

博士論文

部位特異的線維芽細胞による特異的な
炎症ニッチの形成機構の解明

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

阿部杏奈

指導教員 落合 淳志

目次

1. 略語	5
2. 要旨.....	9
3. 序論.....	13
(1) がん組織と間質細胞	
(2) がんと炎症反応	
(3) がん組織における線維芽細胞	
(4) 胃の構造	
4. 本研究の目的	17
5. 実験材料および実験方法.....	18
6. 第一章) 線維芽細胞における HMGB1-TLR を介した炎症誘導機構	
I)-1 序論.....	31
I)-2 目的.....	34
I)-3 結果.....	35

I)-3-1. がん細胞株培養上清中の HMGB1 量の違い	
I)-3-2 ヒト由来線維芽細胞における TLR2, TLR4 の発現検討	
I)-3-3 リコンビナント HMGB1 で刺激したヒト線維芽細胞における炎症機構	
I)-3-4 胃癌細胞株培養上清で刺激したヒト由来線維芽細胞における炎症機構	
I)-3-5. 胃癌組織における胃癌細胞 HMGB1 とその周囲を構成する線維芽細胞における NF- κ B 核内移行について	
I)-4 考察.....	40
I)-5 結論.....	43
7. 第二章) 部位特異的線維芽細胞による特異的な炎症ニッチ形成機構の解明	
II)-1 序論.....	44
II)-2 目的.....	46
II)-3 結果.....	47
II)-3-1. 胃癌組織中での炎症環境	
II)-3-2 .胃癌細胞で刺激した部位特異的な線維芽細胞が周囲の細胞に及ぼす影響	
II)-3-3. 胃癌細胞株で刺激した線維芽細胞(SMF / SSF)における遺伝子発現解析	
II)-4 考察.....	58
II)-5 結論.....	69

8. 総括.....	70
9. 図表説明.....	72
10. 参考文献.....	89
11. 謝辞.....	100
12. 図表.....	101

1. 略語

Arg1	Arginase1
α-SMA	alpha-smooth muscle actin
CAF	Cancer associated fibroblast
CCL	CC Chemokine Ligand
cDNA	complementary DNA
CK19	Cytokeratin 19
CSF1	colony stimulating factor 1
CXCL	CXC Chemokine Ligand
CXCR	CXC Chemokine Receptor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FRZB	frizzled-related protein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	Gene Ontology

HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HSP	Heat Shock Protein
IL	Interleukin
IRAK4	Interleukin-1 receptor associated kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LTBP	Latent TGF β binding protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mi RNA	micro RNA
MP	muscularis propria
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NSS	normal swine serum
OS	Overall Survival
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase 1
PDPN	podoplanin
PE	R-Phycoerythrin

PTX1	Pituitary homeobox1
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
rHMGB1	recombinant HMGB1
RIN	RNA Integrity Number
RNA	ribonucleic acid
SDF1	stromal cell derived factor 1
siRNA	small interfering RNA
SM	Submucosal layer
SS	Subserosal layer
STAT	Signal Transduction and Activator of Transcription 3
TGFB	Tissue growth factor beta
TLR	Toll like receptor
TNF-alpha	Tumor necrosis factor-alpha
TNFRSF	Tumor necrosis factor super family receptor
TNFSF	Tumor necrosis factor super family
TRAF	TNF receptor-associated factor
TSPAN	tetraspanin
TSPAN12	tetraspanin12
VEGI	Vascular endothelial cell growth inhibitor

WB Western blotting

2. 要旨

序論

がんが炎症に関与する事は古くから疫学的に知られている。1986年、Dvorakは、がん組織の形成と組織修復過程における類似性を発見し、がんを「治る事が無い傷」と定義した(*Nature*, 2002; 420: 860-867)。例えば、形成された胃癌細胞とがん細胞周囲のマクロファージなどの相互作用は、Interleukin (IL)6、IL8、などの炎症性サイトカインを誘導し、胃癌細胞を活性化する事によりがん細胞の進展に寄与する事が報告された(*Gastric Cancer*, 2011; 14: 266-273)。このようにがんにおける炎症反応は「免疫細胞とがん細胞の相互作用」により惹起されると考えられてきた(*World J Gastroenterol* 2014; 20(16):4586-96)。

がん組織は、がん細胞およびその周囲の間質細胞(血管、線維芽細胞、免疫細胞)から構成される。がん間質細胞中で占める割合が最も高い線維芽細胞は、不均一な集団を構成し、集団によってがん細胞に対する応答性が異なる。がん組織を構成する Cancer associated fibroblast (CAF)の一部の集団は、がん細胞の進展を促進し、またある集団はがん細胞の進展を抑制する事が報告されている(*JExpMed*, 2014; 211(8):1503-23)。胃癌組織中のCAFに発現する Tumor endothelial marker (TEM)1は、胃癌のリンパ節転移などの臨床病理学的因子と相関し、予後の悪化をもたらす事を我々は報告した(*Cancer medicine*. 2015)。所属する研究室では大腸がん細胞株で刺激した大腸線維芽細胞が、その解剖学的部位により異なる遺伝子発現をし、生物学的機能も異なることも明らかにした(*Plos One*, 2014; 9: e88018)。これまでの研究においても線維芽細胞が免疫細胞遊走因子を遺伝子発現し、免疫細胞を炎症部位に誘導する可能性を提示した(*Pathol Int*. 2014; 64(6):267-75)。

上記の報告から胃癌組織中における炎症反応は胃癌細胞が存在する解剖学的な層により異なり、その層ごとに特異的な炎症環境が形成される可能性がある。またその「がん組織における炎症反応」の調節にも線維芽細胞が重要な役割を果たすと考えた。本研究では、胃癌組織中における胃癌細胞が存在する解剖学的な層ごとに胃癌細胞周囲を構成する炎症環境を明らかにし、同時に解剖学的な層に存在する構成する線維芽細胞が、炎症環境に及ぼす影響を明らかにする。

本論

1. 胃癌組織中での炎症環境

胃は表層から深層に向かって、粘膜、粘膜下層、固有筋層、漿膜下層、漿膜へと分類でき、胃癌は粘膜で形成され、浸潤する。そこで、胃癌細胞が存在する解剖学的な層ごとで炎症環境を検討した。20症例の胃癌患者の免疫組織化学的染色を行った。胃癌組織は胃癌細胞が存在する解剖学的な層の違いにより、浅層から順に Submucosal layer(SM層)、Muscular layer (MP層)、SubSerosal layer (SS層)と三層に分けて各層で検討を行った。

非がん部とがん部と比較すると、全ての層においてリンパ球、マクロファージ、好中球の個数が、がん部で有意に多くなることが分かった。つまり がん部では免疫細胞の浸潤により炎症反応が惹起される事が明らかとなった。

次に胃癌細胞の深達度によって各層における免疫細胞の個数および活性化線維芽細胞の面積を比較検討した。SM層では各種リンパ球(キラーT細胞、ヘルパーT細胞、B細胞)および好中球の個数がSS層と比較して有意に多かった。一方、SS層ではマクロファージの個数および活性化線維芽細胞の面積がSM層と比較して有意に大きかった。マクロファージはM1マクロファージとM2マクロファージの2種類が存在する(*Cell*, 201; 140: 883-899)。本研究においては、胃癌細胞の深達度に伴ってM2マクロファージの個数がどのように変化するか考察した。その結果、M2マクロファージの個数がSM層と比較してSS層で有意に多かった。

上記の結果よりSM層とSS層の間で免疫細胞の分布が異なっている事が明らかとなった。つまり胃癌細胞周囲の炎症環境は、胃癌細胞が存在する解剖学的な層によって異なり、胃癌細胞とその周囲の免疫細胞や線維芽細胞の相互作用によって部位特異的な炎症環境が構成される可能性が示唆された(図1)。

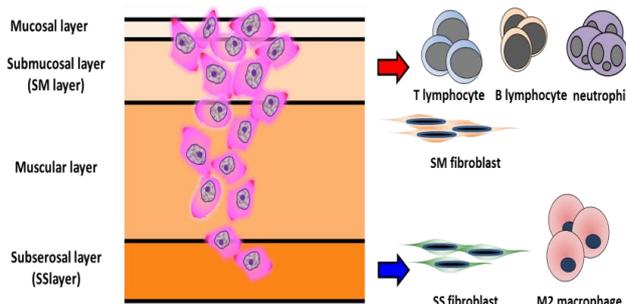


図1. 病理学的検討における各層の免疫細胞分布の違い

2. 胃癌細胞で刺激した部位特異的な線維芽細胞が周囲の免疫細胞およびがん細胞に及ぼす影響

これまでの検討および免疫組織化学検討より、SS層を構成する線維芽細胞がM2マクロファージの分化に、SM層を構成する線維芽細胞はリンパ球の遊走に寄与する事を明らかにした。胃癌患者の非がん部のSM層より採取された線維芽細胞をSMF、SS層より採取された線維芽細胞をSSFとして本実験に使用した。

初めに、胃癌細胞株であるHSC44PEで刺激したSMFとSSFの両線維芽細胞が免疫細胞に与える影響を検討した。

HSC44PE-SMF培養上清と比べてHSC44PE-SSF培養上清では

M2マクロファージで発現が上昇するArginase、IL10の発現量が共に有意に高く、発現が抑制されるIL12A、IL12Bの発現量は共に有意に低かった。またHSC44PEで刺激したSMFsとSSFs上清をリンパ球細胞株であるJurkat細胞に添加し、遊走能について検討を行った。この結果、HSC44PE-SSF培養上清と比較してHSC44PE-SMF培養上清においてJurkat細胞の遊走が認められた。胃癌細胞の刺激によりSMFはリンパ球の遊走に、一方SSFはM2マクロファージの分化に関与する(図2)。つまり胃癌組織中において、胃癌細胞周囲の線維芽細胞が部位特異的に免疫細胞の分化や遊走に影響を与える可能性が示唆された。また胃癌細胞株であるHSC44PEで刺激したSMFおよびSSFの両線維芽細胞が胃癌細胞に与える影響を検討した。HSC44PEで刺激したSMFとSSFの培養上清をそれぞれ胃癌細胞株に添加し、増殖能を検討した。HSC44PEで刺激したSMF培養上清ではSSF培養上清と比較してがん細胞の増殖能が高かった。

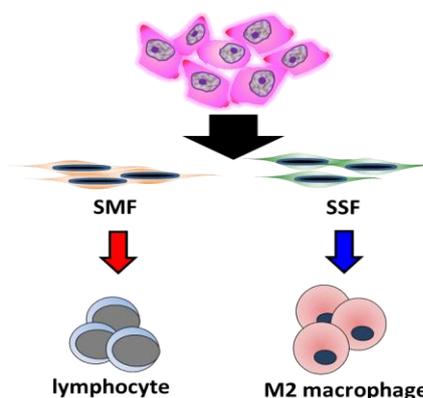


図2. 胃癌細胞株で刺激したSMFおよびSSFにおける免疫細胞の動態

3. 胃がん細胞株で刺激した線維芽細胞(SMF / SSF)における遺伝子発現

これまでの報告よりがん組織中で最も占める割合が高い間質細胞は線維芽細胞である。(Best Pract Clin Rheumatol, 2014; 28: 565-576) 胃線維芽細胞においてもその部位依存的に遺伝子発現の違いが生じ、その違いが炎症反応の違いをもたらすかについて検討を行った。胃がん細胞株であるHSC44PE で SMF と SSF を刺激し、遺伝子発現解析を行った。

Term	遺伝子数	p-value
cytokine activity	195	9.58258E-21
chemokine activity	46	9.62574E-13
chemokine receptor activity	49	2.20107E-12
growth factor activity	161	5.36769E-08
copper ion binding	69	4.94874E-06

図 3.線維芽細胞における遺伝子発現

I)胃がん細胞株刺激による線維芽細胞での遺伝子発現解析

HSC44PE で刺激した線維芽細胞と DMEM で刺激した線維芽細胞を比較し、HSC44PE で刺激した線維芽細胞において p 値 <0.05 、かつ 2 倍以上の発現上昇が認められる遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子において DAVID 解析により、GO term 解析を施行した。その結果、線維芽細胞において胃がん細胞株の刺激によって上昇する遺伝子は、サイトカイン活性化シグナル($p<0.01$)、ケモカイン活性化シグナル($p<0.01$)およびケモカイン受容体結合シグナル($p<0.01$)などの炎症に関連する遺伝子群であった。つまり 胃線維芽細胞は他の免疫細胞と同様に各種サイトカインやケモカインの遺伝子発現を誘導し、炎症に参与する可能性が示唆された(図 3)。

II)胃がん細胞株 HSC44PE 刺激による SMF と SSF 間の炎症関連発現遺伝子解析

HSC44PE で刺激した SMF 及び SSF における炎症関連する遺伝子発現を検討した。GO term 中における Immue response に関する遺伝子の発現について検討を行った。その結果、①HSC44PE 刺激 SMF 群のみで発現抑制される遺伝子、②HSC44PE 刺激 SMF および SSF 群の両群で発現抑制される遺伝子、③HSC44PE 刺激 SSF 群のみで発現上昇する遺伝子、④HSC44PE 刺激 SMF 群のみで発現上昇する遺伝子、⑤HSC44PE 刺激 SMF 群および SSF 群で発現上昇する遺伝子の五つの群に分かれた。コントロール群(DMEM 刺激群)では SMF と SSF では炎症関連遺伝子の発現が類似性を示した。しかし HSC44PE によって同じ刺激を与えると、SMF および SSF の間において炎症に関連する遺伝子の発現パターンが異なった。

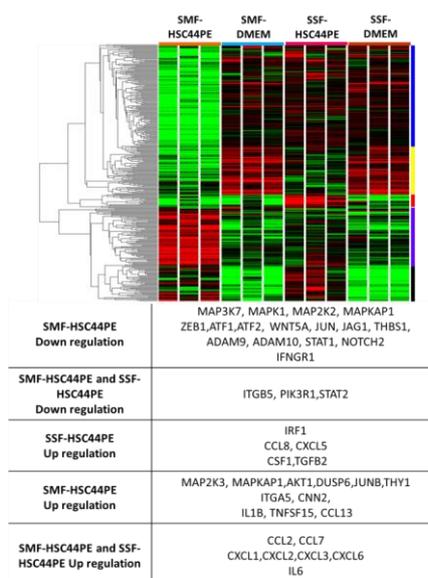


図 4.線維芽細胞における炎症遺伝子発現

胃がん細胞の刺激により SMF と SSF は異なる炎症応答をする事が明らかとなった。HSC44PE 同一の刺激を与えても、線維芽細胞は部位特異的に炎症関連遺伝子を発現する事が分かった(図 4)。

III) 胃がん細胞株 HSC44PE 刺激による SMF と SSF におけるサイトカイン、ケモカイン発現解析
 病理学検討及び生物学的検討より、がん細胞で刺激した SMF と SSF によって分化、遊走される免疫細胞は異なっていた。そこで II)の結果よりがん細胞の刺激によって SMF および SSF で特異的に誘導される内分泌性因子について同定を行った。その結果、HSC44PE で刺激した SMF では IL1B、 Tumor necrosis super family (TNFSF)15、 Chemokine ligand C-C (CCL)13 が、HSC44PE で刺激した SSF では Colony stimulating factor (CSF)1、 Tissue growth factor-beta (TGFβ)2、 CCL8、 Chemokine ligand C-X-C

(CXCL) 5 が特異的に発現上昇する事が明らかとなった。がん細胞の刺激によって SMF で上昇した因子の中で IL1B, TNFSF15 リンパ球の遊走に、SSF で上昇した因子の中で CSF1, TGF B 2 は M2 マクロファージの分化に寄与する事が報告されている。つまりがん細胞と相互作用した部位特異的線維芽細胞は、特異的な炎症環境の形成を調節する可能性が示唆された(図 5)。

IV) DMEM で刺激した SMF と SSF における受容体発現

HSC44PE-SMF と HSC44PE-SSF では、異なる炎症関連遺伝子遺伝子の発現パターンを示した。これらの事より DMEM-SMF と DMEM-SSF では細胞膜に発現する受容体に関与する遺伝子群の発現が異なると考えた。そこで GO term の receptor activity 28 プローブについて DMEM-SMF 群と DMEM-SSF 群でクラスタリング解析を行った。

その結果、receptor activity 28 プローブに関して、DMEM-SMF 群において有意に発現上昇が認められる 12 プローブと、DMEM-SSF 群において有意に発現上昇が認められる 16 プローブが同定できた。DMEM-SMF 群で発現が高い遺伝子は 11 遺伝子あり、*TNFRSF1B*、*CXCR7*、*TNFRSF9*、*CCR10* のサイトカイン、ケモカイン受容体が認められた。DMEM-SSF 群で発現が高い遺伝子は 14 遺伝子であり、炎症に寄与する *TLR4*、*TSPAN12* などの発現が認められた。受容体関連遺伝子の発現は線維芽細胞の解剖学的な部位に依存して異なり、この違いにより部位特異的な炎症環境が形成される可能性が示唆された。(図 6)

結論

胃がん組織では、胃がん細胞が存在する解剖学的な層の違いによりそれぞれの層において特異的な炎症環境が形成されていた。またその部位特異的な炎症環境の形成に、がん細胞によって活性化された部位特異的な線維芽細胞が関与する事も示唆された。

発表論文

High Mobility Group Box-1 (HMGB1) released from cancer cells induces the expression of pro-inflammatory cytokines in peritoneal fibroblasts. (*Pathology International.*, 2014 Jun;64(6):267-75)

Anna Abe, Takeshi Kuwata, Chisako Yamauchi, Youichi Higuchi, Atsushi Ochiai

TEM1 expression in cancer-associated fibroblasts is correlated with a poor prognosis in patients with gastric cancer. (*Cancer medicine.* 2015 Sep 4. doi: 10.1002/cam4.515.)

Satoshi Fujii, Ayano Fujihara, Kei Natori, Anna Abe, Yasutoshi Kuboki, Youichi Higuchi, Masaki Aizawa, Takeshi Kuwata, Takahiro Kinoshita, Wataru Yasui, Atsushi Ochiai

Site-specific fibroblasts regulate site-specific inflammatory niche formation in gastric cancer. (*Gastric Cancer, In Press*)

Anna Abe, Akiko Kawano Nagatsuma, Youichi Higuchi, Yuka Nakamura, Kazuyoshi Yanagihara, Atsushi Ochiai

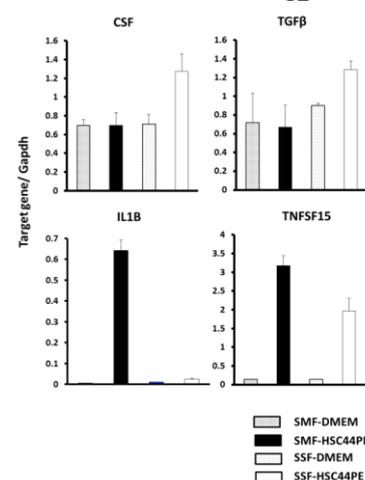


図 5.線維芽細胞におけるケモカイン、サイトカイン発現

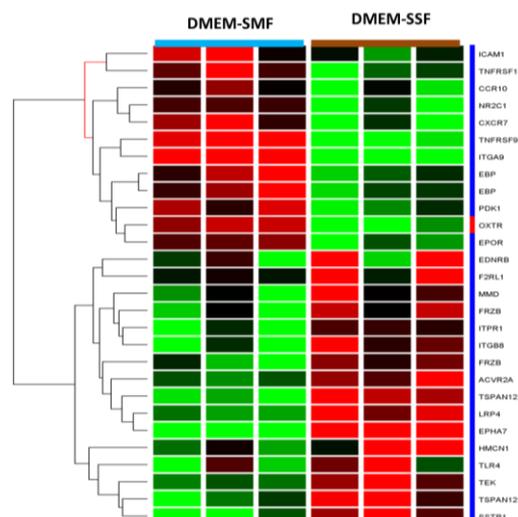


図 6.線維芽細胞における受容体関連遺伝子発現

3. 序論

(1)がん組織と間質細胞

がん組織は、がん細胞とその周囲を構成する間質細胞から構成される(図 1)。間質細胞には、細胞外基質(コラーゲンなど)の産生により細胞の構造を支持する線維芽細胞、体内に侵入した細菌やウイルスなどを排除する免疫細胞、血管構築する血管内皮細胞などが挙げられる^{1,2}。がん組織中において、がん細胞とその周囲を構成する間質細胞は相互に作用する。その例として、がん細胞は、免疫細胞である M2 マクロファージの分化に寄与し、線維芽細胞に対してはコラーゲンなどの基質の産生を促進する^{3,4}。その結果、がん組織において、がん細胞の増殖や浸潤がもたらされる^{5,6}。上記で示すようにがん組織中において、がん細胞とその周囲を構成する間質細胞は相互に反応し、がん微小環境を構築する。

(2)がんと炎症反応

がん組織中では、がん細胞とその周囲の間質細胞との相互作用によって「炎症反応」が誘導される。1986 年、Dvorak は、がん組織の形成と組織修復過程における類似性から、がんについて「Tumors: wounds that do not heal, がんとは治る事が無い傷」と提唱し⁷、がんを慢性炎症として捉えた。

「炎症反応」とは、組織障害が起こった際に免疫細胞が有害な異物を排除する初期炎症反応応答から、線維芽細胞による血管新生、表皮の修復の後期炎症応答までの過程

を意味する。炎症反応の過程に関与する種々の細胞は、免疫細胞を炎症反応部位へと遊走、分化させるためにケモカインやサイトカインを分泌する。また免疫細胞を炎症反応の場に留めるために接着分子なども分泌する⁸。しかし、がん組織中ではこれらの過程が破綻し、免疫細胞や線維芽細胞の異常な増殖や浸潤、上記の分泌因子や接着因子が過剰に生成される状況が無限に続いている。同時に、炎症反応を抑制する抗炎症性サイトカインやケモカインと炎症反応を促進する炎症性サイトカインやケモカインのバランスが崩壊している⁸。特に免疫細胞や線維芽細胞そしてがん細胞から分泌される炎症性サイトカインやケモカインは、がん細胞の増殖や進展を促進する事が報告されている⁹。例えば、胃がんでは、胃がん細胞とがん細胞周囲を構成するマクロファージやリンパ球などの免疫細胞の相互作用によって、Interleukin (IL)6、IL8、Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)などの各種炎症性サイトカインが誘導される。その結果、胃がん細胞の Signal Transduction and Activator of Transcription (STAT)3 が活性化される事により胃がん細胞の進展に寄与する事が明らかとなった^{10,11}。このようにがんにおける炎症反応は「がん細胞」とその周囲を構成するがん間質細胞、特に「免疫細胞」との相互作用により惹起されると考えられてきた

