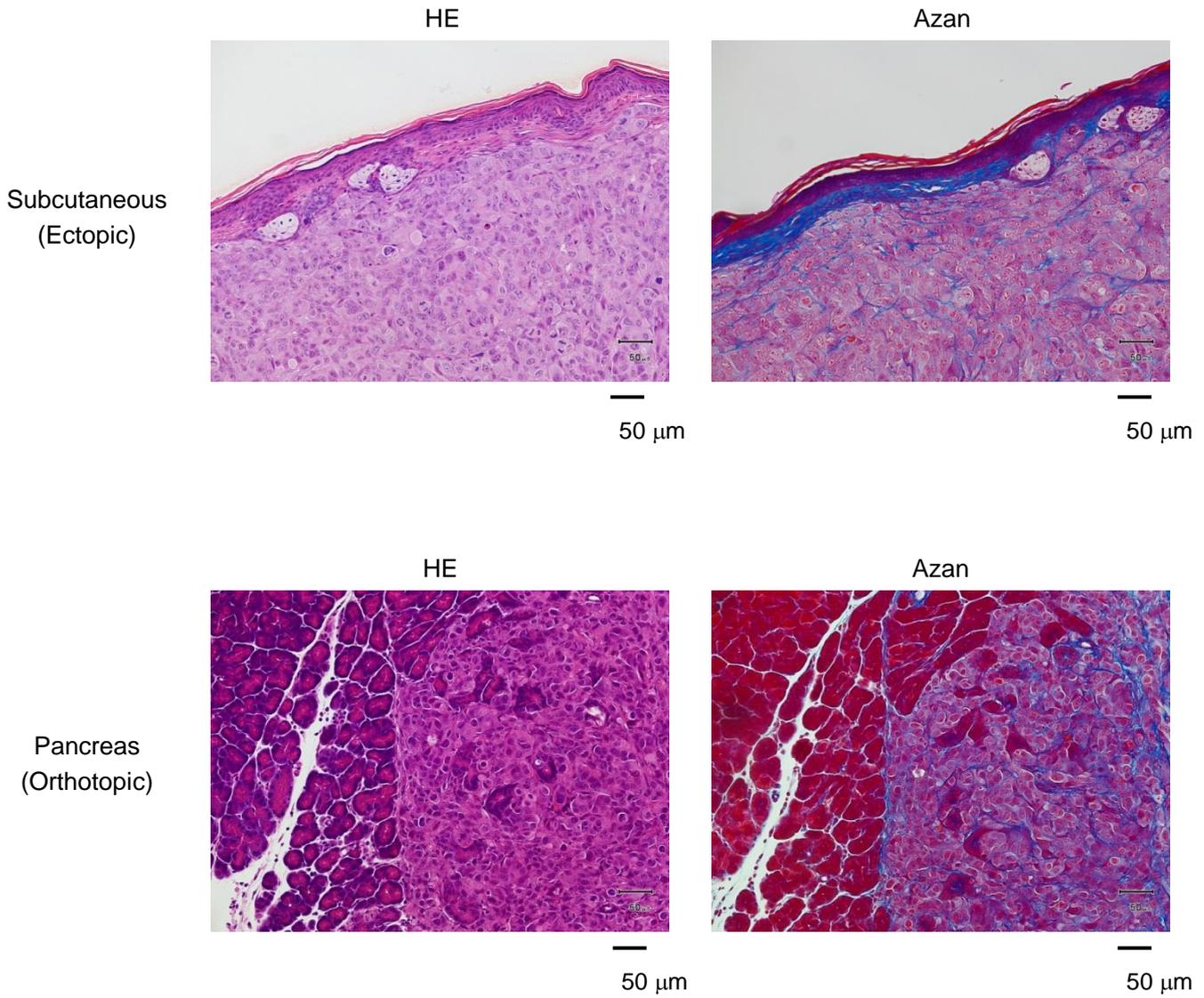
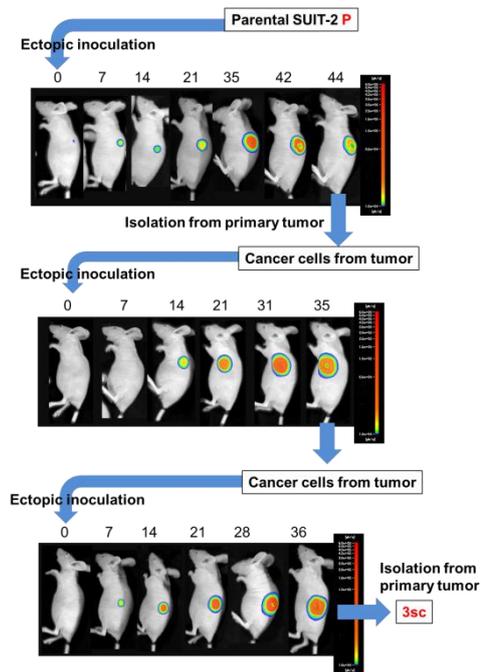


図 14. 皮下移植および膵移植の病理組織学的比較
 SUIT-2 細胞を nude マウスへ皮下移植 (上) もしくは膵移植 (下) を行った。移植後 1 ヶ月
 で腫瘍を摘出し、ホルマリン固定を行った。HE 染色 (左) および Azan 染色 (右) により、
 病理組織学的観察を行った。

(A) Subcutaneous (Ectopic)



(B) Pancreas (Orthotopic)

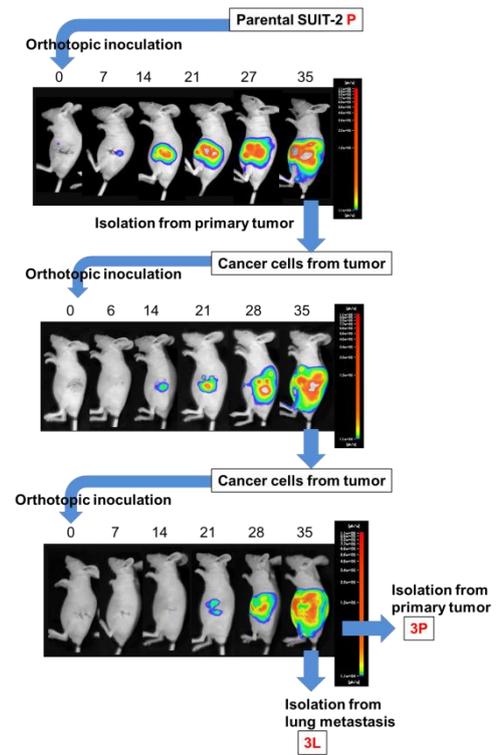


図 15. 皮下移植および膵移植を用いた新規細胞株の樹立

SUIT-2 細胞を nude マウスへ皮下移植 (A)、もしくは膵移植 (B) を行った。移植後 1 ヶ月で原発腫瘍を摘出、がん細胞を単離、再びマウスへと移植する。このプロセスを 3 回繰り返した。皮下移植の原発腫瘍から樹立した細胞株を 3sc、膵移植の原発巣から樹立した細胞株を 3P、肺転移巣から樹立した細胞株を 3L と名付けた。

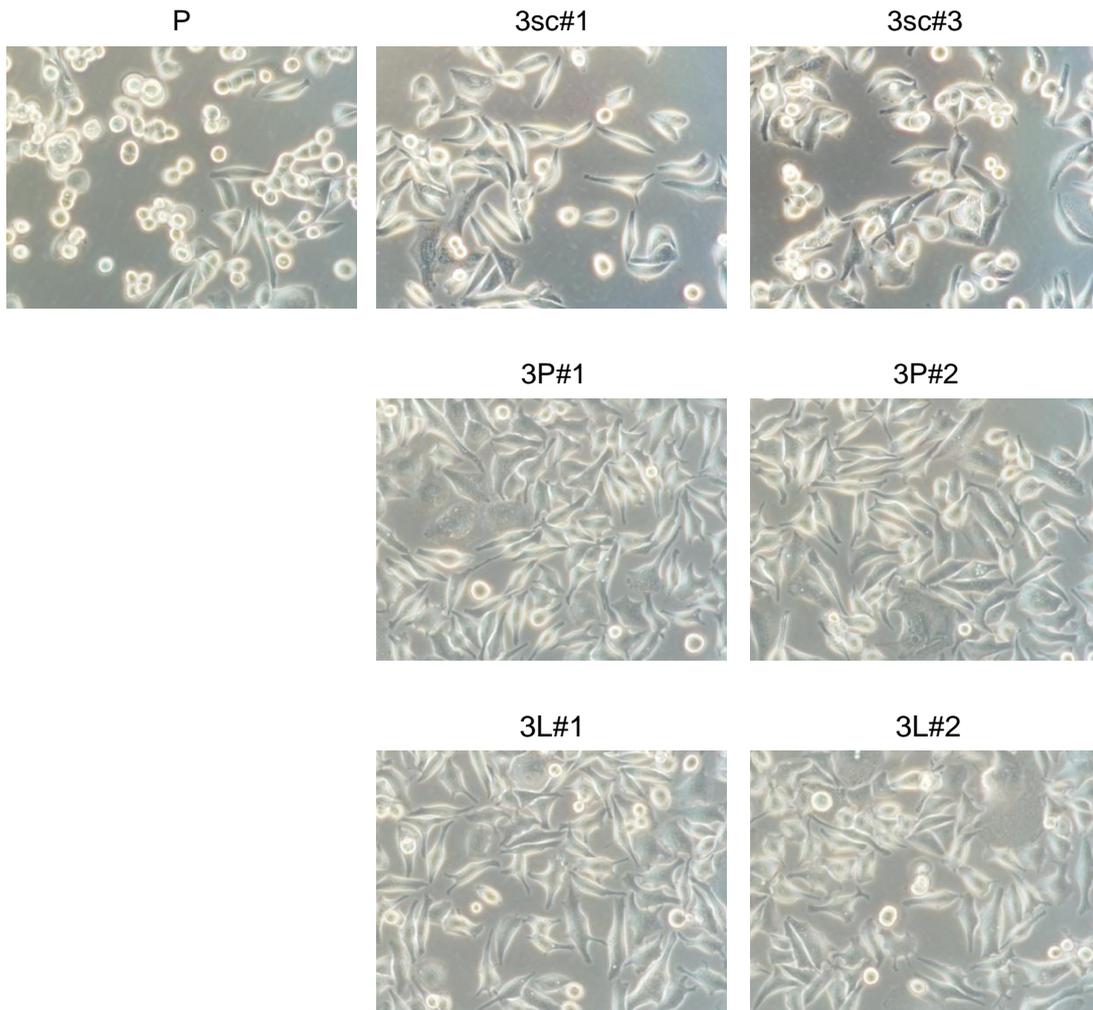


図 16. 各細胞株の形態

SUIT-2 細胞を用いた各移植モデルより樹立した細胞株の形態を示す。移植前の親株を P 細胞とする。また、3P 細胞、3L 細胞、3sc 細胞については複数のマウスから樹立しているため、#で由来する個体を区別する。