(3)がん組織における線維芽細胞

線維芽細胞は、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを産生する事で、物理的な外力に耐え、細胞の構造維持に寄与する。がん組織中においては、線維芽細胞はがん細胞の

増殖や浸潤、転移に寄与する。組織損傷が起こると、線維芽細胞は特に炎症後期過程で、種々の増殖因子やサイトカイン、ケモカインを産生する事が報告されている¹²。線維芽細胞は、不均一な集団を構成し、集団によってがん細胞に対する応答性が異なる。がん組織を構成する **Cancer associated fibroblast (CAF)**のある集団は、がん細胞の進展を促進し、またある集団はがん細胞の進展を抑制する事が報告されている²。所属する研究室前任者たちにより、これまでにヒト線維芽細胞に発現しているポドプラニン(PDPN)が腫瘍生着に促進的に働くこと、またその作用機序として PDPN の細胞内ドメインが **RhoA** を活性化し、線維芽細胞の運動能を高めることをマウス移植実験系により明らかにしてきた^{13,14}。このように線維芽細胞の研究はこれまで、がん細胞の進展や浸潤に焦点を当てた報告が多数を占める。

(4)胃がん

胃は、胃の表層部から深層部に向けて粘膜、粘膜下層、固有筋層、漿膜下層、漿膜へと構造を構築する(図 2A)。粘膜はひだ状の構造を有し、胃腺と呼ばれる分泌腺が開口しており、そこから塩酸や消化酵素を分泌する事で、食物の消化、殺菌そして腐敗の防御を行う。

胃がんは粘膜で発生し、粘膜下層、固有筋層、漿膜下層と胃の内側から外側へと浸潤する(図 2B)。胃がんはその浸潤度合 (どれくらいの深さまで胃がん細胞が存在するか)によってステージが分類される。胃の粘膜下層までに留まるがんは「早期がん」と呼

ばれ、5年生存率は約90%である。その一方で胃の固有筋層を超えたがんは「進行がん」と呼ばれ、5年生存率は約40%までに下がる(1*)。このように固有筋層を超えて漿膜下層以下へと胃がん細胞が浸潤すると、著しい生存率の低下が認められる。国立がん研究センター東病院において、粘膜下層まで浸潤した胃がん226検体、漿膜下層まで浸潤した胃がん73検体についてそれぞれで全生存期間 (Overall survival, OS) を比較すると、漿膜下層まで浸潤したがんにおいては著しい予後の悪化が認められた(図3)¹⁵。予後の悪化については、これまで胃がん細胞における種々の遺伝子異常(がん原遺伝子; c-met の増幅、がん抑制遺伝子; p53 の不活性化、転移関連遺伝子; E-cadherin、B-catenin の変異)と関連付けられていた^{16,17}。つまり胃がん細胞自身におけるこれら遺伝子異常の蓄積によって、がん細胞の増殖や浸潤が規定されると考えられている(図4)。

4. 本研究の目的

胃癌組織中を構成する線維芽細胞が炎症反応に関与する事を明らかにする。胃癌組織中における炎症反応は胃癌細胞が存在する解剖学的な層により異なり、その解剖学的な層ごとに特異的な炎症環境が形成される可能性を示唆する。またその「がん組織における炎症反応」の調節にも線維芽細胞が重要な役割を果たすと考えた。本研究では、胃癌組織中において、胃癌細胞が存在する解剖学的な層ごとに胃癌細胞周囲を構成する炎症環境を明らかにし、同時に解剖学的な層を構成する線維芽細胞が、炎症環境に及ぼす影響を明らかにする。

5. 実験材料及び実験方法

1) 細胞培養

使用した細胞株を表 1 に示す。HSC44PE 細胞、HSC60 細胞¹⁸ (ヒトスキルス胃癌細胞株)は、RPMI 1640 medium (SIGMA)、 MKN7 細胞 (ヒト高分化管状腺胃癌細胞株)、Caco2、DLD1 細胞 (ヒト結腸由来癌細胞株) は、いずれも 10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS) (SIGMA) 、1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (SIGMA) を添加した DMEM medium (SIGMA) 培地で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

ヒト漿膜由来線維芽細胞 (SSF)およびヒト粘膜下層由来線維芽細胞 (SMF)は、胃がん患者の非がん部から採取され、本研究室において樹立したものをを使用した。ヒト由来線維芽細胞は、10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS) (SIGMA) 、1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (SIGMA) を添加した α MEM medium (SIGMA)培地で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

2) がん細胞株及びヒト漿膜下層由来線維芽細胞培養上清(SSF)の回収

0 日目に FBS 入りの DMEM を用いて HSC44PE 細胞、HSC60 細胞、MKN7 細胞、Caco2 細胞、DLD1 細胞を 5.0×10^6 個/10 cm dish、ヒト漿膜下層由来線維芽細胞(SSF)を 5.0×10^5 個/10 cm dish で播種し、2 日目に FBS 無しの DMEM と交換した。3 日目に、ステリフィリップフィルターユニット (Milipore) を用いてがん細胞株及びヒト漿膜下層由来初代培養線維芽細胞の培養上清を回収した。この回収した培養上清は、1 mL

ずつ 1.5 mL チューブに分注し、使用まで-80°Cで凍結保存した。

3) がん細胞培養上清及び rHMGB1 で刺激したヒト漿膜下層由来線維芽細胞(SSF)の作製

0 日目に FBS 入りの DMEM を用いて、SSF を 2.0×10^5 個/6 cm dish に播種した。2 日目にがん細胞株の培養上清もしくは 5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の recombinant High Mobility Group Box 1 (rHMGB1) (Chondrox 社)を SSF に添加した。コントロール群は無血清の DMEM を添加した SSF とした。定量的 RT-PCR で定量する際は、がん細胞株の培養上清もしくは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rHMGB1 を添加後 24 時間で SSF の全 RNA を回収した。ウェスタンブロット法を用いる際は、がん細胞の培養上清もしくは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rHMGB1 刺激後 0、5、15、30、45、120 分で SSF を回収した。

4) フローサイトメトリー

ヒト漿膜下層由来線維芽細胞(SSF)については、 1.0×10^6 個の細胞を 100 μL の PBS に懸濁して、TLR2 は Mouse anti-human CD282 (TLR2)-FITC 抗体 (eBioscience)、TLR4 は Mouse anti-Human CD284 (TLR4)-PE 抗体 により Fluorescence-activated cell sorter (FACS) Calibur (BD Biosciences) を用いて TLR2 及び TLR4 発現を検出した。ネガティブコントロールとして、Mouse Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated IgG2a 抗体及び Mouse R-Phycoerythrin PE-conjugated IgG2a 抗体(eBioscience) を使用した。

5) si-HMGB1 による HMGB1 発現抑制

胃癌細胞株である HSC44PE 細胞を遺伝子導入する前日に 6 well plate(BD) に 5.0×10^5 個/well ずつ播種した。翌日、5 nM control small interfering RNA (siRNA)(Ambion) もしくは HMGB1 si-RNA(Ambion)と Opti-Mem (Invitrogen) 250 μ L を各々混合し、同時に Lipofectamine (Invitrogen) 7 μ L と Opti-Mem without serum 250 μ L も混合して 5 分間室温で放置した。その後、両者を混合し、室温で 20 分間放置した後、2 mL の FBS 入り DMEM を加え、500 μ L ずつを HSC44PE がん細胞培地に添加した。添加 12 時間後に培地を取り除き、PBS で洗浄した。24 時間後に培養上清を回収する群に関しては、FBS 無しの DMEM を添加した。48 時間後及び 72 時間後に培養上清を回収する群に関しては、FBS 入りの DMEM を添加した。48 時間後の培養上清は遺伝子導入後 24 時間で、72 時間に関しては 48 時間後にそれぞれ FBS 無しの DMEM と培地交換した。そして、この時に回収した培養上清を Western Blotting 法(WB 法)に、細胞に関しては定量的 RT-PCR 法にかけることで培養上清中の HMGB1 が最も少なくなる培養条件を検討した。培養上清に関しては-80°Cで凍結保存した。si-control 及び si-HMGB1 の配列に関しては表 2 に載せる。

6) 免疫染色

(i) 腫瘍組織の免疫組織化学染色

胃癌患者 20 症例を対象にして免疫組織化学染色を行った。症例は、化学療法及び放射線療法が施行されていない中分化腺がんおよび低分化腺がんを選定した。本研究で選出した胃癌組織は、漿膜下層まで胃癌細胞の浸潤が認められる症例を採用した。組織切片はキシレンとエタノールを用いて脱パラフィン化した。その後、抗原を賦活化するために、抗原賦活化溶液(pH 6.0 クエン酸バッファーもしくは pH 9.0 EDTA バッファー)に浸し、95°Cで 20 分間 H2850 Microwave Processor (EBSciences)を用いてマイクロウェーブ処理を行った。0.3% (v/v)過酸化水素を含有したメタノールに 30 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。その後、非特異的結合ブロックのために 20 分間 2%(v/v) ブタ血清入り PBS 溶液に浸した。使用した一次抗体はそれぞれ希釈し添加した後、4°Cで一晩反応させた。その後、Envision+ system (Dako) 及びジアミノベンジジンを用いて茶色く発色させた。ヘマトキシリンを用いて対比染色した後、封入した。明視野観察は、Nano Zoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics)を用いて対物レンズ 20 倍及び 40 倍を用いて検鏡をした。使用した抗体、賦活化溶液、希釈濃度については表 3 に示す。この研究プロトコールは、国立がん研究センター東病院の倫理審査に受理され、その後研究を行っている(研究課題番号; 2013-198)。

(ii) 線維芽細胞の蛍光免疫染色

線維芽細胞を 0 日目に BD ファルコンカルチャースライド 8well (BD)に線維芽細胞を 1.0×10^4 個/well ずつ播種した。2 日目に rHMGB1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を各ウェルに添加し、0、

30、60、120、180、240、300、360 分後にそれぞれの培地を回収した後、PBS で洗浄し、中性ホルマリンで固定した。非特異的結合ブロック及び抗体の膜透過性を高めるために 0.1% (v/v) TritonX-100-2% (v/v) NSS/PBS に 20 分間浸した。その後の操作は、(ii) と同じ過程で行った。コントロールとして一次抗体のみ、二次抗体のみを添加した群、抗体を添加していない群、rabbit anti-human NF- κ B 抗体 (Cell Signaling) と goat anti-mouse Alexar Flour 488 抗体 (Invitrogen) を添加した群、mouse anti-human alpha-SMA 抗体(DAKO)と goat anti-rabbit Alexar Flour 546 抗体を添加した群を作製した。蛍光顕微鏡 Biorevo BZ-9000 (Keyence)を用いて 20 倍で検鏡した。

(iii) 免疫染色した細胞の計数法

HMGB1 陽性胃がん細胞、NF- κ B 核内移行線維芽細胞数カウント方法

HMGB1 陽性細胞胃がん細胞数カウントは固有筋層を境として漿膜側(深層部)、粘膜側(浅層部)で計測した。次にそれぞれの部位で無作為に 10 視野を選び出し、1000 個のがん細胞を 1 視野当たり計測した。そこからがん細胞における HMGB1 の局在を 1) 核のみ、2)細胞質と核、3)細胞質のみにわけて HMGB1 陽性率を算出した。また、2) と 3)の細胞を細胞質陽性とすることで、各区画における HMGB1 細胞陽性率を算出した。同時に 1 視野ごとに全線維芽細胞数を算出し、線維芽細胞の NF- κ B 核内移行率を算出した。

(iv)免疫細胞個数、胃癌細胞個数、 α -SMA 陽性線維芽細胞面積および Cytokeratin 19**(CK19)陽性胃癌細胞面積算出方法**

胃癌組織を浅層から深層に向かって解剖学的な分類に従い、漿膜下層 (SM) 、固有筋層(MP)、漿膜下層(SS)の三層に分類し、各層から無作為に対物レンズ倍率 40 倍で 5 ヶ所ずつ抽出した。その後、各層ごとに各種免疫細胞浸潤数のカウント、および α -SMA 陽性線維芽細胞面積、CK19 陽性胃癌細胞面積を求めた。各種免疫細胞浸潤数は、キラーT 細胞(CD8 陽性細胞)、ヘルパーT 細胞(CD4 陽性細胞)、B 細胞(CD20 陽性細胞)、ナチュラルキラーT 細胞(CD56 陽性細胞)、好中球(CD15 陽性細胞)、マクロファージ(CD68 陽性細胞)そして M2 マクロファージ細胞(CD204 陽性細胞)の浸潤数および α -SMA 陽性線維芽細胞面積をがん部および非がん部において求めた。CK19 陽性胃癌細胞面積は胃癌部においてのみ計測を行った。 α -SMA 陽性線維芽細胞面積割合および CK19 陽性胃癌細胞割合については、全細胞面積に対する各細胞の陽性面積を比率により求めた。 α -SMA 陽性線維芽細胞面積および CK19 陽性胃癌細胞面積は、Axio Vision Rel4.7 (ZEISS)を用いて測定し、計測値は各視野で行った。非がん部とは、がん部において胃癌細胞が認められた最も先縁の部分から 5 cm 以上離れた組織切片を表す。

胃癌細胞における Ki-67 核内陽性細胞割合は、ヘマトキシリン/エオジン染色の切片像から胃癌細胞を 1000 個カウントした。そして同切片像から Ki-67 が核内に陽性となる胃癌細胞数をカウントし、1000 個の胃癌細胞に対する Ki-67 陽性胃癌細胞

胞個数割合を算出した¹⁹。

7) 定量的 RT-PCR 法

rHMGB1 を添加した線維芽細胞(SSF)、およびがん細胞株培養上清を添加した線維芽細胞(SMF、SSF)、THP1 細胞株およびがん細胞については、3 mL の PBS で2度洗浄した後、TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて total Ribonucleic acid (RNA) を抽出した。その後、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、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて Complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA) を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) を用いて、Light Cycler 480 II (Roche) により定量的 RT-PCR を行った。標的遺伝子の Messenger RNA (mRNA) の発現は、human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH) で標準化した。

定量的 RT-PCR 法で使用したプライマーは全て Takara より購入し、使用したプライマーは表 4 に示す。

8) ウェスタンブロット法

がん細胞株及び線維芽細胞 (SSF) で行う際は Lysis Buffer に Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics)及び NaVO₄ (Wako)を添加し、細胞を溶解した。Bradford 法を用いて、タンパク濃度を定量し、タンパク量を 10 µg に揃えた。がん細

胞培養上清を用いる際は、前述した-80°Cに凍結した培養液を融解し、それぞれ 21 μ L ずつを電気泳動に用いた。それを Sample Buffer [2M Tris-HCl (pH 6.8)、30% sodium dodecyl sulfate (SDS)、Glycerol, 1% Bromophenol Blue]及び 2-メルカプトエタノールと遠心機を用いて混合し、100°Cで 5 分間加熱した。その後、10%ゲルもしくは 4-20%ゲル(Bio-Rad)にサンプルを供し、100V で 2 時間電気泳動した。電気泳動後、PVDFメンブレン (Milipore)に転写し、Blocking Buffer でブロッキングを行った。一次抗体を用いて、4°Cで一晩インキュベーションした。今回使用した一次抗体については mouse anti-human TLR2 抗体(Abcam)、mouse anti-human TLR4 抗体(Abcam)、rabbit anti-human HMGB1 抗体(Abcam)、rabbit anti-human phospho-Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK4) (Thr345/Ser346) 抗体(Cell Signaling)、rabbit anti-human IRAK4 抗体(Cell Signaling)を使用した。翌日、TBS-T[137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1%(v/v)Tween20]で洗浄したのち、二次抗体 Amersham ECL Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase Linked Species-Specific Whole Antibody 及び Amersham ECL Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Linked Species-Specific Whole Antibody (GE Healthcare)を添加し、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 Health care)を用いた。

9) マイクロアレイ

ヒト 38500 個の既知遺伝子を含む 47000 個の転写産物について比較検討をするた

めに、54675 プローブセットから構成される GeneChip Human Genome U133 Plus 2 arrays (Affymetrix)を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。相補的 RNA (cRNA)は 100 ng の全 RNA から 3' IVT Express Kit (Affymetrix)を用いて増幅した。cRNA のハイブリダイゼーションから蛍光ラベル付加までの一連の作業は、Affymetrix 社のプロトコールに従った。cDNA チップのスキャン画像は、Gene ChipScanner 3000 (Affymetrix)を用いて行った。全 RNA の品質確認を RNA 6000 Nano Assay kit (Agilent Technology)を用いて行い、RNA integrity numbers (RIN)値が 9.0 より大きい事を確認した。

(i) マイクロアレイデータ統計解析

マイクロアレイデータの統計解析を Genen Spring GX12.6 (Agilent Technologies)によって行った。チップ間誤差を補正するために、遺伝子発現データの正規化処理を microarray suite5 (MACS5)アルゴリズムによって行った。数値解析のために、正規化処理後の遺伝子発現データ(Raw intensity value)は log2 値に変換し、対数化する事で標準化を行った(Normalized intensity value)。クラスタリング解析処理は、Normalized intensity value を用い、数値解析や遺伝子の抽出は Raw intensity value によって行った。中央値を中心としたデータに正規化した。

(ii) 教師有り階層クラスタ解析(SV クラスタリング)

教師有りクラスタリングを作製するための遺伝子発現が違うプローブセットの中で P

値が 0.05 未満、サンプル間の発現倍率(fold change)が 2 倍よりも大きくなるプローブセットを抽出した。P 値の算出には、Unpaired t-test または ANOVA を用い、P 値の補正は Benjamini and Hochberg による次元配置分散分析で算出した。抽出したプローブセットを用いて SV 階層バイクラスタリングを行い、各サンプルにおけるプローブセットの発現を比較検討した。

(iii) マイクロアレイによる機能解析

標的とした遺伝子の機能を公式ツールである David v6.7 を用いて GO term 解析および Pathway 解析を行った。胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞(SMF と SSF 区別無し)と DMEM で刺激した線維芽細胞(SMF と SSF 区別無し)における遺伝子発現の違いを比較するために、DMEM で刺激した線維芽細胞と比較して、胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞において P 値が 0.05 未満、Fold Change が 2 倍より大きくなる遺伝子群を抽出した。その抽出した遺伝子について Gene Ontology (GO)解析および Pathway 解析を行った。有意差の指標としては P 値が 0.01 未満となる Go term を抽出した。

10) HSC44PE および DMEM で刺激した粘膜下層由来線維芽細胞(SMF)および漿膜下層由来線維芽細胞(SSF)培養上清の回収

0 日目に 10% FBS 入りの DMEM を用いて SMF および SSF を 5.0×10^5 個/10 cm dish ず

つ播種した。2日目に 無血清の DMEM および HSC44PE の培養上清を SMF および SSF の両線維芽細胞に添加し、3日目に FBS を含まない DMEM と交換した。そして4日目にそれぞれの培養上清をステリフィリップフィルターユニット(Milipore)を用いて回収した。HSC44PE で刺激した粘膜下層由来線維芽細胞培養上清は HSC44PE-SMF 培養上清、および HSC44PE で刺激した漿膜下層由来線維芽細胞培養上清は HSC44PE-SSF 培養上清とした。同様に DMEM で刺激した粘膜下層由来線維芽細胞培養上清は DMEM-SMF 培養上清および、DMEM で刺激した漿膜下層由来線維芽細胞培養上清は DMEM-SSF 培養上清とした。その後 1 mL ずつ 1.5 mL チューブに分注し、 -80°C で凍結保存した。

11) 遊走能の検討

リンパ球の遊走能を検討するためにポアサイズ $5\ \mu\text{m}$ の Transwell cell culture chamber (Corning)を用いた。リンパ球細胞株である Jurkat 細胞は、実験に使用する1日前に 1.0×10^6 細胞/10-cm dish で、10% FBS を含む DMEM 培地上に播種した。1日後に血清中に含まれる因子の影響を除去するために、無血清の DMEM 培地をと交換した。Transwell cell culture chamber の Transwell 下層に HSC44PE-SMF 培養上清、HSC44PE-SSF 培養上清、DMEM-SMF 培養上清、DMEM-SSF 培養上清そして 10% 血清入りの DMEM 培地を添加した。 1.0×10^7 個/mL の Jurkat 細胞を 無血清の DMEM に懸濁して、Transwell 上層 の中央に添加し、 37°C で 4 時間培養を行った。 37°C で 4

時間培養した後、Transwell を通り抜けた細胞数(Transwell 上層から下層に移動した Jurkat 細胞数)を血球計算板によりカウントした。Jurkat 細胞の遊走率を検討するために DMEM 培地添加群に対する HSC44PE-SMF 培養上清添加群、HSC44PE-SSF 培養上清添加群、DMEM-SMF 培養上清添加群、DMEM-SSF 培養上清の添加群の比率を算出した。本研究では 10% DMEM 培地添加群を陽性コントロール群とした。

12) 細胞生存アッセイ

HSC44PE 細胞は、実験に使用する 2 日前に 5.0×10^6 細胞/10 cm dish で、10% FBS を含む DMEM 培地上に播種した。 4.0×10^3 個/well HSC44PE 細胞を 96-well 平底プレートに播種し、HSC44PE-SMF 培養上清、HSC44PE-SSF 培養上清、DMEM-SMF 培養上清、DMEM-SSF 培養上清で培養し、3 日間検討を行った。WST-8 cell counting kit (Dojinbo)を添加し、4 時間 37°C で培養をした。その後 Spectra Max (Molecular Devices) を用いて、450 nM における Optical density (OD)値を計測した。

13) M2 様マクロファージ分化アッセイ

単球細胞株である THP1 細胞は、実験に使用する 2 日前に 1.0×10^6 細胞/10 cm dish で、10% FBS を含む DMEM 培地上に播種した。2 日後に THP1 細胞を無血清の DMEM 培地と交換した。3 日目に HSC44PE-SMF 培養上清、HSC44PE-SSF 培養上清、DMEM-SMF 培養上清、DMEM-SSF 培養上清で THP1 細胞を培養し、2 日間培養を行った。その後、