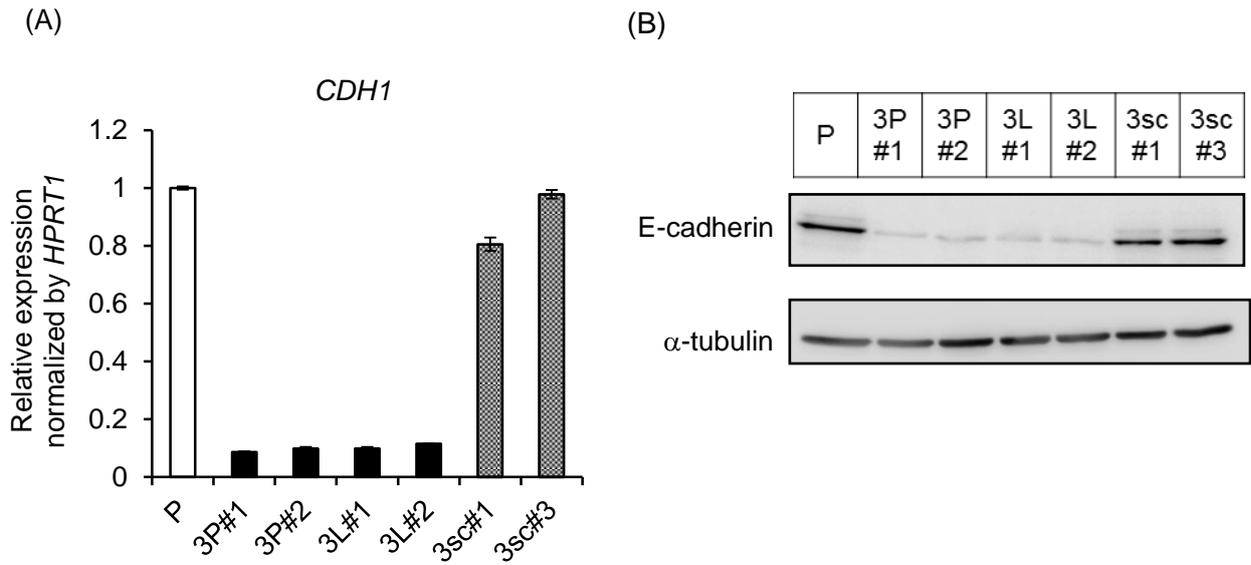


図 17. 各細胞株の E-cadherin の発現変化
 定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングを行い、SUIT-2 細胞由来の各細胞株 (P 細胞, 3P 細胞, 3L 細胞, 3sc 細胞) の *CDH1* mRNA (A) および E-cadherin タンパク (B) の発現を調べた。データは mean \pm SD で示す。

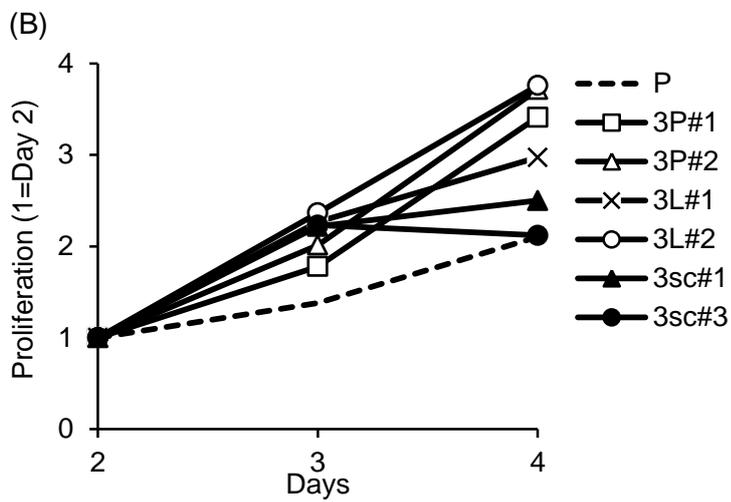
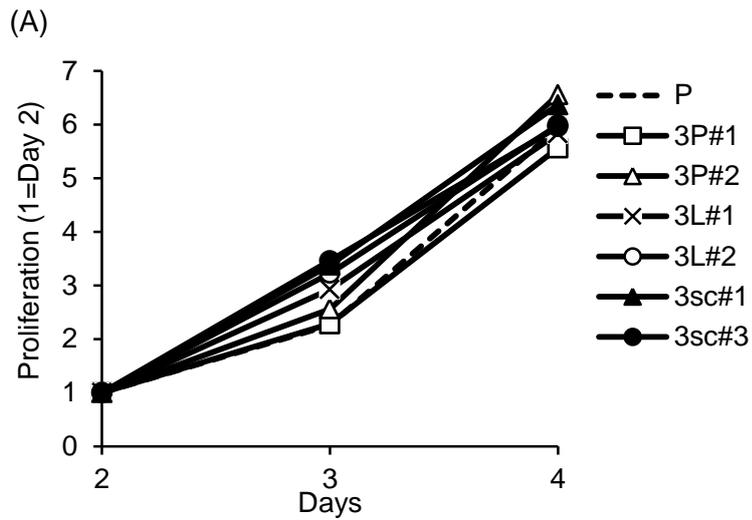
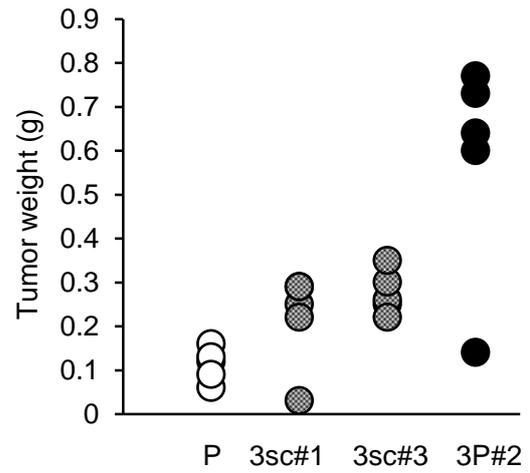
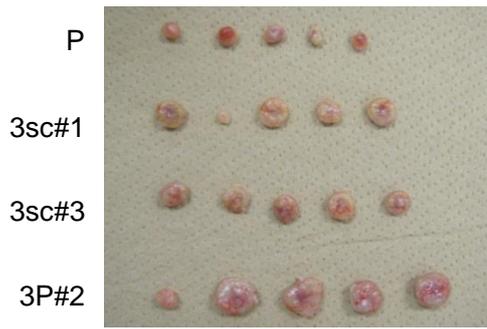


図 18. 各細胞株の *in vitro* における増殖能

SUIT-2 細胞 (P 細胞, 3P 細胞, 3L 細胞, 3sc 細胞) をプレートへ播種し、培養後 2~4 日の細胞数を Cell Count Reagent SF によって測定した。グラフはそれぞれ 10% FBS を含んだ培地での増殖 (A)、もしくは FBS を含まない培地での増殖 (B) を示す。

(A) Subcutaneous (Ectopic)



(B) Pancreas (Orthotopic)



図 19. 各細胞株の *in vivo* における造腫瘍能

SUIT-2 (P 細胞, 3sc#1 細胞, 3sc#3 細胞, 3P#2 細胞) を nude マウスへ皮下移植を行い、移植後 1 ヶ月の原発腫瘍を摘出した。原発腫瘍の写真 (左) および重量 (右) を示す (A)。また、SUIT-2 (P 細胞, 3P#2 細胞, 3L#2 細胞) を膺移植し、移植後 1 ヶ月の原発腫瘍の写真を示す (B)。