PBS で細胞を 3 回洗浄し、TRIzol を用いて回収を行った。

14) 統計処理

免疫細胞浸潤数は means \pm SD、それ以外の結果は、 means \pm SE 値で表した。統計比較は、F 検定を用いることで等分散の有無を検討した。次にスチューデントの t 検定もしくは Welch 法を用いて有意差を検討した。また浸潤浅層部及び浸潤深部におけるがん細胞での HMGB1 細胞質局在率は Stat Flex Ver5.0 を用いて χ^2 検定を行い、がん培養上清を添加した際の炎症性サイトカインの発現量に関しては、多重比較検定 Bonferoni/Dunn 法を使って有意差を求めた。また免疫染色における Ki67 核内陽性率については、Wilcoxon signed rank test により統計解析を行った。

t 検定及び多重比較検定においては両側検定で P 値が 0.05 未満だった場合に有意差ありとみなした。

5. 第一章) 線維芽細胞における HMGB1-TLR を介した炎症誘導機構

I)-1 序論

核内タンパク質の一つである High Mobility Group Box-1 (HMGB1)は、 p53 や Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)の転写を制御し、DNA の折り返しに関与するクロマチン結合因子である^{20,21}。この HMGB1 は、がんを始めとする関節リウマチなどの慢性炎症の病態像に深く関与し、壊死した細胞から細胞外へと受動的に分泌される²²。その一方で、マクロファージなどの免疫細胞は細胞質から細胞外へと能動的に放出される事が報告されている²³⁻²⁵。HMGB1 はがん細胞が腹膜に播種した、がん性腹膜炎患者の腹水中において高値で検出され、進行がん患者の治療標的となる因子の一つとして知られている²⁶。

これまでに胃がん細胞の増殖や進展に HMGB1 とその受容体である Receptor for advanced glycation end-products (RAGE)が関与する事が報告された^{27,28}。潰瘍性大腸炎モデルである大腸がん発症マウスにおいてはHMGB1 の中和抗体を投与する事で腫瘍の発生率および大きさが有意に低下する事が知られている²⁹。

HMGB1 は先に述べた RAGE 以外にも受容体の一つである Toll-like receptor (TLR) -2 および TLR4 と結合する。TLR は、Lipopolysaccharide (LPS)、ウィルスの DNA や Ribonucleic acid (RNA)鎖などの外因性因子を認識する受容体として発見された。ヒトでは現在までに 10 種類の TLR が確認され、細胞内や細胞膜上に発現する³⁰。リガン

ドが結合した TLR は Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) のリン酸化、Nuclear Factor kappa B (NF-κB) の核内移行などの細胞内下流シグナルを活性化し、炎症性サイトカインやタイプ I インターフェロンを誘導する³¹。近年、炎症誘導因子として認識されていなかった Heat Shock Protein 60 (HSP60) や HMGB1 などの内因性因子による TLR の活性化が、ヒト自己免疫疾患(慢性関節リウマチ)の発症にも関与することが明らかになった³²。

先述したように、がん組織中において線維芽細胞は最も割合が高いがん間質細胞であり、がん細胞の増殖や進展、そして転移にも関与する^{33,34}。これまでのがん組織中における線維芽細胞の研究は、線維芽細胞によって誘導されるがん細胞の浸潤や進展、血管新生、がん細胞の上皮間葉移行に着目をした研究であった。しかし、炎症の観点より線維芽細胞を検討すると、TLR の発現が、歯根組織を構成する歯肉線維芽細胞や関節を構成する滑膜線維芽細胞にも認められる事がこれまでに報告されている³⁵⁻³⁷。そして、これらの線維芽細胞における TLR 発現が口腔内の細菌感染や関節リウマチにおける炎症反応にも深く関与している^{37,38}。

これまでがん組織中における炎症反応は、がん細胞とマクロファージやリンパ球に代表される免疫細胞の相互作用によって惹起されると考えられてきた。免疫細胞および線維芽細胞の分化、増殖、そして遊走に関与する種々のサイトカインやケモカインは、免疫細胞とがん細胞の相互作用で誘導されるとの知見が数多く認められる^{39,40}。

しかしながら、がん間質細胞中で最も割合が高い細胞は線維芽細胞であり、線維芽細

胞も炎症性サイトカインを発現誘導し、炎症反応に関与する可能性が示唆される。

I)-2 目的

第一章では、ヒト由来線維芽細胞において TLR2/4 が発現し、また同時に胃癌細胞株において HMGB1 が発現している事を示す。そして胃癌細胞から放出された HMGB1 がヒト由来線維芽細胞に発現する TLR2/4 を介して炎症性サイトカインを誘導する事を明らかにし、炎症反応にヒト由来線維芽細胞が関与する事を明らかにする。

I)-3 結果

I)-3-1. がん細胞株培養上清中の HMGB1 量の違い

がん細胞において HMGB1 が遺伝子レベルで発現し、細胞外に放出されるかを検討するため、5 個のがん細胞株を用いて *HMGB1* の遺伝子発現およびがん細胞株培養上清中の HMGB1 について検討を行った。

初めに 5 がん細胞株 (胃がん細胞株: HSC44PE、HSC60、MKN7、大腸がん細胞株: DLD1、Caco2) において *HMGB1* の遺伝子発現を qRT-PCR により確認した。その結果、ヒト由来線維芽細胞 (fibroblast) と比較して全てのがん細胞株で *HMGB1* の遺伝子発現量が高い事が明らかとなった(図 5A)。

次のがん細胞株が細胞外に HMGB1 を放出しているか検討するために、WB 法を用いてがん細胞株培養上清中の HMGB1 を検出した。HMGB1 はヒト線維芽細胞由来培養上清(fibroblast)では認められなかったが、全てのがん細胞株培養上清中で HMGB1 が認められた(図 5B)。がん細胞株培養上清中での HMGB1 量は、培養上清中への HMGB1 放出量が多い HMGB1-high 群(HSC44PE、DLD1)と培養上清中への HMGB1 放出量が少ない HMGB1-low 群(MKN7、HSC60、Caco2)の二つに分かれた。HMGB1 の遺伝子発現量とがん細胞株培養上清中に含まれる HMGB1 のタンパク量に相関関係は認められなかった。

HMGB1 は核から細胞質へと移行する事により細胞外へと放出されることが知られて

いる²⁵。そこで本研究で使用する胃癌細胞株 (HSC44PE、HSC60) における HMGB1 の細胞内局在を免疫化学細胞染色法により検討した。その結果、HSC60 (HMGB1-low 群) では HMGB1 が核に局在し、その一方で HSC44PE (HMGB1-high 群) では HMGB1 が細胞質と核いずれにも局在していた(図 5C)。HSC44PE はマウスの腹腔内に投与すると、腹膜にがん細胞が播種を起し、炎症反応の一つであるがん性腹膜炎を来たすがん細胞株である。また HMGB1 をマウスの腹腔内に投与すると、好中球の浸潤を伴う腹膜炎が起こる⁴¹。つまりがん細胞における炎症反応に胃癌細胞株由来の HMGB1 が寄与している事が示唆された。

I)-3-2 ヒト由来線維芽細胞における TLR2, TLR4 の発現検討

免疫細胞の一つであるマクロファージにおいて、HMGB1 は TLR2/TLR4 を介して炎症反応を誘導することがこれまでに報告されている⁴²。そこで HMGB1 受容体である TLR2/TLR4 の発現がヒト由来線維芽細胞でも認められるかを qRT-PCR および WB 法を用いて確認を行った。TLR2、TLR4 の遺伝子発現量は検体間で異なった(図 5D)。#2 を除くヒト由来線維芽細胞 3 検体では TLR2/TLR4 の発現がタンパク質レベルで認められた(図 5E)。TLR2 および TLR4 においても遺伝子発現量とタンパク質量は相関を認めなかった。FACS を用いて TLR2 および TLR4 の細胞膜表面の発現を検討した。その結果、細胞膜表面への TLR2/TLR4 の発現を#2 を除くヒト由来線維芽細胞 3 検体で認める事が出来た (data not shown)。

I)-3-3 リコンビナント HMGB1 で刺激したヒト線維芽細胞における炎症機構

がん細胞から放出された HMGB1 がヒト由来線維芽細胞に発現する TLR を活性化し、炎症反応を誘導するか検討した。TLR 活性化は、TLR 下流シグナルである IRAK4 のリン酸化、NF- κ B 核内移行そして炎症性サイトカインの遺伝子発現誘導を指標とした。リコンビナント HMGB1(rHMGB1)で刺激した線維芽細胞において TLR の活性化が認められるか検討を行った。

rHMGB1 の刺激により、24 時間後において炎症性サイトカインである *IL1B*、*IL6*、*IL8* の遺伝子発現量が増加し、また rHMGB1 濃度依存的に遺伝子発現量が増加した (図 6A)。その一方で *IL12A*、*IL12B*、*TNF α* の遺伝子発現は誘導されなかった (data not shown)。IRAK4 のリン酸化および NF- κ B 核内移行は、それぞれ rHMGB1 刺激後、15 分と 120 分後で認められた(図 6B、6C)。この時、rHMGB1 による刺激を行っていない線維芽細胞では、NF- κ B 核内移行は認められなかった(data not shown)。これらの結果より、ヒト漿膜下層由来線維芽細胞においても rHMGB1 が TLR に結合し、TLR 下流シグナルである IRAK4 のリン酸化、NF- κ B 核内移行そして炎症性サイトカインの発現誘導に寄与することが明らかとなった。

I)-3-4 胃がん細胞株培養上清で刺激したヒト由来線維芽細胞における炎症機構

胃がん細胞株培養上清中の HMGB1 がヒト由来線維芽細胞に発現する TLR を介して IRAK4 のリン酸化、NF- κ B 核内移行そして炎症性サイトカインを誘導するか検討した。

胃癌細胞株において HMGB1-high 群に分類される HSC44PE と HMGB1-low 群に分類される HSC60 由来の胃癌細胞株培養上清でヒト由来線維芽細胞を刺激した。

HMGB1-high 群に属する HSC44PE 由来のがん細胞株培養上清で刺激したヒト由来線維芽細胞では、IRAK4 のリン酸化および NF- κ B の核内移行が、それぞれ刺激後 15 分および 60 分で認められた (図 7B、7C)。また刺激後 24 時間で *IL1B*、*IL6*、*IL8* の発現が DMEM で刺激したヒト由来線維芽細胞と比較して有意に増加した(図 7A)。その一方で HSC60 由来の胃癌細胞株培養上清で刺激したヒト由来線維芽細胞では、IRAK4 のリン酸化および *IL1B*、*IL6*、*IL8* の遺伝子発現上昇が認められなかった (図 7A、7B)。

HSC44PE 胃癌細胞株培養上清中の HMGB1 量が HSC60 胃癌細胞株培養上清中の HMGB1 量と比較して高い事より、HSC44PE 培養上清中の HMGB1 がヒト由来線維芽細胞における IRAK4 のリン酸化、NF- κ B 核内移行に寄与する可能性が示唆された。

次に HMGB1 をノックダウンした HSC44PE 胃癌細胞株培養上清がヒト由来線維芽細胞において炎症性サイトカインの発現量を抑制するか検討するため、HSC44PE に siRNA-HMGB1 を遺伝子導入した。siRNA-HMGB1 (S6647)を HSC44PE に遺伝子導入後、24、48、96 時間後に HSC44PE 由来がん細胞株培養上清を回収し、がん細胞株培養液中の HMGB1 量を検討した。その結果、遺伝子導入後 48 時間において、HSC44PE 培養上清中の HMGB1 量が減少する事を確認した(補足図.2)。そこでこの 48 時間後の HSC44PE 培養上清を回収し、ヒト由来線維芽細胞を刺激した。その結果、*IL6* を除く *IL1B*、*IL8* の炎症性サイトカイン発現量が抑制されることが分かった (図 7D)。特に

siRNA-HMGB1 を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清は、siRNA-control を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清と比較して線維芽細胞における *IL8* の発現が有意に抑制された。

I)-3-5. 胃癌組織における胃癌細胞 HMGB1 とその周囲を構成する線維芽細胞における NF- κ B 核内移行について

胃癌細胞から分泌された HMGB1 が、胃癌細胞周囲の線維芽細胞における NF- κ B の核内局在に対して与える影響を検討するために、免疫組織化学染色を施行した。

初めに胃癌細胞における HMGB1 の発現と局在を検討した。胃癌組織を浅層部 (粘膜から粘膜下層) と深層部 (漿膜下層から漿膜) の二つに分けた。浅層部 (shallow invasion) から深層部 (deeper invasion) を構成するいずれの胃癌細胞においても

HMGB1 の発現が認められた(図.8A)。また、胃癌細胞が浅層部 (shallow invasion) から深層部 (deeper invasion) へと浸潤するに伴い、胃癌細胞における HMGB1 の発現が核から核および細胞質へと変化した(図 8A、8B)。

同様に胃癌組織中の浅層部 (shallow invasion) と深層部 (deeper invasion) での各線維芽細胞における NF- κ B の核内移行についての検討を行った。その結果深層部 (deeper invasion) を構成する線維芽細胞においては NF- κ B の局在が核内に認められた(図 8C)。

胃癌組織中の深層部においては、胃癌細胞から放出された HMGB1 が、胃癌細胞周囲の線維芽細胞に発現する TLR を介して炎症を惹起する可能性が示唆された。

I)-4 考察

1) 胃癌組織中の深層部を構成する線維芽細胞は TLR2/4 を介して、胃癌細胞由来の HMGB1 によって炎症反応が誘導される

in vitro の観察から、胃癌組織の深層部を構成するヒト漿膜下層由来線維芽細胞でも滑膜由来線維芽細胞や歯肉線維芽細胞^{37,38}と同様に TLR2 や TLR4 の遺伝子、タンパク質発現が認められた(図 5D、5E)。また、HMGB1 放出量が高い HSC44PE では HMGB1 の局在が細胞質と核に認められ(図 5C)、rHMGB1 および HSC44PE で刺激した線維芽細胞では TLR 下流シグナルの活性化、炎症性サイトカイン *IL1B*、*IL6*、*IL8* の発現誘導も認められた(図 6、7)。これまでに rHMGB1 の刺激によりマクロファージに発現している TLR2/4 を介して炎症性サイトカインが誘導されることが示されている⁴²。これらの検討からヒト漿膜下層由来線維芽細胞においても免疫細胞であるマクロファージと同様に HMGB1-TLR2/TLR4 による炎症反応が惹起されることが明らかとなった。

また、ヒト胃癌組織中の深層部 (deeper invasion)においては、胃癌細胞で HMGB1 の核と細胞質局在、そしてその周囲を構成する線維芽細胞で NF- κ B 核内局在が認められた(図 8)。核内タンパク質である HMGB1 は、細胞核から細胞質へと移行し、細胞外へと放出されることが報告されている^{43,44}。つまりがん組織中、特に深層部においては、胃癌細胞から HMGB1 が放出され、周囲の線維芽細胞を活性化し、炎症反応に関与する可能性が示唆された。

2) 線維芽細胞はがん組織中において免疫細胞の遊走や分化に関与する

本研究ではマクロファージ及び線維芽細胞において HMGB1 が TLR の活性化を介して炎症性サイトカインを誘導する共通点を見出した。

しかし、これまでの知見では中和抗体や HMGA box 添加による HMGB1 の刺激を抑制する研究において、マクロファージでは *IL1B*、*IL6*、*TNFa* の遺伝子発現量が有意に抑制される事が報告されている^{45, 46}。本研究で siRNA-HMGB1 によって HSC44PE における HMGB1 をノックダウンすると、線維芽細胞では *IL6* は抑制されず、*IL1B* や *IL8* が有意に抑制される結果となった(図 7D)。それに加えて、rHMGB1 で刺激したマクロファージでは *TNFa* や *IL1B* が主に誘導されるのに対して、rHMGB1 で刺激したヒト由来線維芽細胞では *IL8* が主に誘導された(図 6A)。これは炎症反応において HMGB1 がそれぞれの細胞に異なった働きを示していると考えられる。特に *IL8* は、これまでにすい臓がんや大腸がんにおける浸潤に重要な役割を果たし^{47, 48}、炎症担当細胞である単球や好中球を炎症部位に遊走する因子として報告されている。よって、がん細胞からの直接の刺激ではなく、線維芽細胞によって誘導された *IL8* ががん組織への免疫細胞の遊走に関与している可能性が考えられる。

以上より線維芽細胞とマクロファージにおいて rHMGB1 の刺激により誘導される炎症性サイトカインが異なっていることから、がん組織における炎症反応において、その細胞種ごとに異なる役割を果たしている可能性があると考えられる。特に、線維芽細胞は免疫細胞の遊走や活性化に関与し、免疫細胞を炎症部位へと誘導してくる可能

性が考えられた。

3) 線維芽細胞の炎症に対する応答性は、解剖学的部位に依存して異なる

本研究では、ヒト胃癌組織切片を用いて線維芽細胞における NF- κ B 核内移行率を検討した。その結果、胃癌組織の浅層部 (shallow invasion) と比較して深層部 (deeper invasion) において線維芽細胞における NF- κ B 核内移行率が高かった(図 8C)。胃癌細胞においても HMGB1 の発現が浅層部 (shallow invasion) と比較して深層部 (deeper invasion) において細胞質局在率が有意に高かった(図 8A)。

これは胃癌細胞の浸潤に伴い、①胃癌細胞の形質の変化、②胃癌細胞周囲を取り囲む線維芽細胞の形質の変化の二点が考えられる。所属する研究室では、線維芽細胞が存在する解剖学的な部位の違いによって遺伝子発現が異なる事を示し⁴⁹、またがん細胞株で刺激した線維芽細胞は、解剖学的な部位に依存して、その遺伝子発現や生物学的機能も異なる事も提示した⁵⁰。これらの事から、胃癌細胞の浸潤に伴い、周囲の環境によって胃癌細胞における HMGB1 の局在が変化し、その結果、深層部の線維芽細胞において NF- κ B 核内移行が生じた可能性も考えられた。

I)-5 結論

第一章では、がん細胞で活性化された線維芽細胞が、がん組織中で誘導される炎症反応に関与する事を示した。特に胃がん細胞から放出された起炎分子の一つである HMGB1 がヒト由来線維芽細胞の TLR2、TLR4 に結合し、下流シグナルである IRAK4 のリン酸化、NF- κ B 核内移行を介して炎症性サイトカインを誘導する分子機構の関与が示唆された。

6. 第二章) 部位特異的線維芽細胞による特異的な炎症ニッチ形成機構の解明

II)-1 序論

これまでの検討により胃がん細胞から放出された HMGB1 が線維芽細胞に発現する TLR2、TLR4 の活性化を介して炎症性サイトカイン(*IL1B*、*IL6*、*IL8*)を発現誘導することが明らかとなった。つまり線維芽細胞でも免疫細胞と同様に炎症反応に関与することを明らかにした⁵¹。また HSC44PE で刺激した線維芽細胞からは、*IL1B*、*IL6*、*IL8* などの免疫細胞の遊走や増殖そして分化に寄与する炎症性サイトカイン遺伝子の発現も認められた⁵¹。

これまでも線維芽細胞の活性化マーカーである alpha-SMA を特異的に欠損させた筋線維芽細胞を持つすい臓がんモデルマウスにおいては、制御性 T 細胞の増加がもたらされ、一部の T 細胞や B 細胞の遊走が抑制されることが報告されている⁵²。また、がんと同様の「慢性炎症」であるリウマチ関節患者から採取された線維芽細胞と上皮細胞を共培養(両者の接着が無い条件)すると、T 細胞の遊走が促進される事もこれまでに明らかになっている⁵³。これらの知見から、がん組織中において、がん細胞で活性化された線維芽細胞は炎症反応に寄与し、特に免疫細胞を誘導、分化する可能性があると考えられた。

また胃がん組織標本において胃がん細胞周囲の線維芽細胞が炎症反応に関与するか検討を行うため、NF-κB 核内局在についてヒト胃がん組織の免疫組織化学染色を行っ

た。その結果、胃がん細胞が存在する解剖学的な部位によりその周囲に存在する線維芽細胞の NF- κ B 局在に変化が認められた。これまでも所属する研究室において、解剖学的な部位に依存した層から採取した大腸線維芽細胞（粘膜下層由来線維芽細胞、漿膜下層由来線維芽細胞）は、大腸がん細胞株培養上清の刺激により、部位特異的に遺伝子発現および生物学的機能を持つことを明らかにした⁵⁰。つまりがん組織中における炎症環境が、がん細胞が存在する解剖学的な部位に依存して形成されることが示唆された。

II)-2 目的

次に本研究では、胃癌組織中において胃癌細胞が存在する解剖学的な層ごとでの炎症環境を明らかにする。また胃癌組織において、解剖学的な層に存在する部位特異的な線維芽細胞が、胃癌組織中における炎症環境形成に及ぼす影響を明らかにする。

II)-3 結果

II)-3-1. 胃癌組織中での炎症環境

胃癌組織中において、胃癌細胞が存在する解剖学的な部位の違いによって形成される炎症環境について明らかにするために、20 症例のヒト胃癌患者の免疫組織化学染色を施行した。症例の抽出方法として胃癌細胞が漿膜下層まで認められ、術前放射線療法および化学療法を施行していない患者を対象とした。

(i) がん部と非がん部における免疫細胞の動態の違い

SM層においては、CD56 陽性細胞 (ナチュラルキラーT細胞)を除く CD4 陽性細胞 (ヘルパーT細胞)、CD8 陽性細胞 (キラーT細胞)、CD20 陽性細胞 (B細胞)、CD15 陽性細胞 (好中球)、CD68 陽性細胞(マクロファージ)の浸潤数が非がん部と比較してがん部において有意に多かった(図9)。SS層においても、ナチュラルキラーT細胞および好中球を除くヘルパーT細胞、キラーT細胞、B細胞、マクロファージの浸潤数が非がん部と比較してがん部において有意に多かった(図9)。

これらの結果より、ヒト胃癌組織中におけるがん部では各種免疫細胞の浸潤が起こり、炎症反応が誘導されている事が明らかとなった。

(ii) がん部における解剖学的層の違いによる免疫細胞の動態の違い

胃癌細胞が存在する解剖学的な層の違いが炎症環境に与える影響を検討するため

に、がん部の各層における各種免疫細胞の個数、 α -SMA 陽性線維芽細胞面積割合を算出した。

がん部においては、SS 層と比較して SM 層においてヘルパーT 細胞、キラーT 細胞、B 細胞の各種リンパ球、および好中球の浸潤数が有意に多かった (図 9、10)。その一方で SS 層と比較して SM 層においてはマクロファージ (CD68 陽性細胞) の浸潤数が有意に低かった (図 9、10)。マクロファージはその生物学的機能から M1 マクロファージと M2 マクロファージの 2 種類に分類する事が出来る。M1 マクロファージは一酸化窒素や LPS、他の炎症性サイトカインなどの分子により誘導され、がん細胞を殺す殺腫瘍効果を示す⁵⁴。M2 マクロファージは IL4、IL10、IL13、Colony Stimulating Factor 1 (CSF1)、TGF β などの分子により誘導され、組織修復やがん細胞の浸潤および進展に関与する事が知られている⁵⁴。そこで本研究では M2 マクロファージマーカーの一つである CD204 を用いて免疫組織化学染色を行い、がん部における M2 マクロファージの浸潤数および割合を算出した。その結果、がん部では SM 層と比較して SS 層において M2 マクロファージの浸潤数および割合が有意に大きくなった (図 11A、B)。

次に、がん部における α -SMA 陽性線維芽細胞面積の割合を算出した。その結果、がん部では SM 層と比較して SS 層で、 α -SMA 陽性線維芽細胞面積の割合が高かった(図 12A)。免疫組織化学染色で示すように、非がん部においては α -SMA 陽性線維芽細胞は血管内皮細胞および固有筋層を構成する筋細胞のみで染色が認められた(図 12B)。つまり胃がん細胞が、胃がん組織中に存在する事によって線維芽細胞が

活性化されることが明らかとなった。

上記の結果で示すように、胃癌組織中において、SM層ではリンパ球や好中球、SS層ではM2マクロファージが主体となっていた。つまり胃癌細胞が存在する解剖学的部位の違いによって、免疫細胞の分布が異なる事が明らかとなった(図13)。また各層を構成する線維芽細胞は、がん細胞からの刺激により初めて活性化される事が明らかとなった。これらの結果より胃癌細胞の解剖学的な部位に依存して、がん細胞周囲の炎症環境が異なり、その炎症環境の違いはがん細胞とその周囲を構成する間質細胞の相互作用によって規定される可能性が示唆された。

II)-3-2.胃癌細胞で刺激した部位特異的な線維芽細胞が周囲の細胞に及ぼす影響

(i) 胃癌細胞で刺激した各種線維芽細胞が、免疫細胞に与える影響

これまでの検討および第一章から、がん組織中では、がん細胞によって活性化された線維芽細胞が免疫細胞の遊走や分化に関与し、また各種免疫細胞に及ぼす影響は線維芽細胞が存在する解剖学的部位に依存して異なると考えた。

ヒト胃癌細胞株であるHSC44PEで刺激した各種線維芽細胞が免疫細胞の生物学的機能に与える影響を検討するために、リンパ球細胞株であるJurkat細胞を用いたT細胞の遊走能実験、および単球細胞株であるTHP1細胞を用いたM2マクロファージの分化誘導実験を検討した。これまでの病理学的検討より、SS層を構成する線維芽細

胞が M2 マクロファージの分化に、SM 層を構成する線維芽細胞はリンパ球の遊走やがん細胞の増殖に寄与すると考えた(図 13)。そこで胃癌患者の非がん部の SM 層より採取された線維芽細胞を SMF、SS 層より採取された線維芽細胞を SSF として本実験に使用した。

初めに、胃癌細胞株である HSC44PE で刺激した SMF および SSF の両線維芽細胞が免疫細胞に与える影響を検討した。HSC44PE で刺激した SMF と SSF の培養上清(HSC44PE-SMF, HSC44PE-SSF)をそれぞれ単球細胞株である THP1 細胞に添加した。

そして M2 マクロファージで発現が高いとされる *Arg1*、*IL10*、および発現が低いとされる *IL12A*、*IL12B* の遺伝子発現を qRT-PCR を用いて検討した^{55,56}。

HSC44PE-SMF で刺激した THP1 細胞と比較して HSC44PE-SSF で刺激した THP1 細胞では M2 マクロファージで発現が上昇する *Arg1*、*IL10* の発現量が共に有意に高く、M2 マクロファージで発現が抑制される *IL12A*、*IL12B* の発現量は共に有意に低かった(図 14A)。

また HSC44PE-SMF と HSC44PE-SSF をリンパ球細胞株である Jurkat 細胞に添加し、遊走能についても検討を行った。その結果、HSC44PE-SSF で刺激した Jurkat 細胞と比較して HSC44PE-SMF で刺激した Jurkat 細胞においては、Jurkat 細胞の遊走が有意に高かった(図 14B)。HSC44PE-SMF と HSC44PE-SSF を比較すると、HSC44PE-SMF はリンパ球の遊走に、一方 HSC44PE-SSF は M2 マクロファージの分化に関与する事が明らかとなった(図 15)。つまり胃癌組織中において、胃癌細胞周囲の線維芽

細胞は、胃癌細胞からの刺激により部位特異的に免疫細胞の分化や遊走に影響を与える可能性が示唆された。

(ii) 胃癌細胞で刺激した各種線維芽細胞が、胃癌細胞自身に与える影響

胃癌組織中で、胃癌周囲の環境が、がん細胞に与える影響について次に検討を行った。胃癌患者 20 症例において CK19 陽性胃癌細胞を免疫組織化学染色法により同定した。CK19 は上皮細胞の構成タンパク質であり、胃癌細胞において高発現する。その後各層において CK19 陽性胃癌細胞面積率を検討した。

その結果、胃癌組織中においては SS 層と比較して SM 層で有意に CK19 陽性胃癌細胞の面積割合が高かった(図 16A、B)。そこで SM 層では SS 層と比較して、胃癌細胞の増殖が促進されていると考え、増殖マーカーである Ki67 を用いて免疫組織化学染色を施行した。その後各層における Ki67 核内陽性率を算出した。

胃癌組織中において SM 層における Ki67 核内陽性がん細胞の割合が、MP 層($p < 0.05$) および SS 層($p < 0.01$)と比較して有意に高かった(図 16C、D)。つまり SM 層に存在する胃癌細胞では増殖が促進されていた。

そこで、次に胃癌細胞株培養上清で活性化された線維芽細胞が、胃癌細胞の増殖に与える影響についても検討を行った。HSC44PE-SMF, HSC44PE-SSF, DMEM-SMF, DMEM-SSF それぞれの培養上清を添加した HSC44PE における増殖曲線を WST-8 法により作成した。

HSC44PE-SMF で HSC44PE を処理した群は、DMEM-SMF 添加群、DMEM-SSF 添加群、HSC44PE-SSF 添加群と比較して HSC44PE の増殖が有意に増加した (図 16E)。その一方で、HSC44PE-SSF で処理をした HSC44PE 群は、DMEM-SSF 添加群と比較して差が認められなかった(図 16E)。つまり、SM 層を構成する線維芽細胞は、胃癌細胞の刺激によって胃癌細胞の増殖に寄与する可能性が示唆された。これらの結果より、胃癌組織を構成する SM 層は、がん細胞の増殖を促進し、また SM 層を構成する粘膜下層由来線維芽細胞(SMF)も胃癌細胞の増殖に促進的に働く事が明らかとなった。

II)-3-3. 胃癌細胞株で刺激した線維芽細胞(SMF / SSF)における遺伝子発現解析

病理学的検討および生物学的検討により、胃癌組織中において SM 層と SS 層の炎症環境が異なる事が明らかとなった。免疫細胞やがん細胞に与える影響が各層を構成する線維芽細胞によって異なり、部位に依存した炎症環境の形成に、それぞれの特異的な線維芽細胞が関与する事も示唆された。そこで本研究では次に胃癌細胞株 HSC44PE で刺激した線維芽細胞 SMF、SSF における遺伝子発現の違いを cDNA マイクロアレイ法によって網羅的に解析した。

(i) 胃癌細胞株培養上清刺激による線維芽細胞での遺伝子発現解析

胃癌細胞株で刺激した線維芽細胞が炎症応答に関与するか検討するために、胃癌

細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞(SMF/SSFの区別なし)と DMEM で刺激した線維芽細胞(SMF/SSFの区別なし)を比較した。胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞において $p < 0.05$ かつ *Fold Change* > 2.0 の遺伝子発現が認められる遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子において、どのような遺伝子群が有意に含まれているか検討するために GO term 解析を施行した。

その結果、DMEM で刺激した線維芽細胞と比較して、胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞において有意に上昇した遺伝子は、サイトカイン活性化シグナル ($p < 0.01$)、ケモカイン活性化シグナル ($p < 0.01$) およびケモカイン受容体結合シグナル ($p < 0.01$) などの炎症に関連する遺伝子群であった(図 17)。つまり胃線維芽細胞は他のマクロファージやリンパ球などの免疫細胞と同様に胃癌細胞からの刺激により各種サイトカインやケモカインの遺伝子発現を誘導し、がん組織中での炎症反応に関与する事が明示された。

(ii) 胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清刺激による SMF と SSF 間の炎症関連発現遺伝子解析

胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞は、DMEM で刺激した線維芽細胞と比較して炎症に関連する遺伝子発現が有意に上昇する事を示した(図 17)。そこで次に胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞が、線維芽細胞の解剖学的な部位の違いにより発現する遺伝子が異なるか検討した。

HSC44PE 培養上清で刺激した SMF 及び SSF (HSC44PE-SMF, HSC44PE-SSF)における炎症に関連する遺伝子発現を抽出した。GO term 中における Immune system process 337 プローブに關与する遺伝子の発現について検討を行い、 $p < 0.05$ かつ *Fold change* > 2.0 の遺伝子に関してクラスタリング解析を行った。

HSC44PE-SMF で高発現する遺伝子プローブ数は 65 プローブ、HSC44PE-SSF で特異的に高発現する遺伝子プローブ数は 18 プローブであった。また、HSC44PE 培養上清もしくは DMEM で刺激した線維芽細胞における遺伝子の発現パターンは 5 つのグループに分けられた(図 18A)。これらのプローブの中から、再現性を高めるために *Raw 値* > 500 となる遺伝子を抽出した。①HSC44PE-SMF 群のみで発現抑制される 16 遺伝子、②HSC44PE-SMF および HSC44PE-SSF 群の両群で発現抑制される 3 遺伝子、③HSC44PE-SSF 群のみで発現上昇する 5 遺伝子、④HSC44PE-SMF 群のみで発現上昇する 11 遺伝子、⑤HSC44PE-SMF 群および HSC44PE-SSF 群で発現上昇する 7 遺伝子の 5 つの群に分かれた(図 18B)。

コントロール群(DMEM 刺激群)では DMEM-SMF と DMEM-SSF では炎症関連遺伝子の発現が類似性を持つクラスタリングを形成した(図 18A)。しかし同じ刺激である HSC44PE 培養上清を各線維芽細胞に添加すると、HSC44PE-SMF および HSC44PE-SSF の間において炎症に関連する遺伝子の発現パターンが異なった(図 18A)。つまり HSC44PE 培養上清同一の刺激を与えても、線維芽細胞が存在する解剖学的な部位に依存して、炎症関連遺伝子を発現誘導する事が分かった。

(iii) 胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清刺激による SMF と SSF におけるサイトカイン、ケモカイン発現解析

病理学検討及び生物学的検討より、胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清で刺激した SMF はリンパ球の遊走に、胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清で刺激した SSF は M2 マクロファージの分化に關与する事が明らかとなった。

つまりがん組織を構成する線維芽細胞の違いによって、遊走もしくは分化誘導を起こす免疫細胞は異なった。そこで上記 ii) の結果よりがん細胞の刺激によって SMF および SSF で特異的に誘導されるサイトカインやケモカインについて Raw intensity value 値を用いて同定を行った。その結果、サイトカインやケモカインにおいては、HSC44PE で刺激した SSF (HSC44PE-SSF) では *Colony stimulating factor (CSF)1*、*Tissue growth factor-beta (TGFβ)2*、*CCL8*、*Chemokine ligand C-X-C (CXCL) 5* の 4 遺伝子が、HSC44PE で刺激した SMF (HSC44PE-SMF) では *IL1B*、*Tumor necrosis super family (TNFSF)15*、*Chemokine ligand C-C (CCL)13* の 3 遺伝子が特異的に発現上昇する事が明らかとなった(図.19A、19B)。その一方で、HSC44PE-SMF および HSC44PE-SSF で共通に発現上昇する *CCL2*、*CCL7*、*CXCL1*、*CXCL2*、*CXCL3*、*CXCL6*、*IL6* の 7 遺伝子が認められた(図 19C)。

これら各部位の線維芽細胞で特徴的に発現上昇した遺伝子の中で、HSC44PE-SMF で上昇した因子の中で *IL1B*、*TNFSF15* の 2 遺伝子はリンパ球の遊走に、HSC44PE-SSF で上昇した因子の中で *CSF1*、*TGFβ 2* の 2 遺伝子は M2 マクロファージの分化に寄与

する事が報告されている^{57,58}。そこで次に HSC44PE-SMF において *IL1B*、*TNFSF15* が、HSC44PE-SSF において *TGFβ2*、*CSF1* の遺伝子発現を qRT-PCR により確認した。その結果、HSC44PE-SMF は、他の群と比較して *IL1B*、*TNFSF15* の遺伝子発現が高かった(図 20B)。その一方で、HSC44PE-SSF は他の群と比較して *CSF1*、*TGFβ2* の遺伝子発現が高かった(図 20)

つまり胃がん組織中において、胃がん細胞周囲の線維芽細胞は、それぞれの部位特異的な炎症環境構築を調節している可能性が示唆された(図 21)。

(iv) DMEM で刺激した SMF と SSF における受容体発現

上記で先述したように、DMEM-SMF と DMEM-SSF では炎症関連遺伝子の発現が類似性を示した。その一方、HSC44PE-SMF と HSC44PE-SSF の両線維芽細胞では、異なる遺伝子発現パターンを示した(図 18A)。これらの事より DMEM-SMF と DMEM-SSF では細胞膜に発現する受容体や細胞膜輸送に関与する遺伝子群の発現が異なる事が考えられた。そこで GO termn 内で receptor activity 28 プローブについて DMEM-SMF 群と DMEM-SSF 群についてクラスタリング解析を行った。

その結果、receptor activity 28 プローブに関して、DMEM-SSF 群と比較して、DMEM-SMF 群において有意に発現上昇が認められる 12 プローブと、DMEM-SMF 群と比較して、DMEM-SSF 群において有意に発現上昇が認められる 16 プローブが同定できた(図 22A)。受容体関連遺伝子の発現は線維芽細胞の解剖学的な部位に依存して

異なり、この違いにより部位特異的な炎症環境が形成される可能性が示唆された。

Receptor activity 28 プローブについてそれぞれの遺伝子名を抽出した。その結果 DMEM-SMF 群で発現が高い遺伝子は 11 遺伝子あり、*TNFRSF1B*、*CXCR7*、*TNFRSF9*、*CCR10* のサイトカイン、ケモカイン受容体が認められた(図 22A, 23A)。DMEM-SSF 群で発現が高い遺伝子は 14 遺伝子であり、炎症に寄与する *TLR4*、*TSPAN12* などの発現が認められた(図 22B, 23B)。つまり、定常状態において各線維芽細胞における受容体の発現レベルやその種類が異なる事により HSC44PE 培養上清の刺激を加えると、部位特異的な炎症反応が誘導される可能性が示唆された。

II)-4 考察

1) 胃癌組織では部位特異的に炎症環境が形成され、その形成に線維芽細胞が関与する

本研究においては、胃癌患者の非がん部から採取した二つの線維芽細胞である SMF と SSF を使用した。病理学的検討により、胃癌組織中の粘膜下層(SM)では T リンパ球(ヘルパーT 細胞、キラーT 細胞)、B リンパ球、および好中球の浸潤数が高い事が認められた(図 9、10)。またこの粘膜下層より採取した線維芽細胞 SMF を胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清によって刺激を行うと、*IL1B*、*TNFSF15* の特異的なサイトカインが発現誘導された(図 20B)。*IL1B* は炎症応答を誘導し、リンパ球の増殖や遊走に、*TNFSF15* は、ヘルパーT 細胞(CD4 陽性細胞)への分化や遊走に寄与する事が報告されている^{58, 59}。その一方で、胃癌組織中の漿膜下層(SS)では M2 マクロファージの浸潤数が高かった(図 11)。またこの漿膜下層より採取された線維芽細胞 SSF を HSC44PE 培養上清によって刺激をすると、*CSF1*、*TGFβ2* の特異的なサイトカインが発現誘導された(図 20A)。この *CSF1* および *TGFβ2* は、組織に移行する際、血管を流れる単球細胞が M2 マクロファージへと分化する事に関与する⁶⁰。上記の知見より胃癌組織中における粘膜下層では、粘膜下層を構成する粘膜下層由来線維芽細胞が *IL1B* や *TNFSF15* などを誘導し、その結果、リンパ球の遊走が促進され、リンパ球が主体となった炎症環境が胃癌組織中の粘膜下層で形成される。その一方で、胃癌組織中における漿膜下層では、漿膜下層を構成する漿膜下層由来線維芽細胞が *TGFβ2*、*CSF1*

を誘導し、その結果、単球細胞が M2 マクロファージへと分化し、その M2 マクロファージが主体となった炎症環境が、胃癌組織中の漿膜下層で形成されると考えられる。

それぞれの解剖学的部位に依存して存在する線維芽細胞は、免疫細胞の遊走や分化において重要な役割を果たすと考えられる。これまでも線維芽細胞の活性化マーカーである alpha-SMA を欠損したすい臓がんマウスモデルにおいては、CD45 陽性リンパ球、CD3 陽性リンパ球、そして CD19 陽性 B 細胞の浸潤が有意に抑制される事が報告された⁵²。線維芽細胞は炎症環境の形成に重要な役割を有しており、それぞれの部位特異的な線維芽細胞がそれぞれの部位特異的な免疫細胞の分化や遊走に関与することが示唆された。

2) 胃癌組織中における部位特異的な炎症環境は、胃癌細胞に対して異なる影響を与える

胃癌組織中における Ki67 核内陽性胃癌細胞の割合は、SM 層において SS 層 ($p<0.01$) や MP 層 ($p<0.05$) と比較して有意に高かった(図 16C、D)。Ki67 は細胞周期関連タンパク質の一つであり、増殖中の細胞において発現が認められる因子である。これまでも胃癌組織において浅層部(粘膜下層、固有筋層)に存在する胃癌細胞と深層部(漿膜下層、漿膜)に存在する胃癌細胞の Ki67 核内陽性率を検討した報告がある¹⁹。本研究と同様に先行研究においても胃癌細胞における Ki67 核内陽性胃癌

細胞は、深層部と比較して浅層部で高い事が示された。

また HSC44PE-SMF 培養上清で刺激した HSC44PE は、他の培養上清刺激群 (HSC44PE-SMF, DMEM-SSF, DMEM-SMF)と比較して胃癌細胞株 HSC44PE の増殖能が高かった(図 16E)。SM 層を構成する線維芽細胞もがん細胞の増殖に関与すると考え、HSC44PE で刺激した SMF で特異的に誘導されるサイトカイン *IL1B*、*TNFSF15* について着目した(図 20B)。*TNFSF15* は Vascular endothelial cell growth inhibitor (VEGI) としても知られている因子である。乳がん細胞株(MDA-MB-231、MDA-MB-435)と VEGI を過剰発現する CHO 細胞をマウスに共移植すると、血管新生の抑制により腫瘍の形成が抑制される報告がある。しかし、リコンビナント VEGI を添加した乳がん細胞株では、乳がん細胞株の増殖抑制は認められなかった⁶¹。その一方、*TNFSF15*、*IL1B* は、多くのがん細胞の増殖に関与する NF- κ B 経路を活性化させることが報告されている^{58, 62}。つまり HSC44PE-SMF 培養上清で刺激した HSC44PE において増殖能が有意に高い要因の一つに、*TNFSF15* および *IL1B* が、胃癌細胞の NF- κ B 経路を活性化した可能性が考えられる。胃癌組織中で粘膜下層を構成する粘膜下層由来線維芽細胞は、胃癌細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

その一方で、胃癌組織を構成する漿膜下層由来線維芽細胞は胃癌細胞の進展に関与する可能性がある。その理由は HSC44PE で刺激した漿膜下層由来線維芽細胞では、がん細胞における上皮間葉移行を促進する TGF β 2 の発現量が高いからである(図 20A)。

上皮間葉移行とは、固く接着した上皮細胞由来のがん細胞が、形態および遺伝子発現変化を経て、細胞同士の接着が弱い間葉系細胞になることを表す⁶³。この間葉系細胞へと移行したがん細胞は、運動能力が高いために、組織浸潤や他臓器転移を引き起こす事が可能となる。TGFβ2もTGFβファミリーに属しており、上皮細胞に作用し上皮間葉移行を起こす事が明らかとなっている⁶⁴。これまでも外来因子であるTGFβは胃癌細胞株における上皮マーカーE-カドヘリンの発現を抑制し、間葉系マーカーであるvimentinの発現を促進する事で、胃癌細胞の進展に寄与する事が報告されている⁶⁵。さらに、病理学的検討より漿膜下層ではがん細胞の浸潤を促進するM2マクロファージの浸潤数も有意に高かった(図11A、B)。つまり胃癌組織中で漿膜下層を構成する漿膜下層由来線維芽細胞は、胃癌細胞の浸潤を促進することが明らかとなった。

上記の知見より、炎症環境の違いが、粘膜下層では胃癌細胞の増殖へと、漿膜下層では胃癌細胞の浸潤へと導く可能性が示唆された。つまり、炎症環境の違いによって、胃癌細胞に与える影響が異なる可能性がある。これまで、胃癌細胞の増殖や浸潤は、胃癌細胞における種々の遺伝子変異の蓄積(がん原遺伝子; c-metの増幅、がん抑制遺伝子; p53の不活性化、転移関連遺伝子; E-cadherin, B-cateninの変異)の結果として起こると考えられていた(図4)^{16,17}。しかし、本研究により胃癌細胞の浸潤や増殖の規定は、胃癌細胞自身の遺伝子異常のみならず、各層で創出された炎症環境の違いによってももたらされる事が示唆された。

3) 部位特異的な炎症環境の調節に線維芽細胞に発現する受容体などが関連する可能性はある

Inflammatory system process における炎症関連遺伝子のクラスタリングから、DMEM で刺激した線維芽細胞においては、DMEM-SMF と DMEM-SSF の遺伝子発現パターンは類似性を示したが、HSC44PE 培養上清で刺激を行うと、HSC44PE-SMF と HSC44PE-SSF の間で炎症関連遺伝子の発現パターンが異なった(図 18A)。これは定常状態で発現する受容体が異なっているため、その結果、HSC44PE 培養上清で刺激をした各線維芽細胞で特異的なサイトカインの発現誘導が生じると考えた。また、定常状態の DMEM-SMF と DMEM-SSF における受容体の発現の違いは、HSC44PE 培養上清中のどのような分子が受容体に結合するかも解明できると考えた。