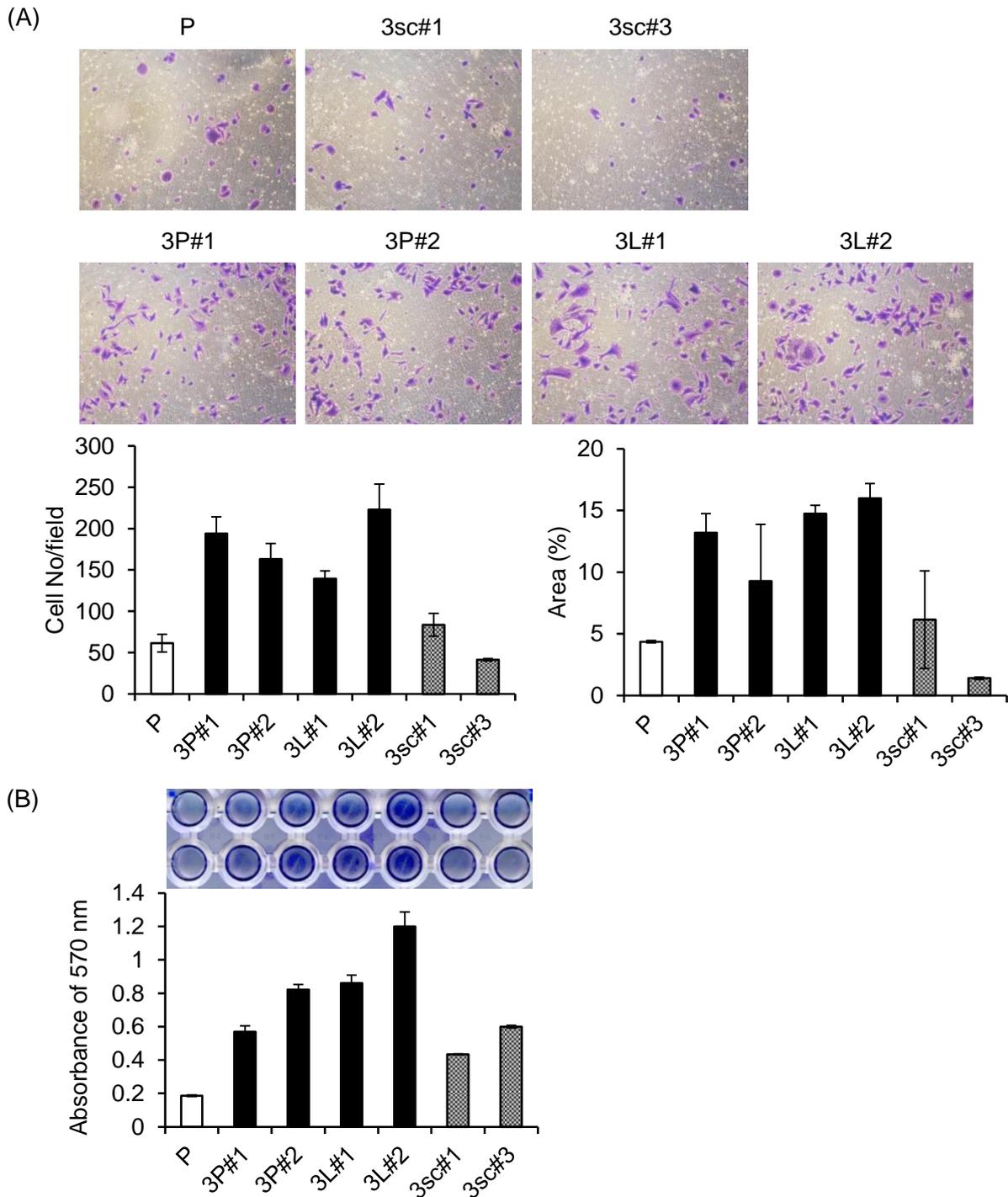


図 20. 各細胞株の浸潤能および接着能

(A) SUIT-2 細胞 (P 細胞, 3P 細胞, 3L 細胞, 3sc 細胞) を chamber の上層に播種し、24 時間培養した。培養後、chamber を回収し、固定およびクリスタルバイオレットによる染色を行った。Chamber 内のフィルターの写真 (上)、また浸潤細胞数および浸潤細胞の占める面積 (下) を示す。データはそれぞれ mean \pm SD で示す。

(B) Fibronectin をコートしたプレートに SUIT-2 細胞 (P 細胞, 3P 細胞, 3L 細胞, 3sc 細胞) を播種し、30 分間培養した。その後、付着した細胞を固定、クリスタルバイオレットによる染色を行った。さらに 33% 酢酸にて抽出した後、570 nm の吸光度を測定し、定量化した。染色像 (上) および定量化したグラフ (下) を示す。データは mean \pm SD で示す。

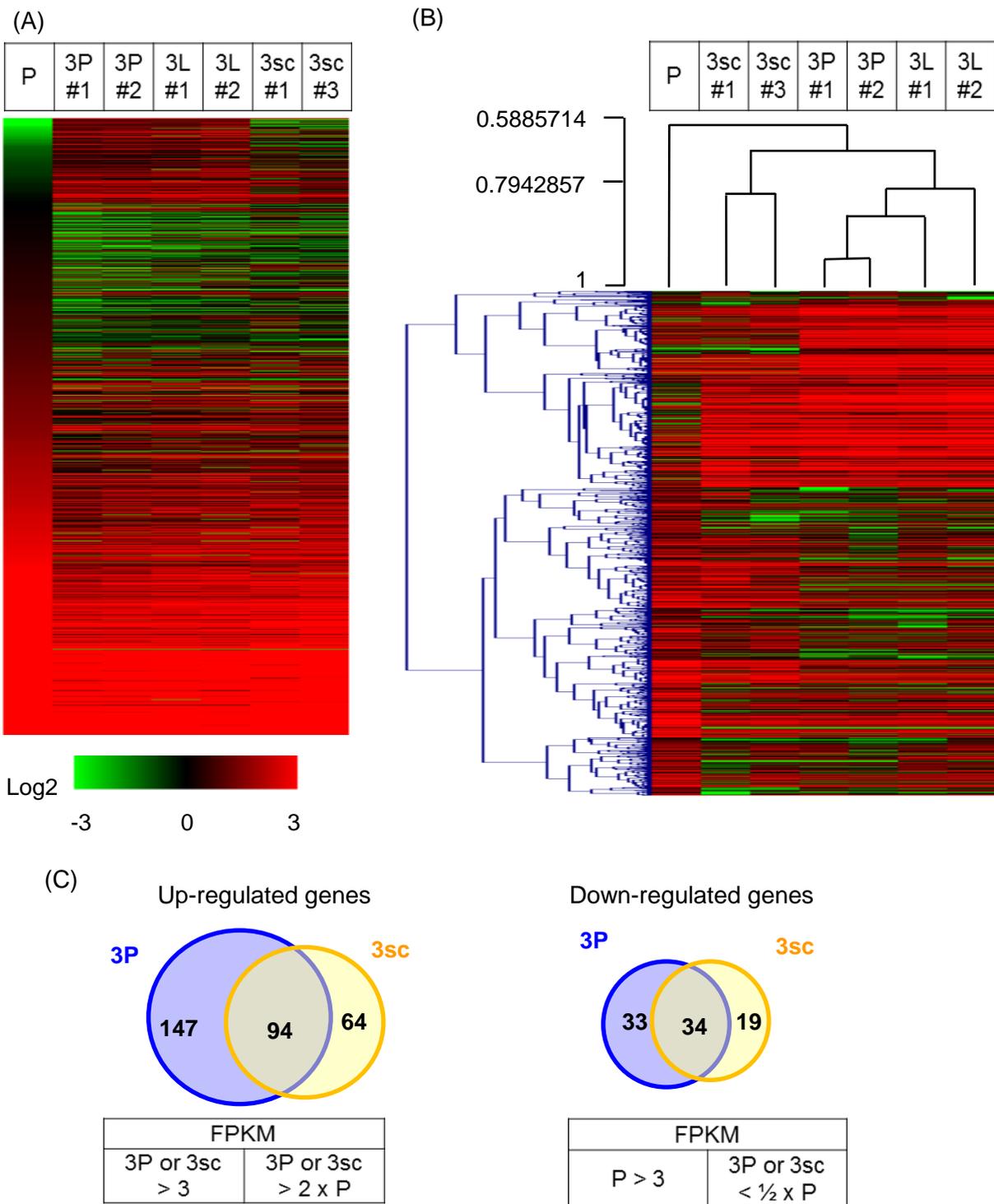


図 21. 各細胞株の遺伝子発現プロファイル

SUIT-2 細胞 (P 細胞, 3P 細胞, 3L 細胞, 3sc 細胞) について、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果について一部を抜粋し、Heatmap として示す (A)。また、(A) の解析結果に対し、クラスタリングを行った結果を示す (B)。さらに (A) の解析結果に対して、方法で記載した条件を適応し、P 細胞と比較して 3P 細胞もしくは 3sc 細胞で高発現している遺伝子の数 (Up-regulated genes)、また P 細胞と比較して 3P 細胞もしくは 3sc 細胞で低発現している遺伝子の数 (Down-regulated genes) を算出した (C)。さらにそれらの包含関係を調べた。図中の数字は、該当する遺伝子数を表す。

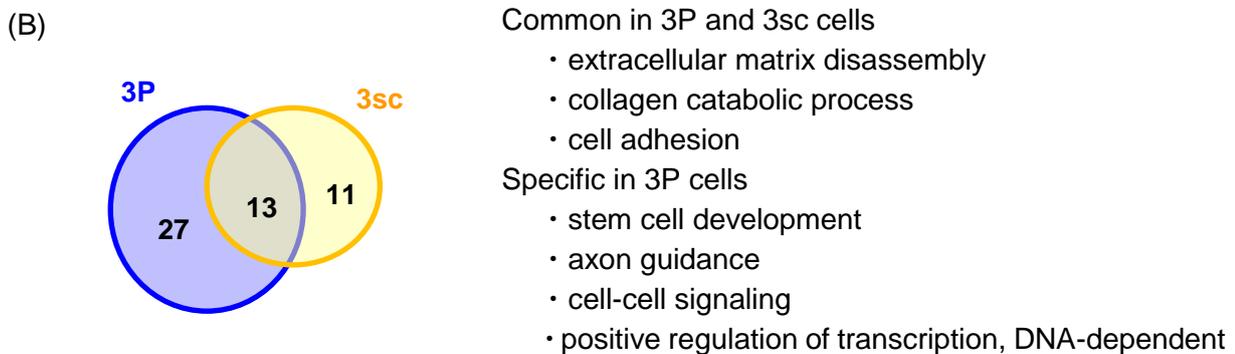
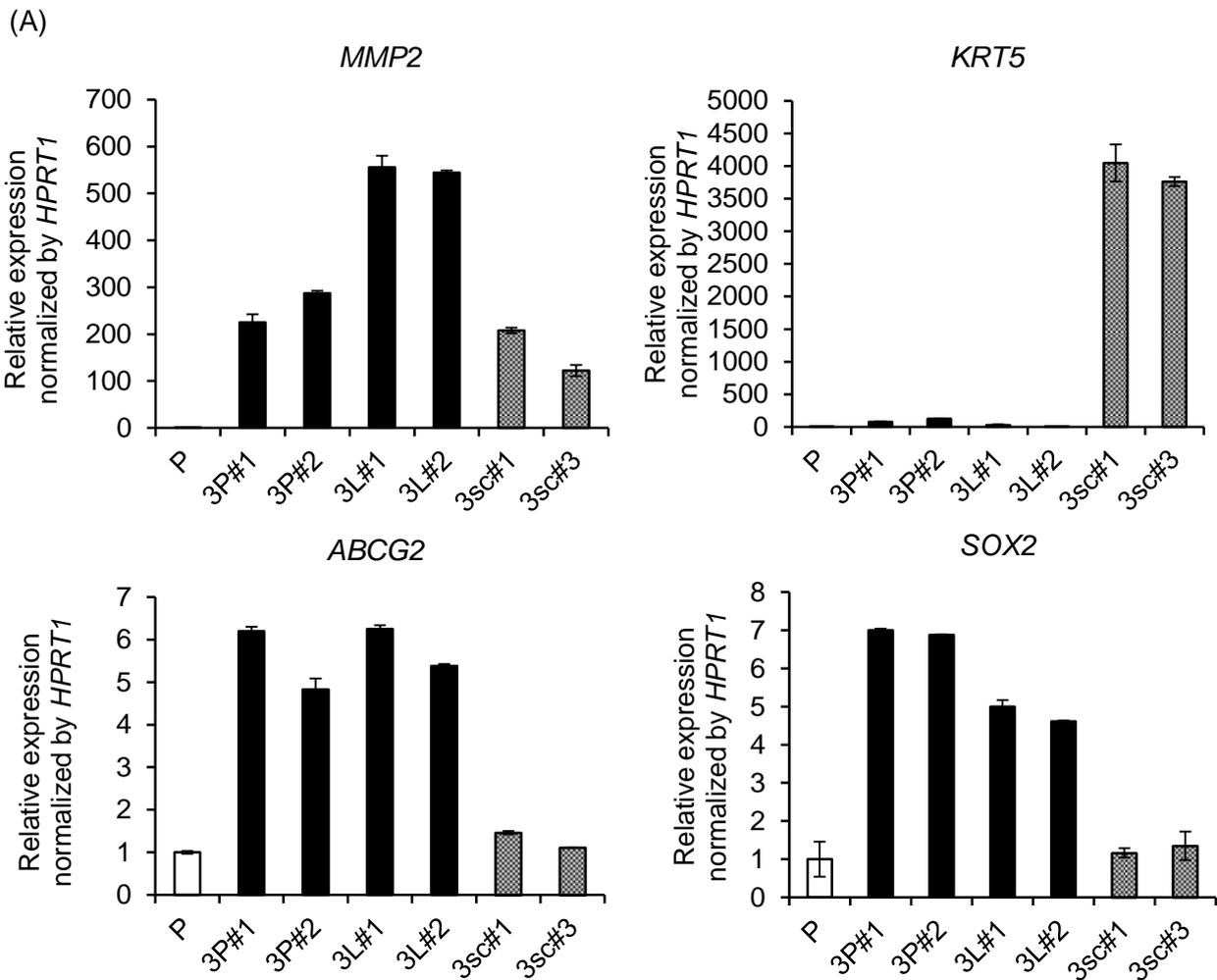