そこで、DMEM で刺激した各線維芽細胞(DMEM-SMF、DMEM-SSF)について検討を行うと、DMEM-SMF で特異的に発現が高い 11 遺伝子、および DMEM-SSF で特異的に発現量が高い 14 遺伝子が認められた(図 22B)。

HSC44PE で刺激した粘膜下層由来線維芽細胞で特異的に遺伝子発現が上昇した *IL1B*、*TNFSF15* は NF- κ B シグナル経路によって誘導される遺伝子でもある。

DMEM-SMF において高発現する *TNFRSF9*、*TNFRSF1B*、*CXCR7* はサイトカイン、ケモカイン受容体であり、受容体とリガンドの結合により NF- κ B シグナル経路の活性化を起こす^{66,67}。受容体のリガンドには、それぞれ TNF receptor associated factor (TRAF;

TNFRSF9 のリガンド)、TNF-alpha (TNFRSF1B)、SDF1、CXCL11 (CXCR7)などが挙げられる。よって粘膜下層由来線維芽細胞では HSC44PE から分泌された TRAF、TNF-alpha、SDF-1、CXCL11 などの炎症性サイトカインや炎症性ケモカインが、粘膜下層由来線維芽細胞に特異的に発現する受容体を介して NF- κ B 活性化をもたらして *IL1B*、*TNFSF15* を誘導する可能性が示唆された。

その一方で DMEM-SSF で遺伝子発現量が高い受容体関連遺伝子テトラスパニン 12 (TSPAN12)は β -catenin/Wnt シグナル経路を活性化する事で知られており、このシグナル経路は TGF β の産生に寄与する^{68, 69}。TGF β 2 は HSC44PE 培養上清で刺激した漿膜下層由来線維芽細胞において特異的に発現が認められた遺伝子であり、CSF1 の遺伝子発現を促進する事もこれまでに明らかとなっている(図 20A)。

これまでにテトラスパニンでは、テトラスパニン 11 (CD151)、テトラスパニン 8、テトラスパニン 29 (CD9)の 3 種類について多くの研究が成されている。CD151 は増殖因子 Hepatocyte growth factor (HGF)の結合によって MAPK シグナル経路を介してがん細胞の浸潤に関与し⁷⁰、また、CD9 は Heparin Binding EGF like growth factor (HB-EGF)と、CD151 は Epidermal Growth Factor (EGF)と結合をする事も報告されている⁷¹。HGF、HB-EGF、EGF はいずれも細胞増殖因子である。よって SSF において特異的に発現が認められる TSPAN12 も細胞増殖因子と結合する可能性も示唆された。

また TGF β は Latent TGF β binding protein (LTBP)と結合する事で不活性化状態の latent

TGF β として産生され、受容体に対して活性化機能を持っていない⁷²。しかし、DMEM-SSF で高発現した Integrin 8 (ITG8) などにより、活性化状態の TGF β となり、線維化やがん細胞における EMT をもたらす事が報告されている⁷²⁻⁷⁴。がん細胞によって活性化された漿膜下層由来線維芽細胞から latent TGF β 2 が誘導され、そして ITG β 8 によって活性化 TGF β 2 となる事で、胃がん細胞の浸潤に寄与する可能性も示唆された。

漿膜下層由来線維芽細胞では HSC44PE から分泌された HGF、EGF などの増殖因子が、漿膜下層由来線維芽細胞に特異的に発現する受容体を介して β -catenin/Wnt シグナル活性化を起こす可能性がある。そして、産生された TGF β 2 は ITG β 8 により活性化状態の TGF β 2 へと移行し、がん細胞の浸潤に寄与すると考えられた。

つまり粘膜下層由来線維芽細胞では、胃がん細胞株 HSC44PE より分泌される各種サイトカインやケモカインが、漿膜下層由来線維芽細胞では、胃がん細胞株 HSC44PE より分泌される各種増殖因子が各線維芽細胞間で異なる炎症反応を誘導した可能性がある。

胃がん細胞株である HSC44PE の培養上清中には、多岐に渡る液性因子が含まれている。線維芽細胞の炎症応答は、個々の液性因子と結合する受容体の発現の違いにより規定されていると考えられる。例えば、大腸菌やヘリコバクターピロリ菌などのグラム陰性細菌細胞壁である LPS も炎症反応を来す。この LPS は、各種免疫細胞、漿膜下層を構成する漿膜下層線維芽細胞が発現する TLR4 と結合して、*IL1B*、*IL6*、*IL8*

などの各種炎症性サイトカインを発現誘導する³¹。この結果、患者の体内ではサイトカインストーム（血中サイトカインの異常上昇により血液凝固機構活性化，血管拡張などを介して、多臓器不全にまで進行した状態）が生じ、患者は死に至る。本研究で両線維芽細胞に LPS を添加すると、SSF において *IL1B*、*TNFSF15*、*CCL13* の遺伝子発現量が上昇した(補足図 1)。これらのサイトカインは HSC44PE 培養上清で刺激した SMF において特異的に遺伝子発現が上昇した 3 遺伝子であった(図 18B、19B)。また、本研究で検討した漿膜下層由来線維芽細胞は粘膜下層由来線維芽細胞と比較すると LPS に結合する TLR4 の発現が有意に高い事も明らかとなっている(図 22B、23B)。つまり個々の液性因子に対する受容体の発現が、粘膜下層由来線維芽細胞と漿膜下層由来線維芽細胞のどちらに認められるかによって炎症反応が規定されると考えられた。各層それぞれの線維芽細胞が元来保持する受容体の発現レベルや種類などが異なる事により、がん細胞の刺激に対して各層の部位特異的な炎症環境が創られる可能性が示唆された。そこで次に線維芽細胞が各層特異的な受容体の発現や炎症応答が、いつ獲得されたのか、考察を行った。

4) 両線維芽細胞の炎症に対する応答性の違いは、周囲の環境によってもたらされた胃がん組織中で構成される炎症環境において、胃がん細胞株 HSC44PE 培養上清に対する粘膜下層由来線維芽細胞と漿膜下層由来線維芽細胞の応答性の違いが生じた理由について考察した。理由として二点挙げられる。

一つ目の理由としては胚発生の段階で漿膜下層由来線維芽細胞と粘膜下層由来線維細胞の遺伝子発現が異なり、その結果、胃癌細胞株 HSC44PE に対する応答性が異なると考えられる。所属する研究室において、消化管線維芽細胞の遺伝子網羅的解析により、定常状態において臓器ごとに SMF と SSF の遺伝子発現が異なる事を明らかにしている⁴⁹。その一方で、臓器非依存性に SMF では Pituitary homeobox (PTX1)などの遺伝子が、SSF では MSX1 などの遺伝子発現が特異的に認められた⁴⁹。つまり臓器が形成される前後において線維芽細胞の部位特異性が生じたと考えられる。

二つ目の理由として、線維芽細胞が周囲の環境から影響を受ける事で、その性質が不可逆的に維持されている可能性が考えられる。

粘膜下層由来線維芽細胞及び漿膜下層由来線維芽細胞はいずれも中胚葉由来の細胞である。哺乳類の胎児は母体内では無菌状態だが、出生後、粘膜下層側は非常に多くの環境微生物に曝露される。そしてこの環境微生物の一部が胃や大腸の消化管粘膜などに常在菌として生着し、粘膜の上皮バリア機能が維持できる(3*)。無菌マウスにおいては、上皮細胞間の接着分子の発現が低く、細菌が定着する事により上皮細胞バリアが構築される⁷⁵。その一方で、常に環境微生物に曝されるヒトの消化管では、外来の病原生物に対する生体防御機構と常在菌への免疫応答の抑制の拮抗を保つ必要がある。そのために粘膜下である粘膜固有層に存在するマクロファージは炎症性サイトカイン発現に必要となる種々の受容体の発現が抑制されている(4*)。その他にも腸内

細菌の腸内発酵で産生された酪酸により、CD4 陽性ナイーブ T 細胞がヒストン H3 のアセチル化によって制御性 T 細胞へと変化し、腸内の恒常性を維持する事もこれまでに報告されてきた^{76,77}。このように粘膜下層では、環境微生物の影響により免疫細胞や上皮細胞の機能や分化が制御されている。これらの知見より、粘膜下層由来線維芽細胞も環境微生物の影響により細胞の機能が規定された可能性が考えられる。その反面、漿膜下層由来線維芽細胞は胃の深層部に位置しており、環境微生物などの外来因子と直接的に接触する機会は少ない事が考えられる。つまり、粘膜下層由来線維芽細胞と漿膜下層由来線維芽細胞は、周囲の環境によって炎症に関与する遺伝子発現や機能に違いが生じた可能性もある。

そして粘膜下層由来線維細胞と漿膜下層由来線維芽細胞の違いを恒久的に維持する機構としては、エピジェネティックな機構が挙げられる。ヒトのがん組織から採取したがん関連線維芽細胞(CAF)は、がん細胞と切り離れた *in vitro* 条件下の培養でも遺伝子発現に変化は認められない⁷⁸。つまり、がん細胞からの刺激が無くなっても、その遺伝子発現機構は不可逆的に維持されている事を意味しており、その維持機構にはヒストン修飾や DNA 修飾などのエピジェネティックな機構が関与する事と考えられる⁷⁹。つまり環境微生物に曝され続ける事により、粘膜下層由来線維芽細胞は炎症反応特有の遺伝子発現を獲得し、それを維持し続けている可能性がある。

本研究で使用した粘膜下層由来線維芽細胞 SMF における炎症関連遺伝子 immune response system においては、HSC44PE 培養上清で刺激をする事で DMEM 群と比較し

て抑制される遺伝子群が認められた(図 18A)。粘膜下層由来線維芽細胞は HSC44PE 培養上清刺激に対して抑制的に働くメカニズムを獲得している可能性がある。この HSC44PE 培養上清刺激により抑制された遺伝子群を COXPRES db により検討すると、炎症性サイトカインの誘導に関与する p38 MAPK 遺伝子群が濃縮されていた(data not shown)。つまり粘膜下層由来線維芽細胞も外部からの刺激に対して miRNA、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピゲノムな修飾を受けて、炎症応答に関与する遺伝子の発現が抑制された可能性がある。

II)-5 結論

第二章の研究により胃がん組織中では、胃がん細胞が存在する解剖学的部位の違いにより免疫細胞の動態が異なる事が明らかとなった。またそれぞれを構成する線維芽細胞が免疫細胞の遊走、分化、そしてがん細胞の増殖に与える影響が異なり、特異的なサイトカインの遺伝子発現が認められた。

本研究により、胃がん組織においては、胃がん細胞が存在する解剖学的な層の違いにより、それぞれの層において特異的な炎症環境が形成される事が明らかとなった。またその部位特異的な炎症環境の形成にそれぞれの線維芽細胞が関与する可能性が示唆された。

8. 総括

本研究において第一章では、胃癌細胞から分泌された HMGB1 が漿膜下層由来線維芽細胞に発現する TLR2/4 を介して炎症性サイトカインを発現誘導する事を明らかにした。また第二章では、胃癌組織中で、胃癌細胞が存在する解剖学的な部位の違いにより免疫細胞の動態が異なること、またその免疫細胞の遊走や分化、がん細胞の増殖に対して部位特異的な線維芽細胞が異なる影響を与えることを明らかにした。

つまり胃癌組織を構成する線維芽細胞は、他の免疫細胞と同様に炎症反応に関与する事が本研究によって示された。そして胃癌組織中では、胃癌細胞が存在する解剖学的な部位に依存した炎症環境が構築され、その炎症環境の構築に各部位の線維芽細胞が寄与することが明らかとなった。

「炎症反応」に関与する病態には、動脈硬化、急性腹膜炎、慢性関節リウマチ、がん、敗血症など多岐に渡る事が知られている。炎症反応によりもたらされる疾患は多岐に渡るものの、疾患ごとにおける炎症反応の違いは未だ明らかになっていない。現在、大腸菌やヘリコバクターピロリ菌などの LPS によってもたらされる急性腹膜炎は、セファマイシン系、 β ラクタマーゼ阻害薬、ペニシリン系などの抗菌剤が投与され、患者が死に至る確率は少ない。その反面、がん細胞によってもたらされる炎症反応の一つであるがん性腹膜炎は、発熱や疼痛に対しての対処療法しか無く、患者が死に至る確率が非常に高い。このように、がんと LPS でもたらされる炎症反応は「炎症反応」

と一括りにされているにも関わらず、患者の生死に与える影響は大きい。炎症性疾患ごとの違いは何か、またその炎症反応の場を構成する各種細胞がどのような働きをするか追求する事により、疾患ごとの治療法を創出する一助となると考える。また組織を主に構築する細胞は線維芽細胞であり、この線維芽細胞が多様な炎症性疾患の各病態に対してどのような影響を与えるか考察を深める必要がある。

9. 図表説明

表 1. 本研究で使⽤したがん細胞株と培地組成

表 2. 本研究で使⽤した HMGB1 における si-RNA 配列

表 3. 本研究で使⽤した抗体

表 4. 本研究で使⽤した定量的 RT-PCR(qRT-PCR)のプライマー配列

図 1. 胃がん組織中におけるヘマトキシリン-エオジン染色像

胃がん組織は、胃がん細胞(黒色で塗りつぶした場所)とその周囲を取り囲む間質細胞より構成される

図 2. 胃壁の構造および胃がん細胞の浸潤方法

A. 正常の胃壁

正常の胃壁は、ひだ状の構造を取る粘膜、粘膜下層、固有筋層、漿膜下層より構成される。

B. 胃がん細胞の浸潤方法

胃がん細胞は粘膜から発生し、粘膜、粘膜下層 (SM)、固有筋層(MP)、漿膜下層(SS) 層へと浸潤を来たす。

図 3. 胃がんの深達度別生存曲線

胃がんの深達度に伴う生存曲線を表す。2003 年から 2007 年 7 月までに国立がん研究センター東病院において胃がんの診断を受け、胃摘出術を受けた患者 899 症例を検討した。その中で粘膜下層にまで胃がん細胞が浸潤していた検体は 226 検体、漿膜下層まで浸潤していた検体は 73 症例である。漿膜下層まで浸潤していた検体では生存率の悪化が認められた。(青; 粘膜下層までの浸潤、緑; 漿膜下層までの浸潤)

図 4. 胃がん細胞における遺伝子変異

正常の胃粘膜からがん原遺伝子や細胞接着遺伝子などの変異や増幅の集積により胃がん細胞が生じる。

図 5. 胃がん細胞における HMGB1 発現と線維芽細胞における TLR2/4 発現

A. 胃がん細胞株 (HSC44PE、HSC60、MKN7)、大腸がん細胞株(DLD1、Caco2)、ヒ

ト由来線維芽細胞における *HMGB1* 遺伝子発現量

定量的 RT-PCR (qRT-PCR)法を用いて検討を行った。ヒト由来線維芽細胞と比較して、

がん細胞株において *HMGB1* 遺伝子発現量が高かった。(n=3)

B. 胃がん細胞株培養上清 (HSC44PE、HSC60、MKN7)、大腸がん細胞株培養上清 (DLD1、Caco2)、ヒト由来線維芽細胞培養上清における HMGB1 タンパク質量

細胞培養上清中の HMGB1 量をウェスタンブロット法により検討を行い、ポジティブコントロールとしてリコンビナント HMGB1 (rHMB1) を置いた。HMGB1 放出量が多い HMGB1-high 群(HSC44PE、DLD1)と HMGB1 放出量が少ない HMGB1-low 群(HSC60、MKN7、Caco2)に分かれた。

C. 胃がん細胞株 (HSC44PE、HSC60) における HMGB1 局在

免疫細胞化学染色法を用いて細胞内における HMGB1 の局在を検討した。HSC44PE (HMGB-high 群)では HMGB1 の局在が核と細胞質に認められた。HSC60 (HMGB1-low 群)では HMGB1 の局在が核にのみ認められた。(右; HSC60 細胞株、左; HSC44PE 細胞株)

D. ヒト由来線維芽細胞における *TLR2*, *TLR4* の遺伝子発現量

胃がん患者の非がん部より採取されたヒト漿膜下層由来線維芽細胞 4 検体において *TLR2*, *TLR4* の発現量を qRT-PCR 法により検討した。*TLR2* と *TLR4* の遺伝子発現は検体間で異なった。(n=4)

E. ヒト由来線維芽細胞における *TLR2*, *TLR4* のタンパク質発現量

胃癌患者の非がん部より採取されたヒト漿膜下層由来線維芽細胞 4 検体において TLR のタンパク質量を WB 法により検討した。#2 を除くヒト由来線維芽細胞において、TLR2 および TLR4 の発現が認められた。

図 6. リコンビナント HMGB1(rHMGB1)で刺激したヒト由来線維芽細胞における TLR 下流シグナル経路活性化

A. rHMGB1 で 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で刺激した線維芽細胞における炎症性サイトカイン (*IL1B*、*IL6*、*IL8*)の遺伝子発現量

rHMGB1 で刺激した線維芽細胞において、炎症性サイトカイン発現量を qRT-PCR で検討した。コントロール群として無血清 DMEM で刺激した線維芽細胞を置いた。*IL1B*、*IL6*、*IL8* の遺伝子発現量が rHMGB1 濃度依存的に増加した。(n=3)

B. rHMGB1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で刺激した線維芽細胞における IRAK4 リン酸化

rHMGB1 で刺激した線維芽細胞において TLR 下流シグナルである IRAK4 のリン酸化を WB 法により検討した。刺激 15 分後に IRAK4 のリン酸化が認められた。

C. rHMGB1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で刺激した線維芽細胞における NF- κ B 局在

rHMGB1 で刺激した線維芽細胞において TLR 下流シグナルである NF- κ B 局在を免疫蛍光細胞染色法により検討した。刺激 120 分後に線維芽細胞において NF- κ B 核内移行が認められた

図 7. ヒト胃癌細胞株培養上清で刺激したヒト由来線維芽細胞における TLR 下流シグナル経路活性化

A. ヒト胃癌細胞株培養上清 (HSC44PE、HSC60) で刺激した線維芽細胞における炎症性サイトカイン発現量

ヒト胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞における炎症性サイトカイン発現量を qRT-PCR により検討した。コントロール群として DMEM で刺激した線維芽細胞を置いた。HMGB1 分泌量が多い HSC44PE 培養上清では *IL1B*、*IL6*、*IL8* の発現量がコントロール群と比較して有意に高かった (n=3)。

B. ヒト胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞における IRAK4 リン酸化

ヒト胃癌細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞において TLR 下流シグナルである IRAK4 のリン酸化を WB 法により検討した。HMGB1 放出量が多い HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞では刺激後、15 分で IRAK4 のリン酸化が認められた。

C. HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞における NF- κ B 局在

HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞において TLR 下流シグナルである NF- κ B 局在を免疫蛍光細胞染色法により検討した。線維芽細胞において HSC44PE 刺激後、60 分で認められた。

D. siRNA-HMGB1 を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞における炎症性サイトカインの発現量

siRNA-control を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清(si-control)、siRNA-HMGB1 を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清(si-HMGB1)で刺激した線維芽細胞における炎症性サイトカイン発現量を qRT-PCR で検討した。siRNA-HMGB1 を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清は *IL1B*、*IL8* の遺伝子発現量を有意に抑制した。(n=3)

図 8. ヒト胃癌組織における HMGB1、NF-κB 発現と局在

A. 胃癌組織中の浸潤浅層部と浸潤深層部における胃癌細胞での HMGB1 発現と局在

胃癌細胞での HMGB1 発現と局在を免疫組織化学的染色法により検討した。HMGB1 の局在は、浅層部(shallow invasion)に存在する胃癌細胞においては細胞核に、深層部(deeper invasion)に存在する胃癌細胞においては細胞核と細胞質に認められた。

(n=20) スケールバー; 50 μm

B. 胃癌組織中での浸潤浅層部および浸潤深層部における胃癌細胞内での HMGB1 細胞質局在率

胃癌組織中の浅層部(shallow invasion)および深層部(deeper invasion)から 10 視野を無作為に抽出し、1 視野中 1000 個のがん細胞を数えた。そして細胞質に HMGB1 局在が認められる胃癌細胞の割合を算出した。HMGB1 の細胞質局在が浅層部(shallow invasion)と比較して、深層部(deeper invasion)で有意に高かった。(n=20)

C. 胃がん組織中での浸潤浅層部および深層部における線維芽細胞での NF- κ B 局在

胃がん組織中の浅層部(shallow invasion)および深層部(deeper invasion)から 10 視野を無作為に抽出し、1 視野中で線維芽細胞の個数を数えた。そしてその中で NF- κ B 核内局在が認められる線維芽細胞の個数をカウントし、NF- κ B 核内局在率を算出した。浅層部(shallow invasion)に存在する線維芽細胞と比較して、深層部(deeper invasion)に存在する線維芽細胞で NF- κ B 核内移行が認められた。矢印は、線維芽細胞における NF- κ B 核内移行を示す。(n=20) スケールバー; 50 μ m

図 9. ヒト胃がん組織における免疫細胞浸潤数

胃がん組織中で非がん部とがん部における免疫細胞浸潤数を各層で 5 視野ずつ、対物レンズ 40 倍によってカウントした。CD15 陽性細胞、CD56 陽性細胞以外の免疫細胞浸潤数は、どの層においても非がん部と比較してがん部で有意に多かった。がん部においては CD68 陽性細胞浸潤数が SS 層で、それ以外の免疫細胞浸潤数は SM 層で有意に多かった。(n=20)

CD4: ヘルパーT 細胞、CD8: キラーT 細胞、CD15: 好中球、CD20: B 細胞、CD56: ナチュラルキラーT 細胞、CD68: マクロファージ

SM; 粘膜下層、MP; 固有筋層、SS; 漿膜下層

図 10. ヒト胃がん組織における免疫組織化学染色像

CD4 陽性ヘルパーT 細胞、CD8 陽性キラーT 細胞、CD15 陽性好中球、CD20 陽性 B 細胞の各層(SM、MP、SS 層)における免疫組織化学染色像を示す。右下のスケールバーは 50 μ m を表す。

図 11. ヒト胃癌組織における M2 マクロファージの浸潤数および割合

A. ヒト胃癌組織中における M2 マクロファージの個数、割合

ヒト胃癌組織中でのがん部における M2 マクロファージ(CD204 陽性細胞)の個数および割合を算出した。割合は全マクロファージ数(CD68 陽性細胞数)に対する M2 マクロファージ数(CD204 陽性細胞数)によって算出した。SS 層において M2 マクロファージの浸潤数および割合が有意に高かった。(n=20)

B. ヒト胃癌部における CD204、CD68 陽性細胞の免疫組織化学染色像

ヒト胃癌組織中におけるがん部を CD68(マクロファージ)、CD204(M2 マクロファージ)に対する抗体で免疫組織化学染色した。上段が CD68 陽性マクロファージを、下段が CD204 陽性 M2 マクロファージを表す。がん部の SS 層において CD68 陽性マクロファージ、CD204 陽性 M2 マクロファージが多く認められた。スケールバー; 50 μ m

図 12. ヒト胃癌組織における alpha-SMA 陽性線維芽細胞面積

A. ヒト胃癌組織中における alpha-SMA 陽性線維芽細胞面積率

ヒト胃癌組織中における各層(SM、MP、SS層)での alpha-SMA 陽性線維芽細胞面積率を算出した。一視野中の全面積に対する alpha-SMA 陽性線維芽細胞面積の割合を算出した。SM 層と比較して SS 層において alpha-SMA 陽性線維芽細胞面積率が有意に高かった。(n=20)

B. ヒト胃癌部および非がん部における alpha-SMA 陽性線維芽細胞の免疫組織化学染色像

ヒト胃癌組織中における非がん部とがん部を alpha-SMA で免疫組織化学染色した。上段ががん部(cancer tissue)を、下段が非がん部(non-cancer tissue)を表す。非がん部に alpha-SMA 陽性を示す細胞は血管内皮細胞および平滑筋細胞である。非がん部と比較してがん部で alpha-SMA 陽性線維芽細胞が認められた。スケールバー; 50 μ m

図 13. 病理学的検討による胃癌組織の炎症環境

胃癌細胞の浸潤に伴い、粘膜下層(SM 層)は T リンパ球、B リンパ球、好中球が主体の炎症環境となり、漿膜下層(SS 層)は M2 マクロファージ主体の炎症環境となる。

図 14. HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞が免疫細胞に与える影響

A. HSC44PE 培養上清および DMEM で刺激した SMF および SSF 培養上清による THP1 細胞の分化能

各線維芽細胞培養上清で刺激した THP1 細胞における M2 マクロファージ分化関連遺伝子の発現を qRT-PCR で検討した。M2 マクロファージで発現が上昇する *IL10*、*Arginase1(Arg1)*、および発現が抑制される *IL12A*、*IL12B* の遺伝子発現量を検討した。HSC44PE で刺激した SSF 培養上清(HSC44PE-SSF)由来の THP1 において *IL10*、*Arg1* 発現が高く、*IL12A*、*IL12B* 発現が低かった(n=3)。

B. HSC44PE 培養上清および DMEM で刺激した SMF および SSF 培養上清による Jurkat 細胞の遊走能

各線維芽細胞培養上清で刺激した Jurkat 細胞における遊走能を migration assay 法で検討した。ポジティブコントロールとして DMEM(血清入り)を置き、血清入り DMEM で遊走した Jurkat 細胞数に対する各線維芽細胞培養上清中で遊走した Jurkat 細胞数から割合を算出した。HSC44PE 培養上清で刺激した SMF 培養上清(HSC44PE-SMF)由来の Jurkat 細胞において他の群と比較して遊走能が高かった(n=3)。

図 15. 生物学的解析による炎症環境

胃がん細胞で活性化された粘膜下層由来線維芽細胞(SMF)は、リンパ球の遊走に関与する。その一方、胃がん細胞で活性化された漿膜下層由来線維芽細胞(SSF)は、M2 マクロファージの分化に関与する

図 16. ヒト胃癌組織中において周囲の微小環境が胃癌細胞に与える影響

A. ヒト胃癌組織中での各層における胃癌細胞の割合

胃癌細胞の上皮マーカーである CK19 に対する抗体によって免疫組織化学染色を行った。1 視野中の面積に対する CK19 陽性胃癌細胞面積の割合を算出した。その結果、SM 層において、胃癌細胞の占有率が高かった(n=20)。

B. ヒト胃癌組織中での各層における CK19 陽性胃癌細胞の免疫組織化学染色像

ヒト胃癌組織中におけるがん部を CK19 で免疫組織化学染色を行った。SM 層において CK19 陽性胃癌細胞が多く認められた。スケールバー; 50 μ m

C. ヒト胃癌組織中での各層における胃癌細胞増殖の割合

胃癌細胞の増殖マーカーである Ki67 に対する抗体を用いて胃癌細胞の免疫組織化学染色を行った。1000 個の胃癌細胞に対する Ki67 核内陽性胃癌細胞個数をカウントし、Ki67 核内陽性率を算出した。Ki67 核内陽性率について SM 層と SS 層、SM 層と MP 層においてそれぞれ比較をした。SM 層では、SS 層($p < 0.01$)および MP 層($p < 0.05$)と比較して Ki67 核内陽性率が高かった(n=20)。

D. ヒト胃癌組織中での Ki67 陽性胃癌細胞の免疫組織化学染色像

ヒト胃癌組織中における胃癌細胞を増殖マーカーである Ki67 により免疫組織化学染色を行った。SS 層と比較して SM 層において Ki67 陽性胃癌細胞が多く認められた。スケールバー; 50 μ m

E. HSC44PE および DMEM で刺激した SMF および SSF 培養上清による HSC44PE の増殖曲線

各線維芽細胞培養上清で刺激した HSC44PE における細胞増殖能を WST-8 法で検討した。HSC44PE で刺激した SMF 培養上清(HSC44PE-SMF)で刺激した HSC44PE は他群と比較して有意に増殖能が高かった (n=3)。

図 17. 胃がん細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞での遺伝子発現解析

DMEM で刺激した線維芽細胞と比較して胃がん細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞で *Fold change*>2.0、*p 値*<0.05 の遺伝子群を抽出した。その抽出した因子で GO term 解析を行い、どのような遺伝子が多く含まれるか検討した。赤色で示す炎症に関連する GO term が上位 3 つを占めた。(n=3)

図 18. 胃がん細胞株 HSC44PE で刺激した SMF と SSF 間の炎症関連発現遺伝子解析 (教師付きクラスタリング解析)

A. 胃がん細胞株 HSC44PE で刺激した線維芽細胞におけるクラスタリング解析

DMEM-SMF、HSC44PE-SMF、DMSM-SSF、HSC44PE-SSF における 337 プローブ *immune system process* に関連する遺伝子群のクラスタリング解析を行った。遺伝子群は 5 つのグループに分かれ、また HSC44PE-SMF、HSC44PE-SSF で特異的に遺伝子発

現上昇する遺伝子が認められた。Color range は \log_2 をベースとして-2(緑)から 2(赤)とした。(n=3)

B. 胃癌細胞株 HSC44PE で刺激した線維芽細胞における各グループ遺伝子名

抽出した遺伝子は、再現性を高めるために *Raw 値* >500 となる遺伝子を抽出した。

各グループで特異的な遺伝子群が抽出できた。

図 19. 胃癌細胞株 HSC44PE 培養上清で刺激した SMF と SSF 間のサイトカイン、ケモカイン発現解析

A. cDNA マイクロアレイ解析によって HSC44PE 培養上清で刺激した SSF で特異的に発現が上昇したケモカイン、サイトカイン

HSC44PE 培養上清で刺激した SSF (HSC44PE-SSF)で特異的に発現が上昇したサイトカイン、ケモカイン(*Raw 値* >500)は 4 遺伝子認められ、M2 マクロファージの分化に関与する *CSF1*、*TGF B2* の 2 遺伝子が含まれていた。

B. cDNA マイクロアレイ解析によって HSC44PE 培養上清で刺激した SMF で特異的に発現が上昇したケモカイン、サイトカイン

HSC44PE 培養上清で刺激した SMF (HSC44PE-SMF)で特異的に発現が上昇したサイトカイン、ケモカイン(*Raw 値* >500)は 3 遺伝子認められた。リンパ球の遊走に関与する *IL1B*、*TNFSF15* の 2 遺伝子が含まれていた。

C. cDNA マイクロアレイ解析によって HSC44PE 培養上清で刺激した SMF および HSC44PE 培養上清で刺激した SSF 両者で共通して発現が上昇したケモカイン、サイトカイン

HSC44PE で刺激した SMF (HSC44PE-SMF) と HSC44PE で刺激した SSF (HSC44PE-SSF)両者で共通して発現が上昇したサイトカイン、ケモカイン(*Raw 値* >500)は 7 遺伝子認められた。

図 20. 胃がん細胞株 HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞における特定サイトカイン、ケモカイン発現解析

A. HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞における M2 マクロファージ分化関連遺伝子発現解析

HSC44PE 培養上清で刺激した SMF (HSC44PE-SMF)および SSF (HSC44PE-SSF)、DMEM で刺激した SMF (DMEM-SMF)および SSF (DMEM-SSF)を qRT-PCR にかけた。インナーコントロールとして *Gapdh* を用いた。HSC44PE-SSF において M2 マクロファージ分化に関与する *CSF1*、*TGF B2* の遺伝子発現量が有意に増加した(n=3)。

B. HSC44PE 培養上清で刺激した線維芽細胞におけるリンパ球遊走関連遺伝子発現解析

HSC44PE 培養上清で刺激した SMF (HSC44PE-SMF)および SSF (HSC44PE-SSF)、DMEM で刺激した SMF (DMEM-SMF)および SSF (DMEM-SSF)を qRT-PCR にかけた。

インナーコントロールとして *Gapdh* を用いた。HSC44PE-SMF においてリンパ球遊走に
関与する *IL1B*、*TNFSF15* の遺伝子発現量が有意に増加した(n=3)。

図 21. 胃がん組織中における炎症環境のまとめ

粘膜下層では、胃がん細胞からの刺激によって粘膜下層由来線維芽細胞が *IL1B*、
TNFSF15 を放出し、リンパ球の遊走が起こる。その一方で漿膜下層では、胃がん細胞
からの刺激によって漿膜下層由来線維芽細胞が *CSF1*、*TGF B 2* を放出し、M2 マクロ
ファージの分化が起こる。

図 22. DMEM で刺激した SMF と SSF 間の Receptor activity 遺伝子発現解析 (教師付き クラスタリング解析)

A.DMEM で刺激した線維芽細胞におけるクラスタリング解析

DMEM-SMF、DMSM-SSF における receptor activity 28 プローブに関連する遺伝子群の
クラスタリング解析を行った。DMEM-SMF 群で発現が高い 12 プローブ、DMEM-SSF
群で発現が高い 16 プローブの 2 グループに分かれた。Color range は log2 をベースと
して-1(緑)から 1(赤)とした。(n=3)

B.DMEM で刺激した線維芽細胞における各グループ遺伝子名

DMEM-SMF で特異的に発現が上昇する 11 遺伝子、DMEM-SSF で特異的に遺伝子発現が上昇する 14 遺伝子が認められた。Color range は 2 を底とする log 値-1 から 1 とした。

図 23. DMEM で刺激した SMF と SSF 間の Receptor activity 遺伝子

A. DMEM 刺激をした SMF (DMEM-SMF) で遺伝子発現が高い receptor activity 関連遺伝子

DMEM 刺激をした SSF (DMEM-SSF) と比較して DMEM で刺激した SMF (DMEM-SMF) において発現が 2 倍以上ある receptor activity を記した。Fold Change において昇順に並べた。

B. DMEM 刺激をした SSF (DMEM-SSF) で遺伝子発現が高い receptor activity 関連遺伝子

DMEM 刺激をした SMF と比較して DMEM で刺激した SSF において発現が 2 倍以上ある receptor activity を記した。Fold Change において昇順に並べた。

補足図 1. LPS で刺激した SMF と SSF における各種サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現

A. LPS で刺激をした線維芽細胞におけるサイトカイン、ケモカイン発現解析

(HSC44PE-SMF 高発現群)

HSC44PE 培養上清で刺激した SMF (HSC44PE-SMF)で遺伝子発現量が高かった 3 遺伝子 (*IL1B*, *TNFSF15*, *CCL13*)において検討をした。LPS で刺激をした SMF と比較して、LPS で刺激をした SSF において上記 3 遺伝子の発現量が高かった(n=3)。

B. LPS で刺激したサイトカイン、ケモカイン発現解析

(HSC44PE-SSF 高発現群)

HSC44PE 培養上清で刺激した SSF (HSC44PE-SSF)で遺伝子発現量が高かった 3 遺伝子(*CCL8*, *CXCL5*, *TGFβ2*)において検討をした。LPS で刺激をした SMF と比較して、LPS で刺激をした SSF において上記 3 遺伝子の発現量が高かった(n=3)。

補足図 2. si-HMGB1 を導入した HSC44PE 培養上清中の HMGB1 タンパク量

A. si-control2 種類、si-HMGB13 種類を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清中の HMGB1 量を検討した。48 時間後に si-HMGB1-47 を導入した HSC44PE 培養上清中の HMGB1 量が減少した。

B. WB の結果よりタンパク量を定量した。各時間において si-control-2 を遺伝子導入した HSC44PE 細胞株培養上清を 1 とした。si-HMGB1-47 を遺伝子導入した 48 時間後の HSC44PE 培養上清中における HMGB1 量が最も低かった。よってこの si-RNA を実験に使用した。

10. 参考文献

- [1] Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 839-49.
- [2] Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014; 211: 1503-23.
- [3] Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2014; 6: 1670-90.
- [4] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004; 432: 332-7.
- [5] 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: 335-48.
- [6] Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J, Kerbel RS. FIBROBLAST CELL-INTERACTIONS WITH HUMAN-MELANOMA CELLS AFFECT TUMOR-CELL GROWTH AS A FUNCTION OF TUMOR PROGRESSION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88: 6028-32.
- [7] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986; 315: 1650-9.
- [8] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420: 860-7.

- [9] Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 1073-81.
- [10] Szczepanik AM, Scislo L, Scully T, et al. IL-6 serum levels predict postoperative morbidity in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2011; 14: 266-73.
- [11] Chang WJ, Du Y, Zhao X, Ma LY, Cao GW. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 4586-96.
- [12] Martin P. Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276: 75-81.
- [13] Hoshino A, Ishii G, Ito T, et al. Podoplanin-Positive Fibroblasts Enhance Lung Adenocarcinoma Tumor Formation: Podoplanin in Fibroblast Functions for Tumor Progression. *Cancer Research*. 2011; 71: 4769-79.
- [14] Ito S, Ishii G, Hoshino A, et al. Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 422: 194-9.
- [15] Nagatsuma AK, Aizawa M, Kuwata T, et al. Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer*. 2015; 18: 227-38.
- [16] Fu DG. Epigenetic alterations in gastric cancer (Review). *Mol Med Rep*. 2015; 12:

3223-30.

[17] Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 2979-90.

[18] Yanagihara K, Tanaka H, Takigahira M, et al. Establishment of two cell lines from human gastric scirrhus carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. *Cancer Science*. 2004; 95: 575-82.

[19] Ramires M, David L, Leitão D, Seixas M, Sansonetty F, Sobrinho-Simões M. Ki67 labelling index in gastric carcinomas. An immunohistochemical study using double staining for the evaluation of the proliferative activity of diffuse-type carcinomas. *J Pathol*. 1997; 182: 62-7.

[20] Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends in Immunology*. 2005; 26: 381-7.

[21] Tang D, Kang R, Zeh HJ, III, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gen Regulatory Mechanisms*. 2010; 1799: 131-40.

[22] Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *Journal of Internal Medicine*. 2004; 255: 344-50.

[23] Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006; 17: 189-201.

[24] Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and

sepsis. *Journal of Internal Medicine*. 2004; 255: 320-31.

[25] Sun N-K, Chao CCK. The cytokine activity of HMGB1--extracellular escape of the nuclear protein. *Chang Gung medical journal*. 2005; 28: 673-82.

[26] Winter N, Meyer A, Richter A, Krisponeit D, Bullerdiek J. Elevated Levels of HMGB1 in Cancerous and Inflammatory Effusions. *Anticancer Research*. 2009; 29: 5013-7.

[27] Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, et al. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *Journal of Pathology*. 2002; 196: 163-70.

[28] Zhang J, Zhu J-S, Zhou Z, Chen W-X, Chen N-W. Inhibitory effects of ethyl pyruvate administration on human gastric cancer growth via regulation of the HMGB1-RAGE and Akt pathways in vitro and in vivo. *Oncology Reports*. 2012; 27: 1511-9.

[29] Tang DL, Kang R, Zeh HJ, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*. 2010; 1799: 131-40.

[30] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 499-511.

[31] Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010; 140: 805-20.

[32] Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008: 111-27.

- [33] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- [34] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 392-401.
- [35] Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp (vol 33, pg 1183, 2007). *Journal of Endodontics*. 2007; 33: 1403-4.
- [36] Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanishi T, Matsuo T. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in Pulp Fibroblasts. *Journal of Dental Research*. 2009; 88: 762-7.
- [37] Sarah SM, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresh R. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2006; 17: 114-6.
- [38] Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, Chieda K, Watanabe K. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *Journal of Endodontics*. 2007; 33: 1183-6.
- [39] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: 539-45.
- [40] Candido J, Hagemann T. Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology*. 2013; 33: S79-S84.
- [41] Orlova VV, Choi EY, Xie C, et al. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J*. 2007; 26: 1129-39.
- [42] Park JS, Svetkauskaite D, He QB, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in

cellular activation by high mobility group box 1 protein. *Journal of Biological Chemistry*.

2004; 279: 7370-7.

[43] Kang HJ, Lee H, Choi H-J, et al. Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers. *Laboratory Investigation*. 2009; 89: 948-59.

[44] Ugrinova I, Mitkova E, Moskalenko C, Pashev I, Pasheva E. DNA bending versus DNA end joining activity of HMGB1 protein is modulated in vitro by acetylation. *Biochemistry*. 2007; 46: 2111-7.

[45] Yang H, Ochani M, Li JH, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101: 296-301.

[46] Li JH, Wang HC, Mason JM, et al. Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *Journal of Immunological Methods*. 2004; 289: 211-23.

[47] Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, et al. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*. 2009; 124: 853-61.

[48] Rubie C, Frick VO, Pfeil S, et al. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13: 4996-5002.

[49] Higuchi Y, Kojima M, Ishii G, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiai A. Gastrointestinal

Fibroblasts Have Specialized, Diverse Transcriptional Phenotypes: A Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Fibroblasts. *PLoS One*. 2015; 10: e0129241.

[50] Kojima M, Higuchi Y, Yokota M, et al. Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. *PLoS One*. 2014; 9: e88018.

[51] Abe A, Kuwata T, Yamauchi C, Higuchi Y, Ochiai A. High Mobility Group Box1 (HMGB1) released from cancer cells induces the expression of pro-inflammatory cytokines in peritoneal fibroblasts. *Pathol Int*. 2014; 64: 267-75.

[52] 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: 719-34.

[53] McGettrick HM, Buckley CD, Filer A, Rainger GE, Nash GB. Stromal cells differentially regulate neutrophil and lymphocyte recruitment through the endothelium. *Immunology*. 2010; 131: 357-70.

[54] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140: 883-99.

[55] Bohlon SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014; 5: 402.

[56] Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages

(TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009; 86: 1065-73.

[57] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-55.

[58] Zhang Z, Li LY. TNFSF15 Modulates Neovascularization and Inflammation. *Cancer Microenviron.* 2012; 5: 237-47.

[59] Ben-Sasson SZ, Wang K, Cohen J, Paul WE. IL-1 β strikingly enhances antigen-driven CD4 and CD8 T-cell responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2013; 78: 117-24.

[60] Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 4560-5.

[61] Zhai Y, Yu J, Iruela-Arispe L, et al. Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEGI, a novel cytokine of the TNF superfamily. *Int J Cancer.* 1999; 82: 131-6.

[62] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005; 446: 475-82.

[63] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal

transition. *Cell Res.* 2009; 19: 156-72.

[64] Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 149185.

[65] Zhang H, Liu L, Wang Y, et al. KLF8 involves in TGF-beta-induced EMT and promotes invasion and migration in gastric cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013; 139: 1033-42.

[66] Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66: 1403-8.

[67] Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29: 709-22.

[68] Otomo R, Otsubo C, Matsushima-Hibiya Y, et al. TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 18691-6.

[69] Knoblich K, Wang HX, Sharma C, Fletcher AL, Turley SJ, Hemler ME. Tetraspanin TSPAN12 regulates tumor growth and metastasis and inhibits β -catenin degradation. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71: 1305-14.

[70] Franco M, Muratori C, Corso S, et al. The tetraspanin CD151 is required for Met-dependent signaling and tumor cell growth. *J Biol Chem.* 2010; 285: 38756-64.

- [71] Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14: 49-60.
- [72] Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003; 116: 217-24.
- [73] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009; 19: 156-72.
- [74] Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004; 18: 816-27.
- [75] Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, et al. Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS One*. 2013; 8: e80604.
- [76] Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, et al. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2014; 15: 571-9.
- [77] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013; 504: 446-50.
- [78] Ishii G, Hashimoto H, Asada K, et al. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts. *Int J Oncol*. 2010; 37: 317-25.
- [79] Mann J, Chu DC, Maxwell A, et al. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*. 2010; 138: 705-14,

14.e1-4.