図 22. 各細胞株における代表的な遺伝子の発現

(A) SUIT-2 細胞 (P 細胞, 3P 細胞, 3L 細胞, 3sc 細胞) における代表的な遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR によって調べた。データはそれぞれ mean \pm SD で示す。

(B) 図 21 (C) の Up-regulated genes に該当した遺伝子の中でさらに 3P or 3sc > 3 x P に該当する遺伝子について、GO 解析をした結果を示す。P 細胞と比較して 3P 細胞、もしくは P 細胞と比較して 3sc 細胞で活性化されている biological process の数とそれらの包含関係内容を示す (左)。さらにこれらの biological process のうち、P 細胞と比較して 3P 細胞と 3sc 細胞とで共通して活性化されているもの (右上 Common in 3P and 3sc cells)、もしくは P 細胞と比較して 3P 細胞のみで活性化されているもの (右下 Specific in 3P cells)、の内容の一部を示す。

考察

がん細胞とそれを取り囲む組織の相互作用の役割を解析するために、ヒト膵がん細胞 SUIT-2 の皮下組織への異所性移植と膵組織への同所性移植の二つのモデルからそれぞれ樹立した高悪性株の獲得形質について比較した。組織学的解析より、各腫瘍組織において移植したがん細胞と宿主由来の細胞が相互に接触している様子が確認できた (図 14)。

SUIT-2 細胞は元来付着性細胞であるが、約半数の細胞が球体状の形態をしており、紡錘形の細胞の割合は少数である。一方で、膵移植モデルから樹立した 3P 細胞および 3L 細胞について、ほとんどの細胞が紡錘形の形態を示すなど、EMT により間葉系細胞に近似した性質を有していると推測された (図 16)。また、皮下移植から樹立した 3sc 細胞についても紡錘形の細胞が一部に出現しているが、その程度は 3P 細胞や 3L 細胞ほど顕著ではなかった。EMT の上皮マーカーである E-cadherin はがん細胞の浸潤に関与し、その発現低下はがん細胞の浸潤能を促進するなど悪性度と相関を示す^{74,75}。E-cadherin の発現低下および浸潤能、接着能の亢進が 3P 細胞および 3L 細胞特異的に認められるという結果から (図 17)、膵微小環境との相互作用ががん細胞のより高い悪性形質の獲得に寄与していることが示唆された。実際に *in vivo* における造腫瘍能の亢進は 3P 細胞で最も高い結果が得られており、膵移植から樹立した細胞株の悪性度が最も高いことがわかった (図 19)。また、これまでに SUIT-2 細胞は膵星細胞との共培養により、EMT を経て間葉系細胞様の形質を示すことが報告されている⁶⁸。今回、*in vitro* での増殖能の亢進の程度に比較して、*in vivo* での造腫瘍能の亢進が顕著である結果が得られたことから (図 18, 図 19)、がん細胞と膵星細胞を含む周囲の間質との相互作用が重要であることが示唆されている。

樹立した高悪性株は造腫瘍能、浸潤能などの獲得形質が親株のみならず、移植モデルごとに異なることを示したが、遺伝子発現レベルにおいてもその違いが顕著であることが示された (図 21)。遺伝子発現パターンのクラスタリングによる親株との比較、さらには各高悪性株にて発現が上昇もしくは低下した遺伝子数を解析した結果から、遺伝子レベルにおいても膵組織から樹立した 3P 細胞および 3L 細胞でより顕著に変化していることが示唆された。したがって、SUIT-2 細胞は皮下組織よりも膵組織においてより活発に間質との相互作用がなされて遺伝子発現レベルでの変化が生じた結果、高悪性度を示すようになったと予想される。

また、GO解析の結果、3P細胞および3sc細胞に共通してECMの再形成やコラーゲン産生などが認められたことから、いずれの移植モデルにおいても移植されたがん細胞が、宿主の周囲組織へ生着する過程で、ECMなどとの相互作用が活性化されていることが示唆された。一方で3P細胞に特異的に認められる形質として、幹細胞様の形質やaxon guidanceに関係するシグナル伝達などがあることがわかった。実際に、3P細胞および3L細胞特異的に幹細胞マーカーとして知られている*ABCG2*や*SOX2*が高発現している結果からも、腫瘍微小環境ががん幹細胞を優位にしている可能性が示唆された⁷⁶⁻⁷⁸。さらに高悪性株発現遺伝子群について、DAVIDによるシグナル伝達経路の解析を行った結果、3P細胞特異的にHedgehogシグナル経路が活性化されていることがわかった(高橋恵生, 他, 未発表)。これらの考察はaxon guidanceを制御する経路の異常やHedgehogシグナル経路の活性化が、膵がんの進展に関係しているという過去の報告とも一致することから、今回樹立した高悪性株の妥当性が示唆された⁷⁹⁻⁸²。なお、3P細胞と3L細胞の違いについても解析を行ったが、発現量の変化が認められる遺伝子群は予想されたよりも少ないことから(図21(B))、転移巣よりも原発腫瘍にてがん細胞の遺伝子発現が顕著に変化することが、その後の転移を含めた進展に重要であることが考察される。

また、細胞形態やE-cadherinの発現をはじめ、高悪性株が獲得した多くの形質は、*in vitro*で培養を続け、細胞の継代を重ねても維持されることが観察されている。したがって、今回観察されている獲得形質は安定化されていると考えられる。このような安定化された高悪性株の形質がどのように獲得されたかについては、大きく二つの機序が想定される。一つ目は、移植先の腫瘍微小環境に適合した一部の細胞や、元来悪性度の高い細胞などが移植の過程で「セレクション」された可能性である。高悪性株の遺伝子発現パターンを見てみると、一部はがん幹細胞に遺伝子発現パターンが類似しており、腫瘍微小環境が膵がん幹細胞の維持に有利に働き、これにより高悪性株中の非がん幹細胞が淘汰されたと解釈することができる。二つ目は、がん細胞が腫瘍微小環境との相互作用を介して「教育」を受けて形質が変化した可能性である。特にがん細胞の特定の領域にヒストンのメチル化修飾などのエピジェネティックな変化が生じ、異なる転写活性のパターンを示すことで、悪性度の高い形質を獲得した可能性である。親株では発現が全く認められない特定の受容体タンパクの発現が高悪性株ではヒストン修飾状態の変化により発現回復している可能性なども観察されている(高橋恵生, 他, 未発表)。これらの結果から考察して、現時点では「セ

レクシオン」のみならず、微小環境下での「教育」の二つの機序が関与することで高悪性株が樹立されたと考えている。

第4章 高悪性株を用いた膵がん進展における悪性化因子の探索

要旨

前章より膵組織との相互作用が悪性形質の獲得に重要であることが示唆されたことから、本章では膵組織への同所性移植モデルを使用して、膵がんの悪性化に寄与する因子の同定を試みた。複数のヒト膵がん細胞から高悪性株の樹立を行った後、それらについて RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析し、高悪性株発現遺伝子群を抽出した。その結果、複数の遺伝子がそれぞれの細胞株に共通して発現亢進していることがわかった。本章ではその中で Nestin についてさらなる解析を行い、分子標的および診断マーカーとしての有用性を評価した。

序論

前章にてヒト膵がん細胞株を用いた膵組織への同所性移植において、より高い悪性度の形質獲得がなされることについて述べた。そのような膵がん細胞と膵組織との相互作用によって獲得する因子の中から、膵がんの進展に重要である遺伝子の探索をさらに行うこととした。そこで前章で扱ったヒト膵がん細胞 SUIT-2 に加え、PANC-1、MiaPACA-2、BxPC3 の 3 種類のヒト膵がん細胞から膵移植を用いて高悪性株の樹立を行い、RNA-seq を用いてその遺伝子発現を網羅的に解析することとした。用いた細胞株はそれぞれ *KRAS* や *TP53*、*SMAD4* などに欠失や変異があることがわかっており⁸³ (表 2)、それら異なる背景を持った細胞株から樹立した高悪性株に共通して認められる遺伝子が膵がんの治療ターゲットや診断マーカーとなる可能性を解析した。*Nestin* は中枢神経系の神経幹細胞で発現している VI 型中間径フィラメントである^{84,85}。その発現は細胞分化によって低下するため、成人では神経新生が起こっている脳の一部でしか発現していない。しかし、グリオーマなどの神経原性腫瘍では *Nestin* が高発現に認められるなど、*CD133* 等とともにがん幹細胞マーカーの一つとして認識され、その発現が予後と逆相関することが知られている^{84,86}。また、他の腫瘍においても *Nestin* の発現亢進が認められており、特に肉腫などでは *CD133* に加え、*Oct3/4* や *Nanog* とともに幹細胞マーカーとして認識されている⁸⁵。近年、膵がんにおいても悪性度の高い膵がん細胞で *Nestin* が発現していることに加え、血管新生における役割や幹細胞マーカーとして有用性が認識されつつある⁸⁷。前章にて SUIT-2 の高悪性株 3P 細胞および 3L 細胞では、幹細胞様の遺伝子発現形質が認められることを示した。このような結果からも、膵組織との相互作用から樹立された高悪性株はがん幹細胞形質を示す可能性があると考えられる。