- 1* 国立研究開発法人 国立がん研究センター がん対策情報センター (2015)
がん情報サービス 「胃がん」

[online] http://ganjoho.jp/public/cancer/stomach/treatment_option.html
- 2* ワインバーク, A 訳; 武藤誠、青木正博 (2010) 「がんの生物学」 南江堂
- 3* 尾畑佑樹 (2014) 「腸内細菌によるエピゲノム修飾を介した腸管免疫制御メカニズムの解明」 『千葉医学』 90. pp.165-170
- 4* Peter Parham 監訳; 笹月健彦 (2010) 「エッセンシャル免疫学」 メディカルサイエンス・インターナショナル

11. 謝辞

本研究を行うにあたり、5年間にわたり熱心な御指導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先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野長 落合淳志教授に御礼申し上げます。叱咤激励を繰り返しながら、研究者としての心構えを教授してくださいました。研究や発表に際し、多くの時間を割いての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先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野 柳原吾吉先生、永妻晶子先生に深謝致します。

研究面のみならず、生活面でも支えて頂きました鳩貝健先生、中村優香様に深くお礼申し上げます。挫けそうな時は励まし、嬉しい時は共に喜んで下さいました。

5年間の研究そして日常生活でも苦楽を共にした 博士課程3年樋口洋一様にお礼申し上げます。良きライバルであり、良き仲間であり、切磋琢磨して成長できたと思っております。次の目標に向けて、飛躍して行きたいと思っております。

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先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野 石井源一郎先生、桑田健先生、藤井誠志先生、光永修一先生、小嶋基寛先生、菅野雅人先生、山内稚佐子先生、須崎資子様、大沼世史子様に御礼申し上げます。

5年間、決して平坦な道のりではありませんでしたが、大きく成長出来た5年間でした。この知識を次のステップへと繋げて行こうと思っております。

12.図表

細胞名	細胞種	培地組成
HSC44PE	ヒトスキルス胃癌細胞株	89% RPMI 1640 medium 10% FBS 1% penicillin/Streptomycin
HSC60	ヒトスキルス胃癌細胞株	
MKN7	ヒト高分化胃管状腺がん細胞株	89% DMEM 10% FBS 1% penicillin/Streptomycin
Caco2	ヒト結腸癌細胞株	
DLD1	ヒト結腸腺癌細胞株	

表1. 本研究で使用した細胞株と培地組成

種類	生物種	配列 (5'-3')	
HMGB1-45	ヒト	Sense	GGAUUAUUAGAAUCAAAACAtt
		Antisense	UGUUUGAUUCUAAUAAUCCca
HMGB1-46	ヒト	Sense	CUUUCAUAUAGUUAGCUAAtt
		Antisense	UUAGCUAACUAUAUGAAAGga
HMGB1-47	ヒト	Sense	AGAUAGUUUUCAUCCAUAAtt
		Antisense	UUAUGGAUGAAAACUAUCUca

表2. 本研究で使用したHMGB1におけるsi-RNA配列

マーカー	抗体種類	クローン	カタログ番号	会社	希釈倍率	抗原賦活化液
CD4	Mouse-monoclonal-antibody	BC/1F6	GR113578-2	Abcam	1:50	pH=9
CD8	Mouse-monoclonal-antibody	C8/144B	IS623	DAKO	希釈済	pH=6
CD15	Mouse-monoclonal-antibody	C3D-1	M0733	DAKO	1:50	pH=6
CD20	Mouse-monoclonal-antibody	L26	GR130719-1	Abcam	1:50	pH=6
CD56	Mouse-monoclonal-antibody	123C3	M7304	DAKO	1:50	pH=9
CD68	Mouse-monoclonal-antibody	PG-M1	M0876	DAKO	1:100	pH=6
CD204	Mouse-monoclonal-antibody	MSR-A	TG280512	Trans Genic Inc.	1:100	pH=6
alpha-SMA	Mouse-monoclonal-antibody	1A4	M0851	DAKO	1:100	pH=6
Ki67	Mouse-monoclonal-antibody	MIB-1	M7240	DAKO	1:100	pH=6
HMGB 1	Rabbit-polyclonal-antibody	-	ab18256	Abcam	1:1000	pH=6

表3. 本研究で使用した抗体

プライマー名	生物種	配列 (5'-3')	
TLR2	ヒト	Forward	CAGGGAGCTCTTAGTGACCAAGTGAA
		Reverse	CACAAAGTATGTGGCATTGTCCAG
TLR4	ヒト	Forward	AGGATGATGCCAGGATGATGTC
		Reverse	TCAGGTCCAGGTTCTTGGTTGAG
HMGB1	ヒト	Forward	AGGATCCCAATGCACCCAAG
		Reverse	CGCAACATCACCAATGGACAG
IL1B	ヒト	Forward	CCAGGGACAGGATATGGAGCA
		Reverse	TTCAACACGCAGGACAGGTACAG
IL6	ヒト	Forward	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA
		Reverse	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
IL8	ヒト	Forward	ACACTGCGCCAACACAGAAATTA
		Reverse	TTTGCTTGAAGTTTCACTGGCATC
IL10	ヒト	Forward	GAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGA
		Reverse	AAGGCTTGCAACCCAGGTA
IL12A	ヒト	Forward	AGGAATGTTCCCATGCCTTCA
		Reverse	CCAATGGTAAACAGGCCTCCAC
IL12B	ヒト	Forward	TGTCACCAGCAGTTGGTCATCTC
		Reverse	CTCACTGCTCTGGTCCAAGGTC
Arg1	ヒト	Forward	TCCCTGTATATCTGCCAAGGATATT
		Reverse	TTCCTAGTCTGTCCACTTCAGTCAT
CSF1	ヒト	Forward	TAGCCACATGATTGGGAGTGGA
		Reverse	CTCAAATGTAATTTGGCACGAGGTC
TGFB2	ヒト	Forward	GTGCTTTGGATGCGGCCTA
		Reverse	GGCATGCTCCAGCACAGAA
TNFSF15	ヒト	Forward	TAAGCCAAGGGCACACCTGA
		Reverse	GAATGTGACCTGGGAGTAAATGAA
GAPDH	ヒト	Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
		Reverse	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT

表4. 本研究使用した定量的RT-PCR(qRT-PCR)プライマー配列

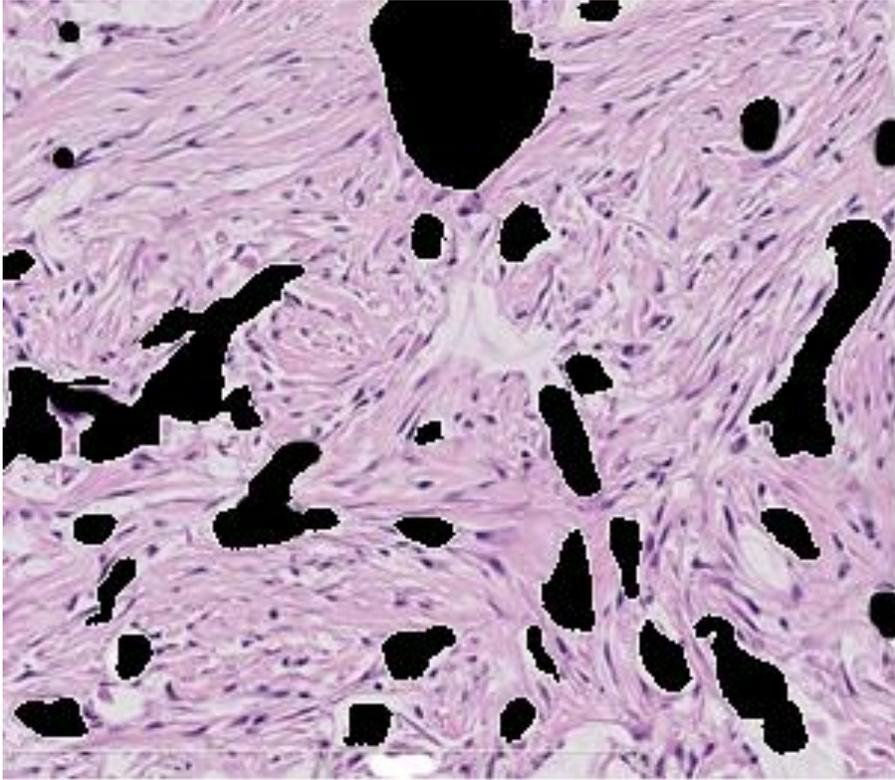


図1. 胃がん組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色像

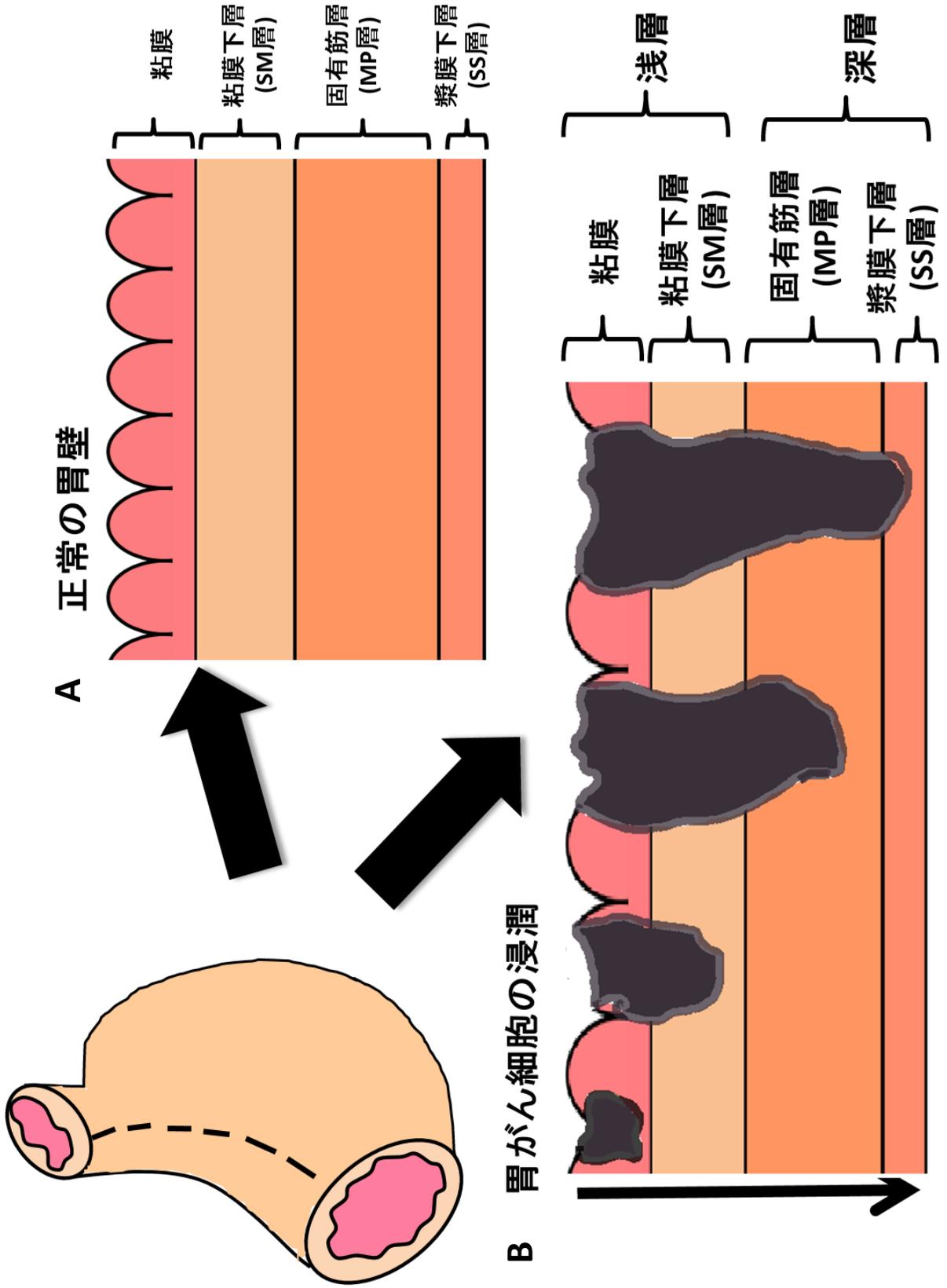


図2. 胃壁の構造および胃がんの浸潤方法

生存関数

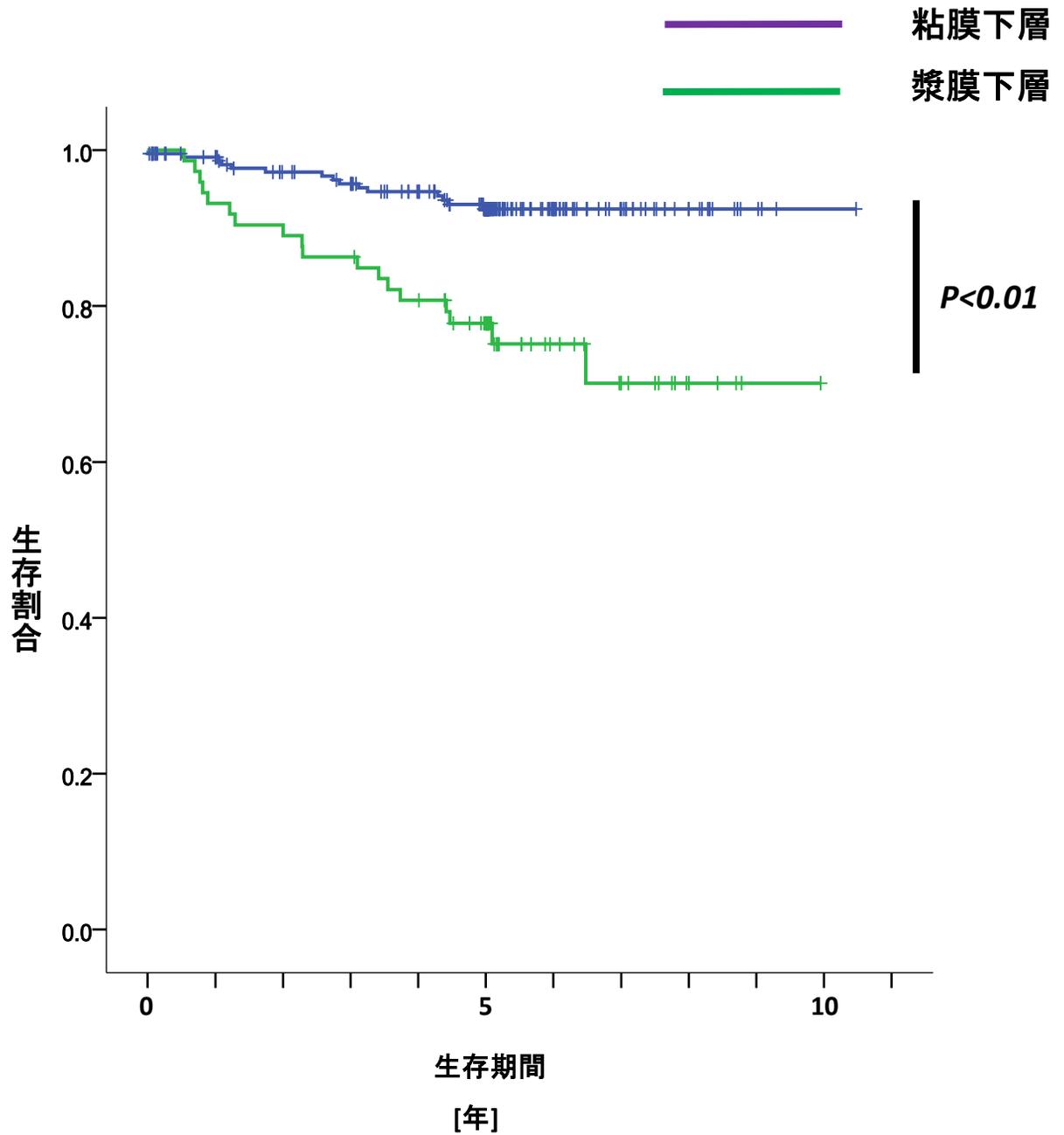


図3. 胃がんの深達度別生存曲線

正常
胃粘膜



がん抑制遺伝子 p53 変異
細胞不死化遺伝子 hTERT 活性化
細胞接着遺伝子 E-cadherin 変異
がん原遺伝子 c-Met 増幅
がん抑制遺伝子 RUNX3 抑制
がん遺伝子 K-SAM 増幅

胃がん

図4. 胃がん細胞における遺伝子変異

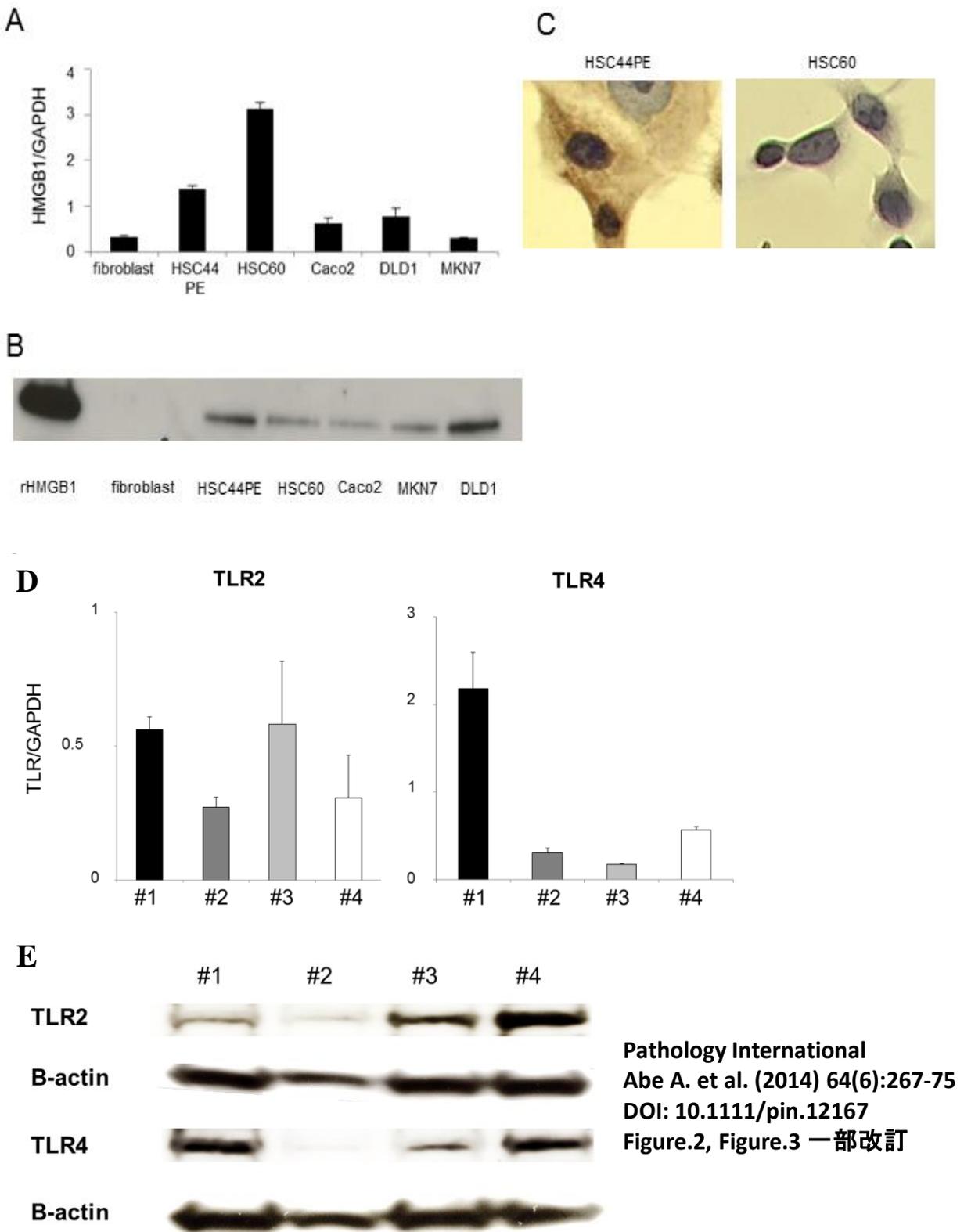
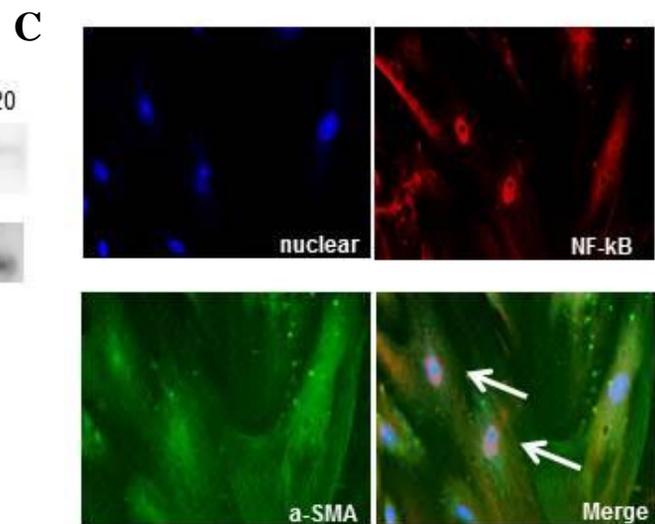
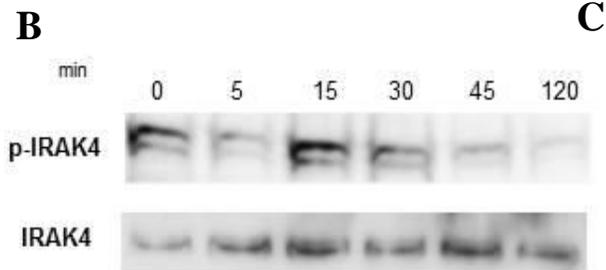
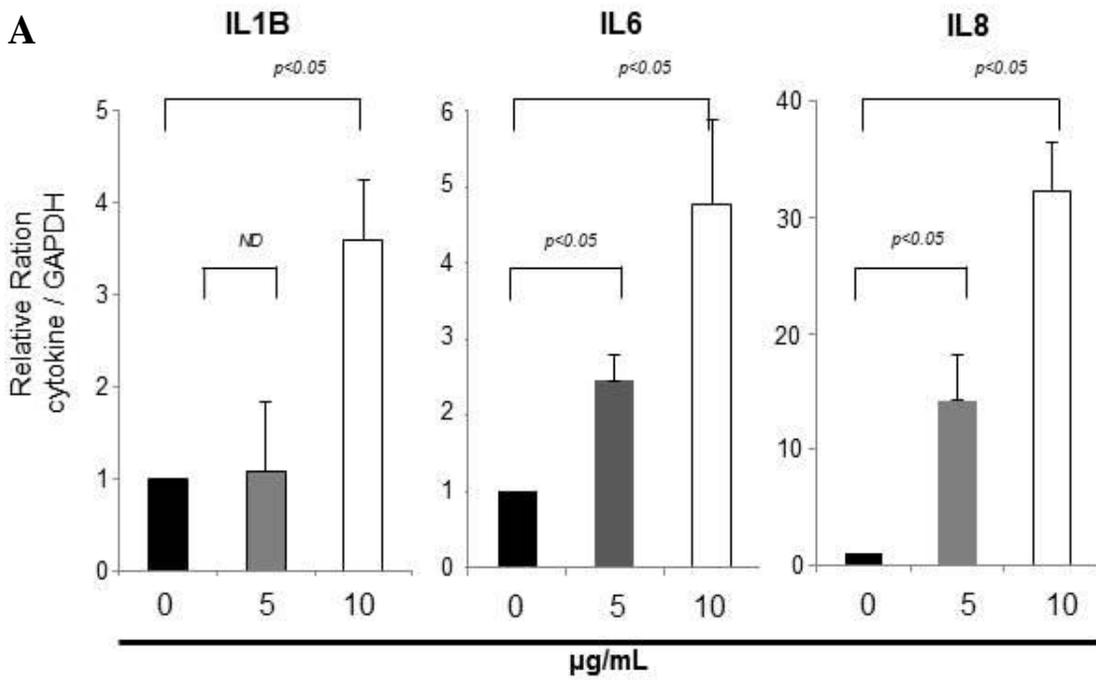
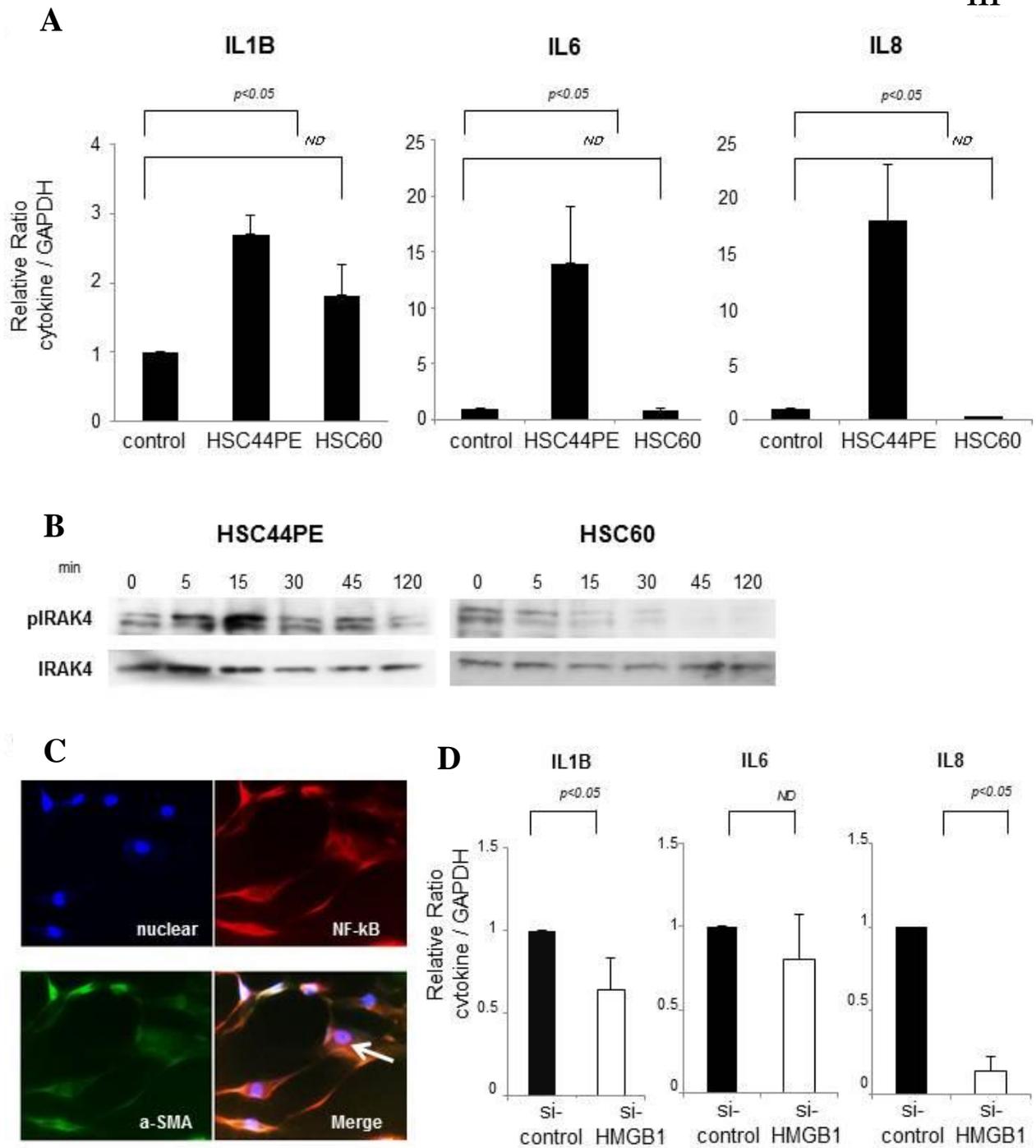