	K-ras	p53	p16	Smad4	TβRII
<i>Gene</i> Cell line	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>CDKN2A/ INK4A</i>	<i>SMAD4/ DPC4</i>	<i>TGFBR2</i>
SUIT-2	mut	mut	mut		
PANC-1	mut	mut	del		
MiaPACA-2	mut	mut	del		del
BxPC-3		mut	del	del	

表 2. ヒト膵がん細胞の遺伝的背景

本実験で使用した 4 種類のヒト膵がん細胞 SUIT-2、PANC-1、MiaPACA-2、BxPC3 において、高頻度で変異や欠損が報告されている遺伝子を示す。

mut : 変異、del : 欠損

方法

細胞

PANC-1 細胞、MiaPACA-2 細胞は DMEM (high glucose, GIBCO) に 10% FBS および Penicillin/Streptomycin を加えた培地で、37°C 0.05% CO₂ 下にて培養した。BxPC3 細胞については RPMI 1640 (GIBCO) に 10% FBS および Penicillin/Streptomycin を加えた培地で、上と同条件で培養した。

GFP およびルシフェラーゼの安定恒常発現株の作製

膵組織への同所性移植からの高悪性株の樹立の際に GFP によりマウスの宿主由来の細胞と区別するために、前述したレンチウイルスベクターによる遺伝子導入の方法から GFP を安定に恒常発現する細胞株を樹立した (p32 参照)。また、生物発光イメージングによってマウスでの腫瘍増殖を観察するために、同様の方法にてルシフェラーゼも安定発現させた。

膵移植モデルを用いた高悪性株の樹立

全ての動物実験は東京大学大学院医学系研究科の実験動物委員会の定める指針に従った。SUIT-2 細胞の膵移植モデルから高悪性株を樹立した際と同様の方法で、PANC-1 細胞、MiaPACA-2 細胞、BxPC3 細胞を用いて、それぞれ高悪性株を樹立した (p33 参照)。この 3 種類の細胞については 5×10^5 cells/mouse で移植を行った。3 回の膵移植後、PANC-1 細胞については原発巣から樹立した細胞株を 3P 細胞、さらに肝転移巣から樹立した細胞株を 3Liv 細胞と名付けた。また、MiaPACA-2 細胞についても同様に原発巣から 3P 細胞、肝転移巣から 3Liv 細胞を樹立した。BxPC3 細胞については転移巣がほとんど認められなかったため、3P 細胞のみを使用することとした。

In vivo の造腫瘍能の評価

各膵がん細胞から樹立した細胞株を膵移植し、移植後 1 ヶ月で腫瘍を摘出した。用いた細胞および細胞数は以下の通りである。

PANC-1 : P 細胞, 3P#2 細胞, 3Liv#2 細胞, 1×10^6 cells/mouse

MiaPACA-2 : P 細胞, 3P#2 細胞, 3Liv#2 細胞, 4×10^5 cells/mouse

BxPC3 : P 細胞, 3P#1 細胞, 3P#2 細胞, 5×10^5 cells/mouse

RNA の抽出および cDNA の合成、定量的リアルタイム PCR

前述の方法で行った (p33-34 参照)。

使用したプライマーは以下の通りである。

NES	Forward	5'-aggaggagtgggttctg-3'
	Reverse	5'-ggagtggagtctggaagg-3'

SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング

前述の方法で行った (p34-35 参照)。

使用した抗体は以下の通りである。

一次抗体	二次抗体
抗 Nestin 抗体 (Millipore)	HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Cell Signaling)
抗 α -tubulin 抗体 (Sigma)	

RNA-seq

前述の方法で行った (p36 参照)。

高悪性株発現遺伝子群の抽出

RNA-seq の結果を用いて、各細胞株にて以下の条件に合致する高発現している遺伝子 (高悪性株発現遺伝子群) をそれぞれ抽出、複数の腫がん細胞の高悪性株で共通して発現上昇している遺伝子を探索した。

条件: 「3P 細胞での FPKM 値が 1 以上」かつ「3P 細胞での FPKM 値が親株 P 細胞での FPKM 値の 2 倍以上」

siRNA による遺伝子発現ノックダウン

遺伝子発現ノックダウンのため、Small interfering RNA (siRNA) を使用した。Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) を使用し、siRNA (Stealth siRNA/NES, 以下 siNES, Invitrogen, 4 nM) およびコントロール siRNA (Stealth siRNA negative control medium or high GC duplex, 以下 siNTC, Invitrogen, 4 nM) をトランスフェクションした。

用いた配列は以下の通りである。

siNES#1	5'- ccacuccaguuuagaggcuaaggau -3'
siNES#2	5'- ggugggucuagaguguucagcauau -3'
siNES#3	5'- cagccuuucuuaagaaccaagaauu -3'

細胞増殖アッセイ

12 well plate に細胞を播種し、siNES および siNTC をトランスフェクションした。5 日後に、採取した細胞をトリパンブルーにて細胞を染色し、血球計算盤を用いて生細胞数を計測した。

結果

高悪性株発現遺伝子群の抽出

前章にて SUIT-2 細胞から高悪性株の樹立を行った方法と同様の方法で、PANC-1 細胞、MiaPACA-2 細胞および BxPC3 細胞の膵組織への同所性移植モデルにより細胞株を樹立した。樹立した 3P 細胞もしくは 3Liv 細胞はそれぞれ親株 P 細胞と異なった細胞形態を呈していた (図 23)。SUIT-2 細胞と異なり、PANC-1、MiaPACA-2、BxPC3 細胞ではいずれも膵移植で得た細胞は球体状の細胞が増加する傾向が見られた。全ての細胞株において再び膵移植を行い、*in vivo* での造腫瘍能が親株と比較した。その結果、SUIT-2 細胞以外の 3 種類の膵がん細胞由来の 3P 細胞および 3Liv 細胞においても、その造腫瘍能が亢進していることがわかった (図 24)。以上より、各膵がん細胞の膵移植から樹立した細胞株は高悪性株であると考えられた。

次にそれぞれの膵がん細胞由来の 3P 細胞で発現が亢進している遺伝子群が膵がんの進展に寄与している可能性があるかと予想し、このような遺伝子群を高悪性株発現遺伝子群として抽出することを試みた。まず SUIT-2 細胞、PANC-1 細胞、MiaPACA-2 細胞、BxPC3 細胞から樹立した各細胞株の遺伝子発現を RNA-seq で網羅的に解析し、四つの膵がん細胞毎に、親株 P 細胞に比べ 3P 細胞で発現が亢進している遺伝子群を抽出した。次に、これらの高悪性株発現遺伝子群について、四つの膵がん細胞間に共通しているものを同定した (図 25)。図に示す条件においては各細胞株二つに共通して発現亢進している遺伝子が 30~70 個程度存在することが明らかとなった。また、3 種類の膵がん細胞由来の高悪性株に共通して高発現している遺伝子が少数ながらも存在し、これらには *NES* や Serine peptidase inhibitor, clade E, member 1 (*SERPINE1*) などが該当することが判明した。

各膵がん細胞由来高悪性株での Nestin の発現

抽出した高悪性株発現遺伝子群のうち、Nestin は多くの腫瘍でその発現が亢進しているとの報告がある^{85, 88}。膵がんについても Nestin が血管新生など腫瘍促進的に作用するとする報告がある^{84, 87}。よって、以降の解析では膵がん細胞高悪性株における Nestin の発現と機能の解析を行うこととした。SUIT-2 細胞の 3P 細胞、3L 細胞および 3sc 細胞において Nestin をコードする *NES* mRNA および Nestin タンパクの発現を確認したところ、3P 細胞および 3L 細胞特異的にその発現の亢進が観察された (図 26 (A))。また、他の膵がん細胞の膵移植

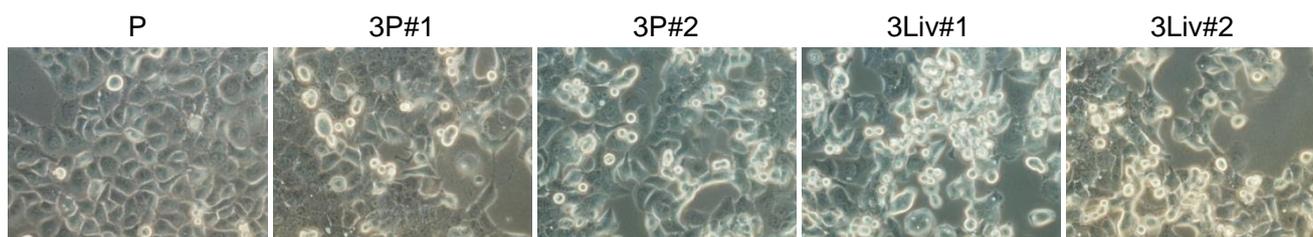
から樹立した高悪性株においても *NES* mRNA および Nestin タンパクの発現上昇を確認した (図 26 (B), (C), (D))。これらの結果より、悪性度の高い膵がん細胞にて Nestin の発現が亢進していることが観察された。

siRNA による Nestin のノックダウンと細胞増殖への影響

Nestin が高発現している SUI-2-3P#2 細胞もしくは PANC-1-3P#2 細胞に siNES をトランスフェクションにより導入し、*NES* mRNA および Nestin タンパクの発現を観察した (図 27)。その結果、使用している全ての siNES の導入によって、Nestin 発現がノックダウンされていることが確認できた。

Nestin の発現をノックダウンすることによる細胞形態の変化を観察した。その結果、SUI-2-3P#2 について Nestin をノックダウンすることで、形態が大きく、辺縁が不明瞭な細胞が出現することがわかった (図 28 (A))。また、一部アポトーシスを引き起こしているような傾向も認められた。同様の実験を PANC-1-3P#2 細胞を用いて行ったところ、ここでも細胞死が誘導されることが示唆された (図 28 (B))。さらにその傾向は SUI-2-3P#2 細胞の場合と比較し、より顕著であった。

(A) **PANC-1**



(B) **MiaPACA-2**



(C) **BxPC3**

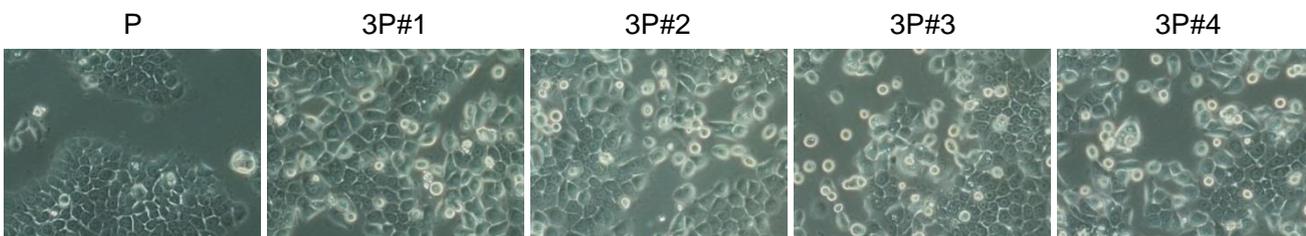


図 23. 各膵がん細胞由来の細胞株の形態
各細胞について親株 P 細胞および樹立した高悪性株の細胞形態を示す ((A) PANC-1 細胞,
(B) MiaPACA-2 細胞, (C) BxPC3 細胞)。

(A) PANC-1



(B) MiaPACA-2



(C) BxPC3



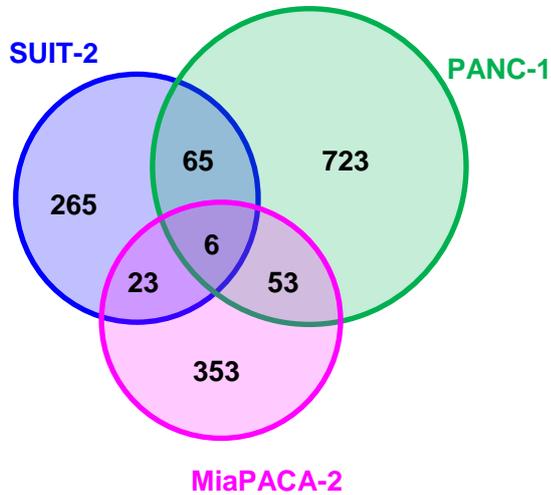
Tumor extracted



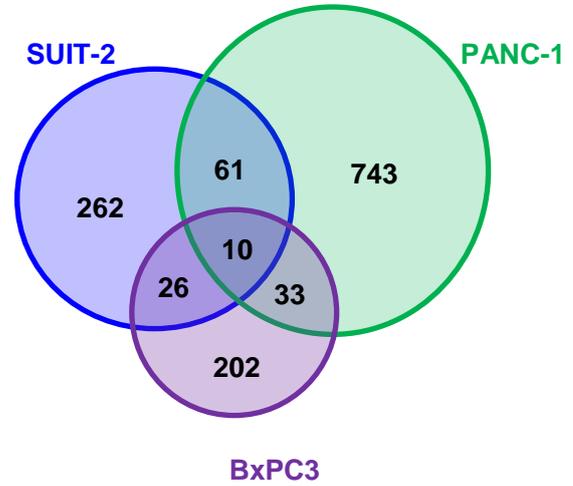
図 24. 各膵がん細胞由来の細胞株の *in vivo* における造腫瘍能

各膵がん細胞由来の細胞株をそれぞれ膵移植し、移植後 1 ヶ月に原発腫瘍を摘出した。膵臓と一塊にして摘出された腫瘍の写真を示す ((A) PANC-1 (P 細胞, 3P#2 細胞, 3Liv#2 細胞)、(B) MiaPACA-2 (P 細胞, 3P#2 細胞, 3Liv#2 細胞)、(C) BxPC3 (P 細胞, 3P#1 細胞, 3P#2 細胞))。特に (C) BxPC3 細胞については肉眼的に膵組織を区別し、腫瘍のみを分離した写真 (右) も示す。

(A)



(B)



FPKM	
3P > 1	3P > 2 x P

図 25. 各膵がん細胞における高悪性株発現遺伝子の発現

各膵がん細胞由来の細胞株 (P 細胞, 3P 細胞) について、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。この解析結果に対して、方法に記載した条件を適用し、各細胞別に、親株 P 細胞と比較して 3P 細胞で高発現している遺伝子の数を算出した。さらにそれら遺伝子数に関して、細胞間での包含関係を調べた。図中の数字は、SUIT-2 細胞、PANC-1 細胞、MiaPACA-2 細胞で発現上昇していた遺伝子および細胞間で重複して認められた遺伝子の数 (A)、もしくは SUIT-2 細胞、PANC-1 細胞、BxPC3 細胞で発現上昇していた遺伝子および細胞間で重複して認められた遺伝子の数 (B) を表す。図中の数字は、該当する遺伝子数を表す。

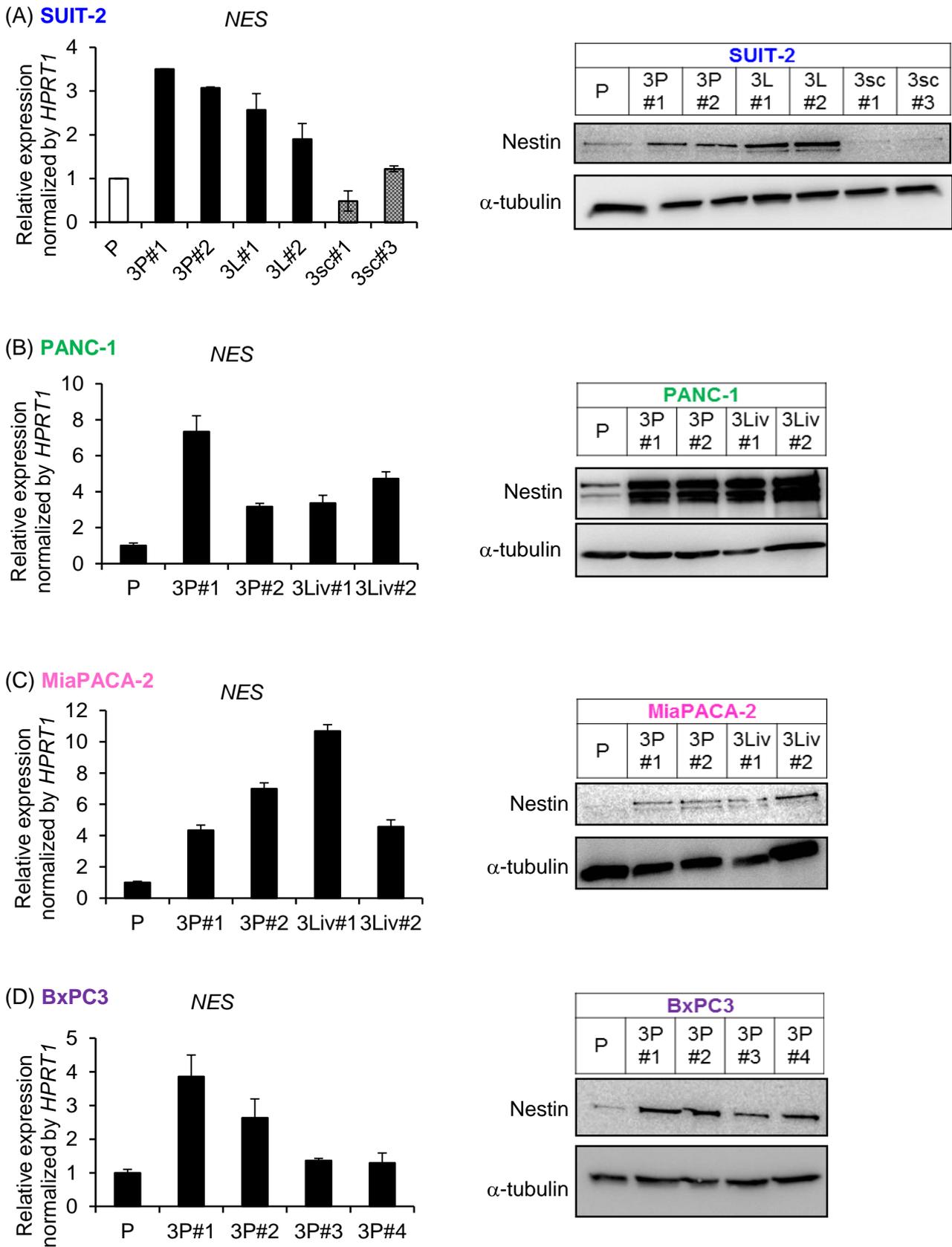
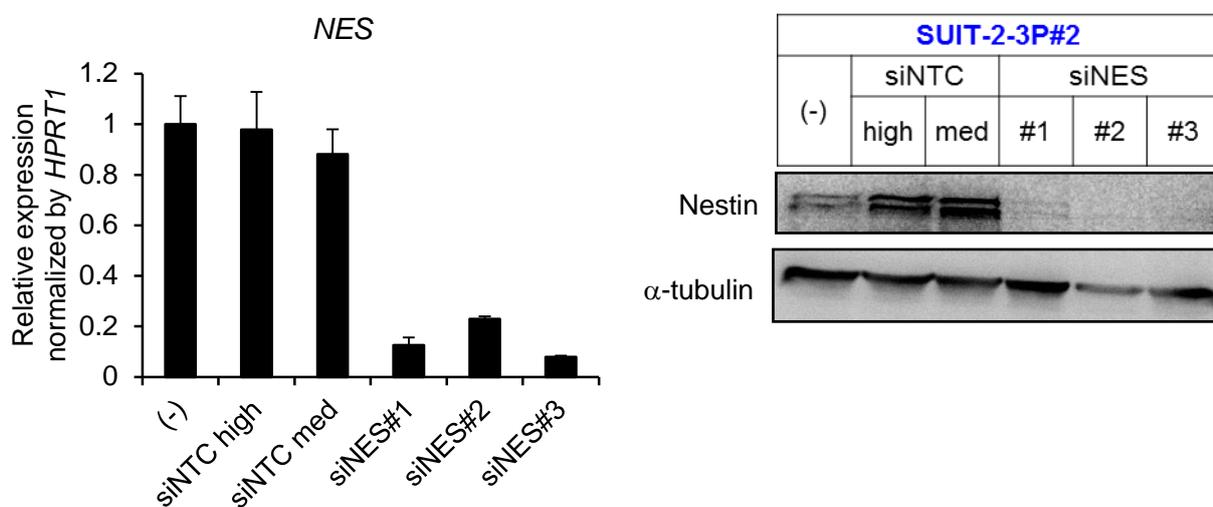


図 26. 高悪性株特異的な Nestin の発現
 各膵がん細胞 (SUIT-2 (A), PANC-1 (B), MiaPACA-2 (C), BxPC3 (D)) 由来の親株および高悪性株について、定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングを行い、NES mRNA (左) および Nestin タンパク (右) の発現を調べた。データはそれぞれ mean \pm SD で示す。

(A) **SUIT-2-3P#2**



(B) **PANC-1-3P#2**

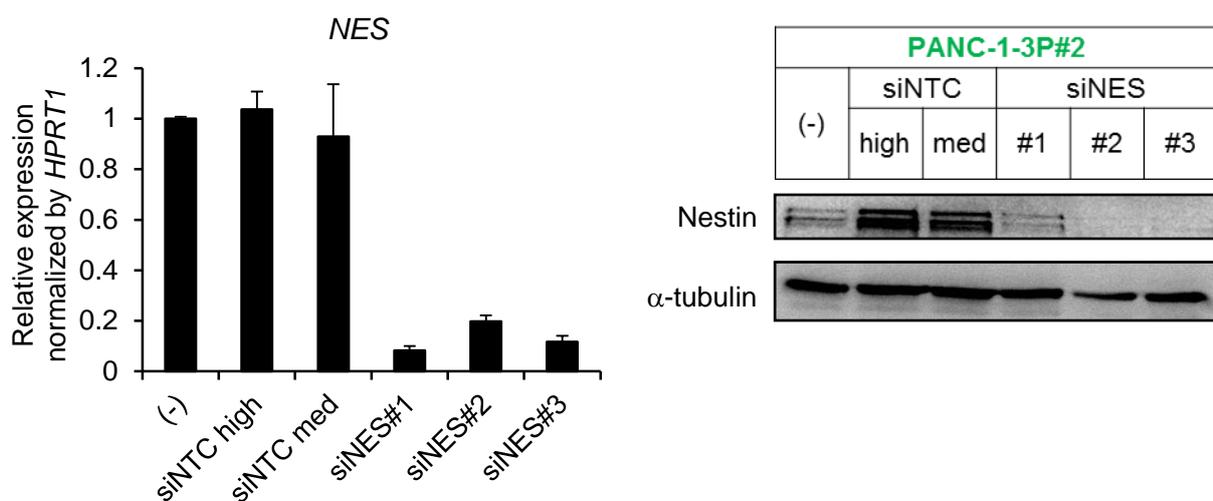
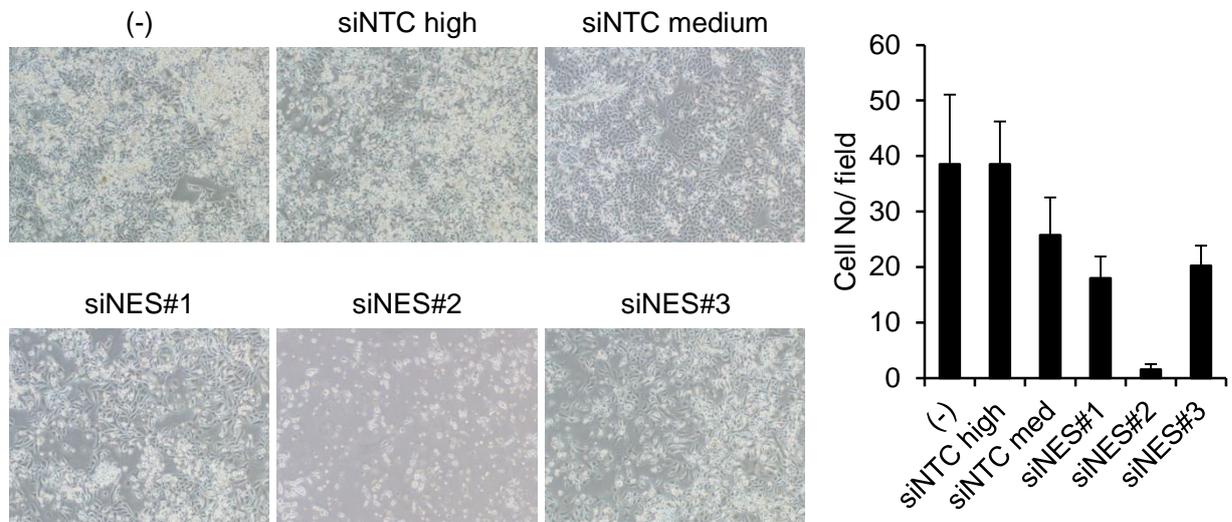


図 27. siRNA による Nestin のノックダウン

各臓がん細胞 (SUIT-2-3P#2 (A), PANC-1-3P#2 (B)) について、siNES をトランスフェクションし、定量的リアルタイムPCRおよびウエスタンブロッティングを行い、*NES* mRNA (左) および Nestin タンパク (右) の発現を調べた。

(A) **SUIT-2-3P#2**



(B) **PANC-1-3P#2**

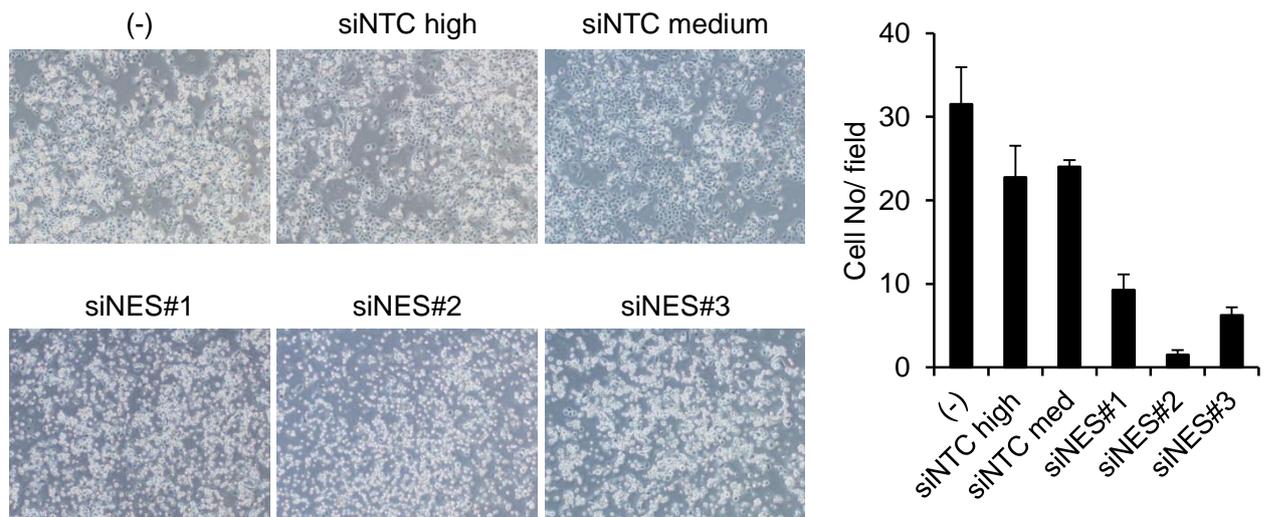


図 28. Nestin のノックダウンによる細胞形態および増殖の変化

各臓器がん細胞 (SUIT-2-3P#2 (A), PANC-1-3P#2 (B)) について siNES をトランスフェクションし、5 日後の細胞形態 (左) および細胞数 (右) を示す。データは mean \pm SD で示す。

考察

今回、膵組織への同所性移植を利用することで、複数のヒト膵がん細胞から高悪性株を樹立することができた。また、それら樹立した高悪性株間で共通して高発現している遺伝子が複数存在することが分かった。四つの膵がん細胞は遺伝的背景が大きく異なるにもかかわらず、二つ以上の細胞で共通して発現が上昇している遺伝子は、予想よりも多く存在した。その中で今回は Nestin に着目し、さらに解析を進めることとした。

Nestin は中枢神経系の神経幹細胞で一過性に発現する VI 型中間径フィラメントに区分され、細胞内の代謝や核内への情報伝達にも寄与する細胞骨格タンパク質である^{84, 87}。Nestin は神経幹細胞マーカーとして考えられており、細胞分化に従いその発現が低下し、他の中間径フィラメントに置き換わる。また、1600 個以上のアミノ酸から成るタンパク質であり、C 末端は Vimentin などの他の中間径フィラメントとヘテロダイマーを形成して機能していると考えられている^{84, 87}。悪性腫瘍においては特にグリオーマ症例の予後と Nestin 発現が逆相関を示すことが知られている⁸⁶。膵がんにおいても Nestin の発現が亢進しているという報告もある⁸⁵。また、これまでに報告されている臨床データの再解析を行ったところ、16.5%の膵がん症例では NES 遺伝子が増幅されていることが分かった⁸⁹。さらに PANC-1 細胞の実験転移モデルでは、肺や肝臓などの転移巣ではがん細胞での Nestin が高発現することが報告されている^{90, 91}。今回、遺伝的背景の異なる四つのヒト膵がん細胞から樹立した高悪性株に共通して、Nestin の発現が大きく亢進していることが示された (図 26)。さらに、siNES によるノックダウンを行ったところ、一部ではあるが細胞死が誘導されたことから (図 28)、Nestin の発現が膵がん細胞の生存に大きく関わっていることが示唆された。これまでも PANC-1 の膵移植モデルで Nestin に対する siRNA を使用することで、原発腫瘍および転移性腫瘍の体積が縮小するとの報告もなされている⁹¹。したがって、抗体や阻害剤などを用いて膵がん細胞の Nestin の機能を阻害することにより、治療効果が期待できる可能性が示唆された。

膵がんにおけるがん幹細胞マーカーとして、CD44、Aldehyde dehydrogenase (ALDH)、CD133、Epithelial specific antigen (ESA) などが報告されている^{84, 92}。これらに加え、さらに近年では Nestin が膵がん幹細胞マーカーとして注目されるようになりつつある。前章にて高悪性株での SOX2 など他の幹細胞マーカーの発現の亢進 (図 22)、さらには EMT を経て間葉系細胞に近似した形質を示すという結果から (図 16, 17)、今回樹立した高悪性株は膵組織

の間質との相互作用の結果、がん幹細胞形質を獲得したとも推測される。がん幹細胞は化学療法抵抗性を示す細胞集団と考えられており、それらを死滅させることが再発を防ぐ有効な一手である。そこで幹細胞マーカーとして認識されつつある Nestin の発現を抑制することが、様々ながん細胞の抗がん剤耐性を解除する可能性も考えられる。しかし、他の種類のがんと異なり、膵がんにおいては Nestin 発現と悪性度に相関があまり認められないとの報告もなされている^{88, 93}。したがって、今回認められた高悪性株での Nestin 発現がどのように膵がんの悪性化に寄与しているのか、そのメカニズムの解明は不可欠であると考えられる。

NES 以外の高悪性株発現遺伝子群の一つに、SERPINE1 が認められた。SERPINE1 の翻訳産物である Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は Tissue-type plasminogen activator (tPA) や Urokinase-type plasminogen activator (uPA) を阻害する線溶系の調節因子である⁹⁴。がんにおいては、血管新生をはじめ、がん細胞のアポトーシス阻害作用があるとの報告もなされている⁹⁴⁻⁹⁶。また、特に乳がん症例においては PAI-1 の発現が予後と負の相関を示すという報告もある^{97, 98}。今回樹立した高悪性株において共通して PAI-1 が高発現していることが確認された (高橋恵生, 他, 未発表)。これまでの報告は PAI-1 の発現を乳がん腫瘍組織に対する免疫染色によって評価した報告が多いが、PAI-1 は分泌タンパクでもあり、血中濃度の測定が比較的容易であることから、診断バイオマーカーとしての有用性もあると予測する。

このように膵組織への同所性移植を用いて、複数のヒト膵がん細胞から樹立した高悪性株に共通して発現が上昇している遺伝子に着目し、その機能を解析することにより、新たな治療標的や診断バイオマーカーとなる可能性がある分子を探索できることが示唆された。

第5章 結語

本研究において、生物発光イメージングおよびがん細胞移植モデルを応用し、異なる移植モデルを比較することによって、腫瘍微小環境の違いががん細胞の挙動および形質にもたらす変化を多角的に観察した。まず、生物発光イメージングにより、マウス乳がん細胞 4T1 の移植モデルにおける炎症反応を時空間的に解析した。その結果、炎症性微小環境の形成には免疫応答のみならず、がん細胞を取り囲む組織での複合的な相互作用の重要性が示唆された。従来から腫瘍微小環境の違いががん細胞の挙動に影響があるとの認識はされていたが、このように経時的な変化を観察している例はほとんどない。したがって、本知見はがんの進展に伴って変化する腫瘍微小環境の理解に有用な情報を示すと考えている。また、腭がん細胞の皮下移植もしくは腭移植を行い、がん細胞の挙動を比較した。特に各移植モデルから樹立した高悪性株の解析を行うことで、宿主組織の違いががん細胞の挙動のみならず、遺伝子発現に大きく影響を与えていることが示唆された。さらに腭移植モデル由来の高悪性株特異的に発現が変動する遺伝子に着目することで、がんの進展に重要な分子の抽出が可能となることが示唆された。このように腫瘍微小環境下でのがん細胞が獲得する形質を、複数の移植モデル、複数のがん細胞で比較することにより、がんの進展でかぎとなる分子を同定し、新たな治療戦略へ応用されることが期待される。

参考文献

- 1 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
- 2 Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2005; 7: 513-520.
- 3 Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140: 883-899.
- 4 Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 239-252.
- 5 Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 392-401.
- 6 Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21: 309-322.
- 7 Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005; 121: 335-348.
- 8 Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22: 231-237.
- 9 Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013; 501: 346-354.
- 10 Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 839-849.
- 11 Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res*. 2006; 66: 3351-3354.
- 12 Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17: 279-284.
- 13 Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol*. 2007; 170: 793-804.
- 14 Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 852-857.

- 15 Weinberg RA. The biology of cancer (Garland Science). pp. 538-539
- 16 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420: 860-867.
- 17 Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: 539-545.
- 18 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454: 436-444.
- 19 Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 759-771.
- 20 Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005; 7: 211-217.
- 21 Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKK β - and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell*. 2010; 17: 89-97.
- 22 Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 886-895.
- 23 Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005; 2: 90-97.
- 24 de Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009; 70: 183-194.
- 25 Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 3437-3444.
- 26 Suman S, Sharma PK, Rai G, et al. Current perspectives of molecular pathways involved in chronic Inflammation-mediated breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015. in press.
- 27 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359-386.
- 28 Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for

- cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9: 351-369.
- 29 Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature.* 2006; 441: 431-436.
- 30 Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 749-759.
- 31 Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol.* 2011; 12: 715-723.
- 32 Sen R. The origins of NF- κ B. *Nat Immunol.* 2011; 12: 686-688.
- 33 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004; 431: 461-466.
- 34 Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004; 118: 285-296.
- 35 Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell.* 2004; 118: 671-674.
- 36 Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011; 12: 695-708.
- 37 Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol.* 2011; 55: 861-867.
- 38 Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72: 4111-4126.
- 39 Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831: 1533-1541.
- 40 Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56: 4625-4629.
- 41 Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 2008; 267: 204-215.
- 42 Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011; 17: 1498-1503.
- 43 Arendt LM, McCready J, Keller PJ, et al. Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. *Cancer Res.* 2013; 73:

- 6080-6093.
- 44 Dirat B, Bochet L, Dabek M, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2011; 71: 2455-2465.
- 45 Kushiro K, Chu RA, Verma A, Núñez NP. Adipocytes promote B16BL6 melanoma cell invasion and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Microenviron.* 2012; 5: 73-82.
- 46 Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013; 73: 5657-5668.
- 47 Harmey JH, Bucana CD, Lu W, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer.* 2002; 101: 415-422.
- 48 Jiang M, Xu X, Bi Y, Xu J, Qin C, Han M. Systemic inflammation promotes lung metastasis via E-selectin upregulation in mouse breast cancer model. *Cancer Biol Ther.* 2014; 15: 789-796.
- 49 DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, et al. CD4⁺ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell.* 2009; 16: 91-102.
- 50 Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, et al. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- κ B and JNK. *J Immunol.* 2005; 175: 1197-1205.
- 51 Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2140-2141.
- 52 Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3: 157-188.
- 53 Perera RM, Bardeesy N. Pancreatic cancer metabolism: Breaking it down to build it back up. *Cancer Discov.* 2015. in press.
- 54 Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 897-909.
- 55 Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2010; 362: 1605-1617.
- 56 Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell.* 2003; 4: 437-450.

- 57 Hingorani SR, Wang L, Multani AS, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. 2005; 7: 469-483.
- 58 Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 2003; 17: 3112-3126.
- 59 Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor- β signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev*. 2006; 20: 3147-3160.
- 60 Lunardi S, Muschel RJ, Brunner TB. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Lett*. 2014; 343: 147-155.
- 61 Farrow B, Albo D, Berger DH. The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2008; 149: 319-328.
- 62 Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 4266-4276.
- 63 Qian LW, Mizumoto K, Maehara N, et al. Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production. *Cancer Lett*. 2003; 190: 105-112.
- 64 Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. 2005; 128: 907-921.
- 65 Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1 β . *Cancer Res*. 2004; 64: 1331-1337.
- 66 Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*. 2004; 28: 38-44.
- 67 Hwang RF, Moore T, Arumugam T, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote

- pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 2008; 68: 918-926.
- 68 Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, et al. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 403: 380-384.
- 69 Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut.* 2013; 62: 112-120.
- 70 Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2012; 21: 418-429.
- 71 Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* 2014; 25: 719-734.
- 72 Gore J, Korc M. Pancreatic cancer stroma: friend or foe? *Cancer Cell.* 2014; 25: 711-712.
- 73 Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2014; 25: 735-747.
- 74 Miyazono K. Transforming growth factor- β signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009; 85: 314-323.
- 75 Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 73-76.
- 76 Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* 2010; 86: 631-637.
- 77 Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med.* 2014; 3: 19.
- 78 Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis.* 2013; 2: e61.
- 79 Bailey JM, Swanson BJ, Hamada T, et al. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5995-6004.
- 80 Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature.* 2012; 491: 399-405.
- 81 Feldmann G, Fendrich V, McGovern K, et al. An orally bioavailable small-molecule

- inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 2725-2735.
- 82 Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008; 321: 1801-1806.
- 83 Carbone C, Melisi D. NF- κ B as a target for pancreatic cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16 Suppl 2: S1-10.
- 84 Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* 2015; 106: 803-811.
- 85 Krupkova O, Loja T, Zambo I, Veselska R. Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma.* 2010; 57: 291-298.
- 86 Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27: 85.
- 87 Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T. Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 42-48.
- 88 Kim HS, Yoo SY, Kim KT, Park JT, Kim HJ, Kim JC. Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012; 5: 754-761.
- 89 Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun.* 2015; 6: 6744.
- 90 Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M, Ishiwata T. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R γ (null) (NOG) mice. *Am J Pathol.* 2014; 184: 674-85.
- 91 Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T, Arai T. Systemic administration of small interfering RNA targeting human Nestin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. *Pancreas.* 2016; 45: 93-100.
- 92 Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009; 6: 412-422.
- 93 Yang XH, Wu QL, Yu XB, et al. Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol.* 2008; 61: 467-473.
- 94 Placencio VR, DeClerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer: Rationale and

- insight for future therapeutic testing. *Cancer Res.* 2015; 75: 2969-2974.
- 95 Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer.* 2000; 82: 1702-1708.
- 96 Fang H, Placencio VR, DeClerck YA. Protumorigenic activity of plasminogen activator inhibitor-1 through an antiapoptotic function. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104: 1470-1484.
- 97 Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.* 2014; 16: 428.
- 98 Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 1648-1658.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご指導およびご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科分子病理学分野の宮園浩平教授、江幡正悟特任講師に厚く御礼を申し上げます。また、網羅的な遺伝子解析に関して、ご指導および助言を賜りました鯉沼代造准教授に感謝申し上げます。また、病理学的解析にご協力いただきました森下保幸さん、実験全般にわたってご助言をいただきました星野佑香梨博士に御礼申し上げます。また、修士課程在籍中より多大なご指導およびご助言を賜りました富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野の早川芳弘准教授、実験にご協力いただきました小倉圭介さんに心より感謝しております。薬学系研究科に所属時よりご指導およびご助言を賜りました現順天堂大学医学部生化学第一講座の入村達郎客員教授にも深く感謝を申し上げます。また、研究を遂行するにあたり指導教員であります東京大学大学院薬学系研究科分子生物学の後藤由季子教授、実験にご協力いただきました永井直さんにも御礼申し上げます。