図5. 胃がん細胞におけるHMGB1発現と線維芽細胞におけるTLR2/4発現



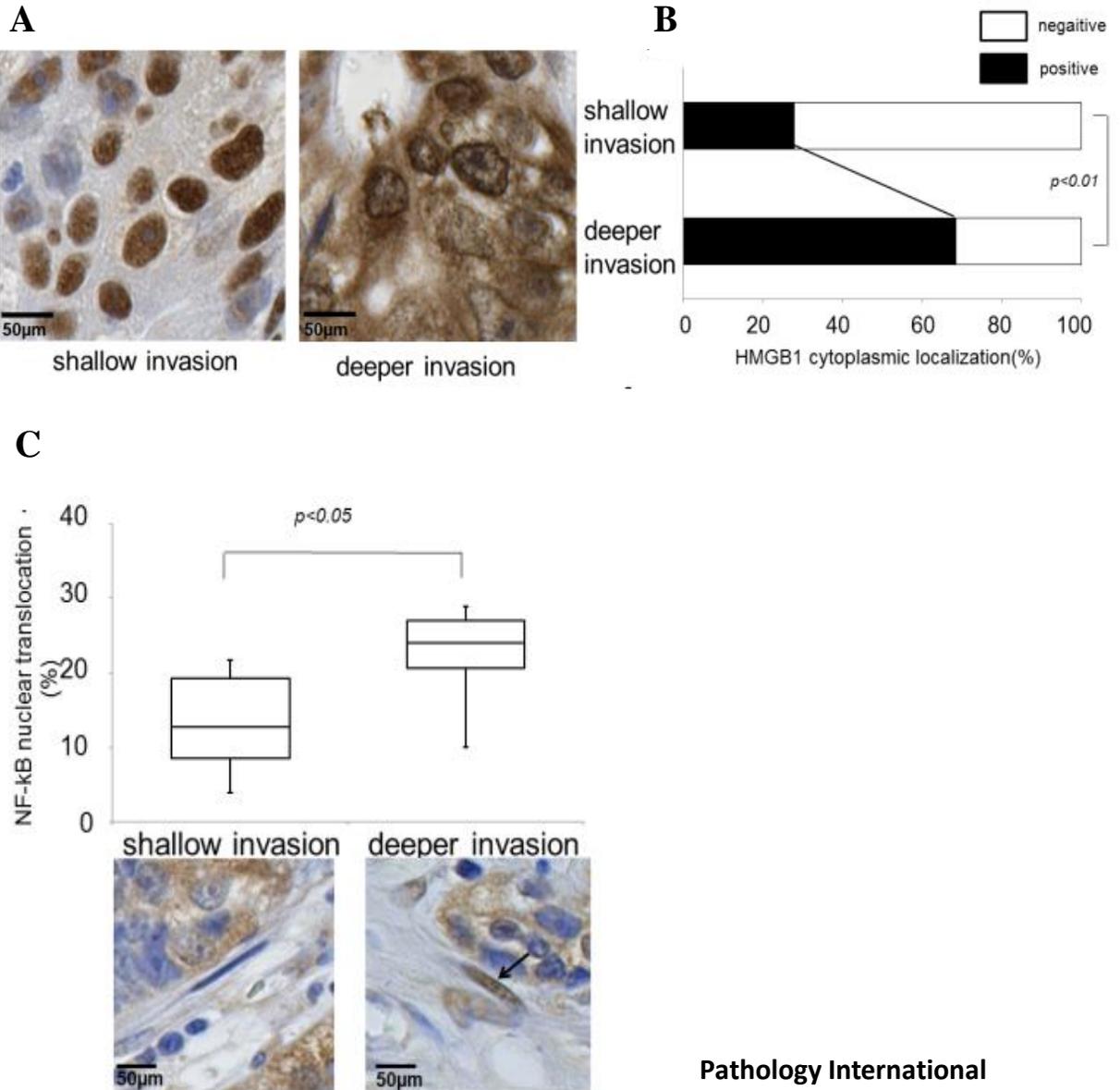
Pathology International
 Abe A. et al. (2014) 64(6):267-75
 DOI: 10.1111/pin.12167
 Figure.4

図6. リコンビナントHMGB1で刺激したヒト由来線維芽細胞におけるTLR下流シグナル経路活性化



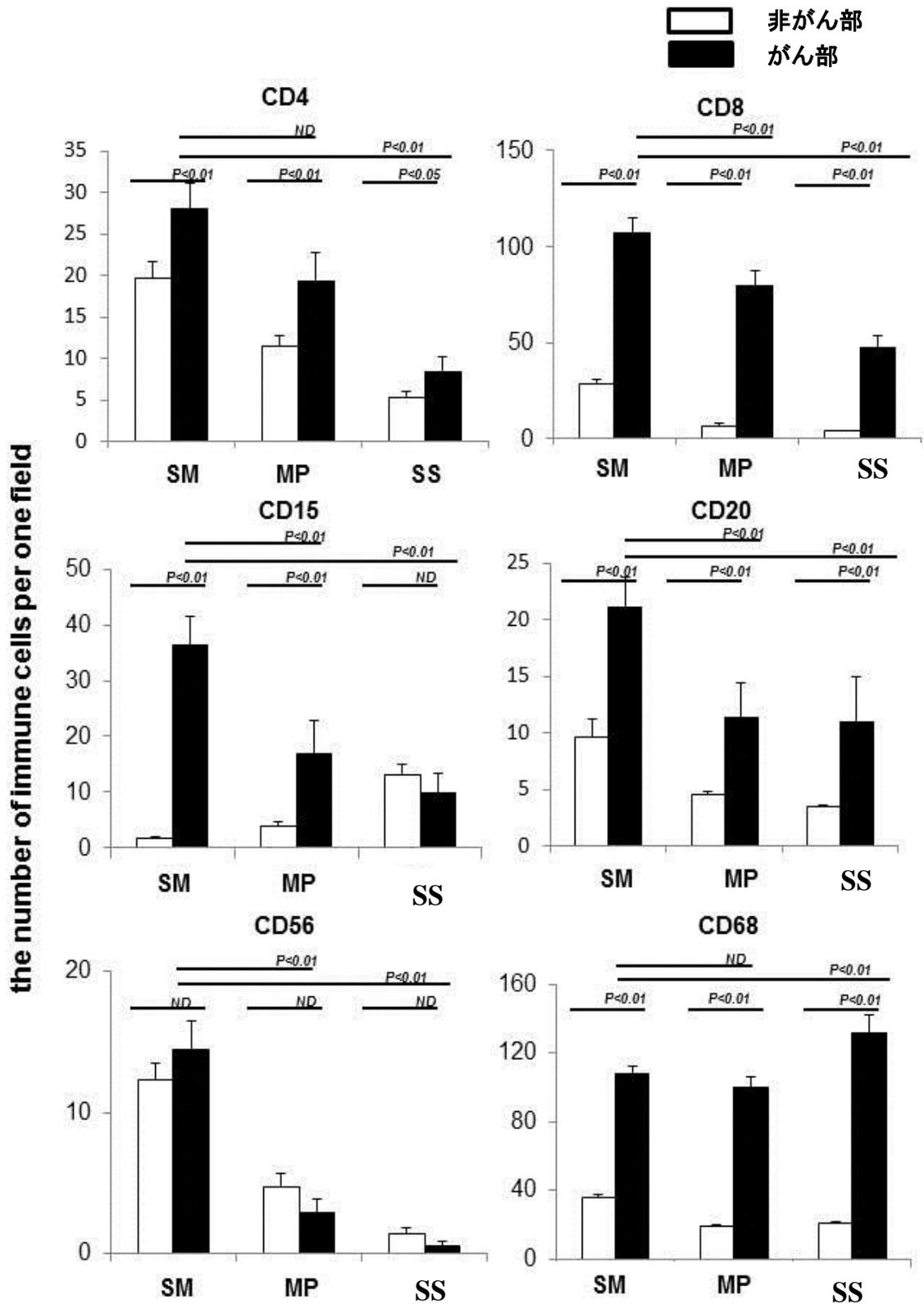
Pathology International
 Abe A. et al. (2014) 64(6):267-75
 DOI: 10.1111/pin.12167
 Figure.5

図7. ヒト胃がん細胞株培養上清で刺激したヒト由来線維芽細胞
 におけるTLR下流シグナル経路活性化



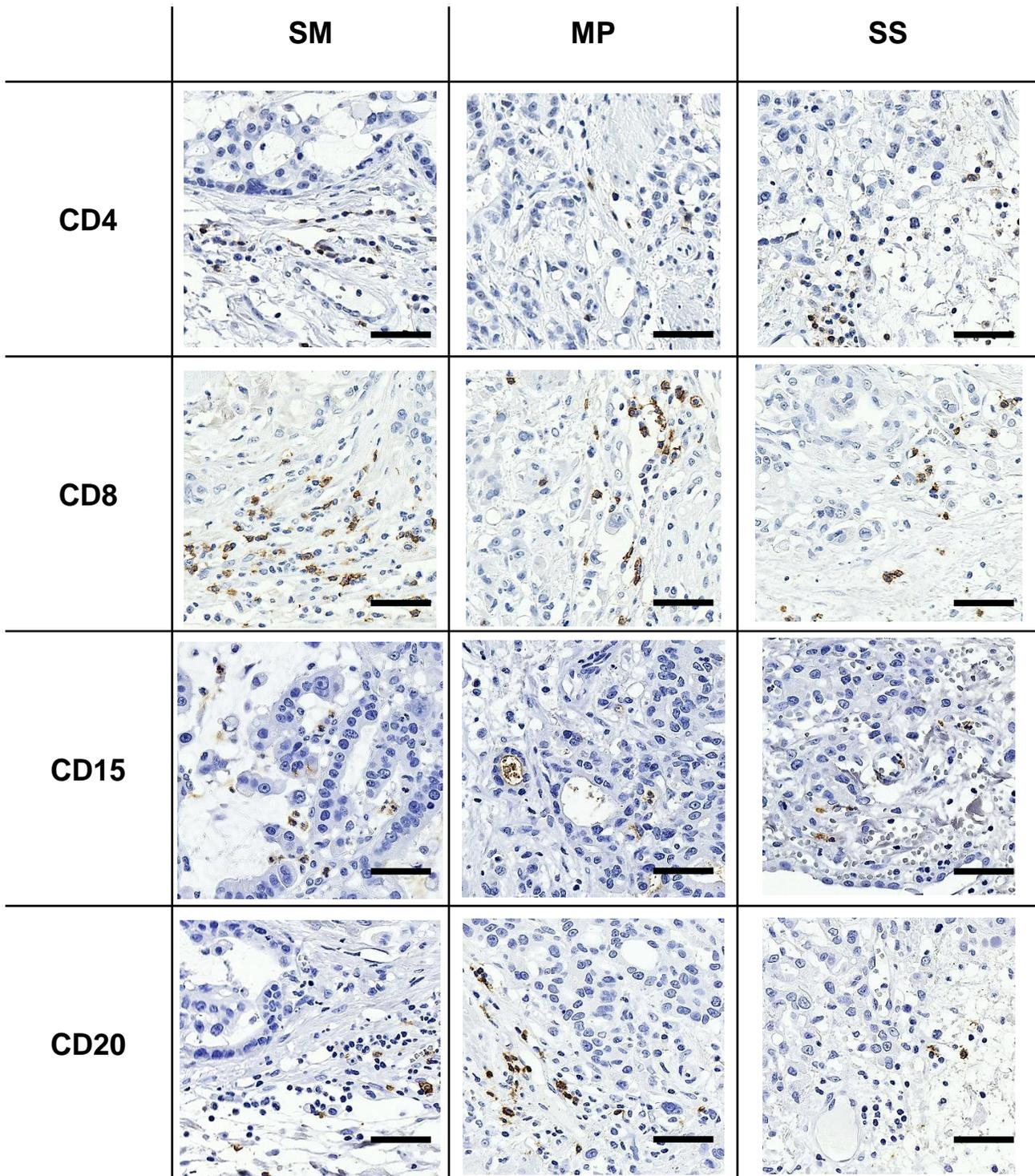
Pathology International
 Abe A. et al. (2014) 64(6):267-75
 DOI: 10.1111/pin.12167
 Figure.1 一部改訂

図8. ヒト胃がん組織におけるHMGB1、NF- κ Bの発現と局在



Gastric Cancer
 Abe A. et al.
 DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y
 Figure.1

図9. ヒト胃がん組織における免疫細胞浸潤数



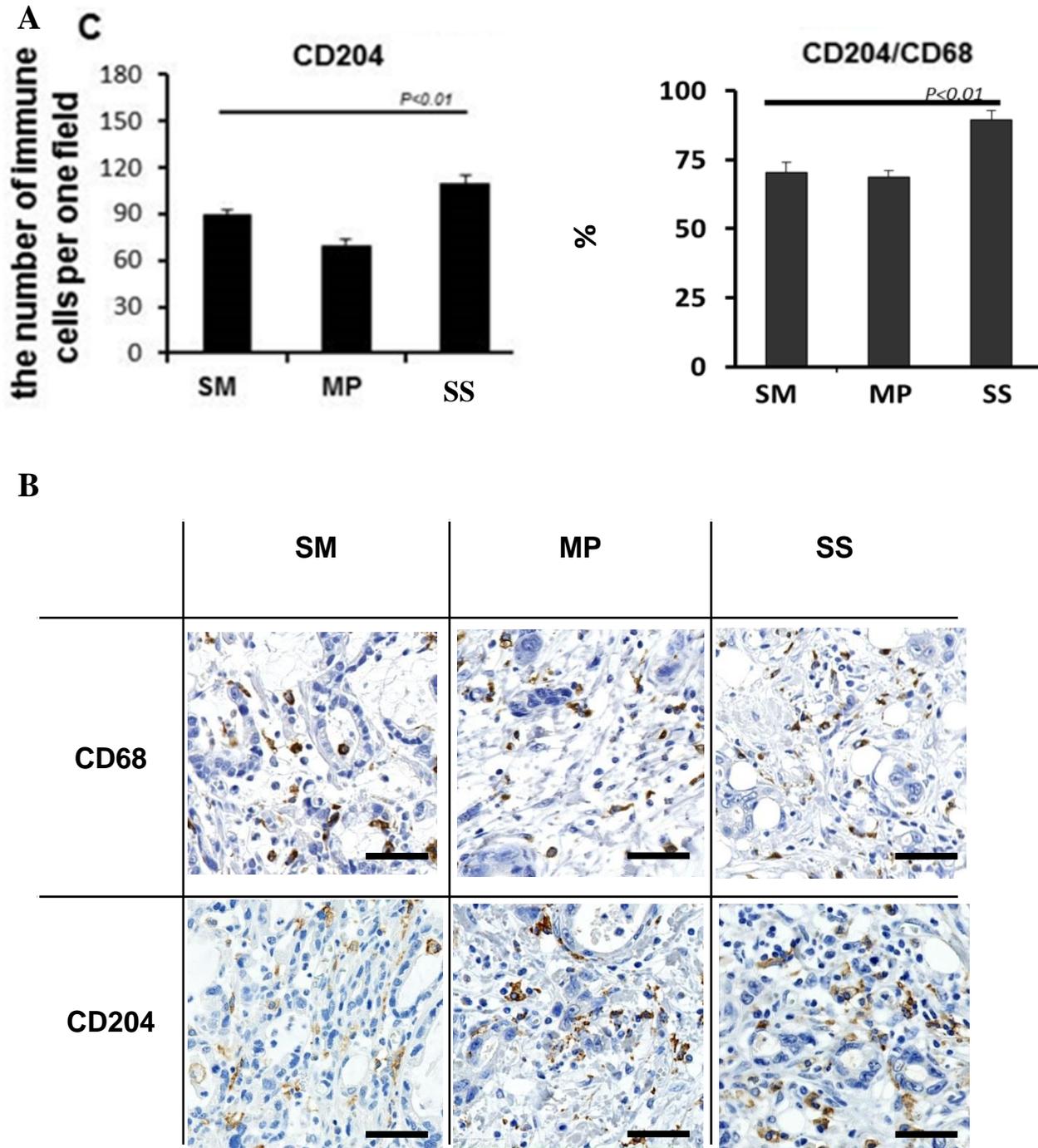
Gastric Cancer

Abe A. et al.

DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y

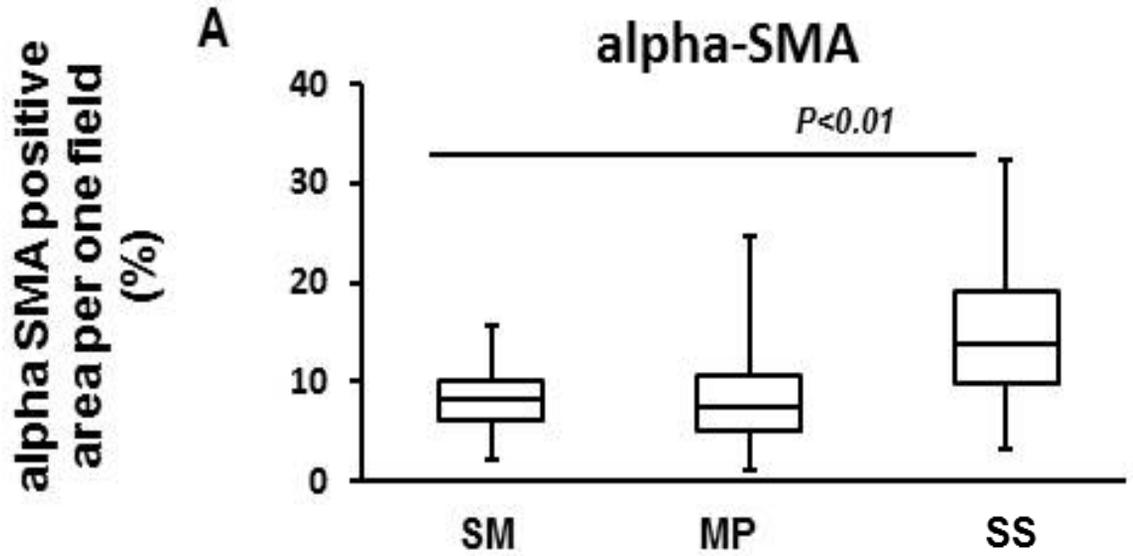
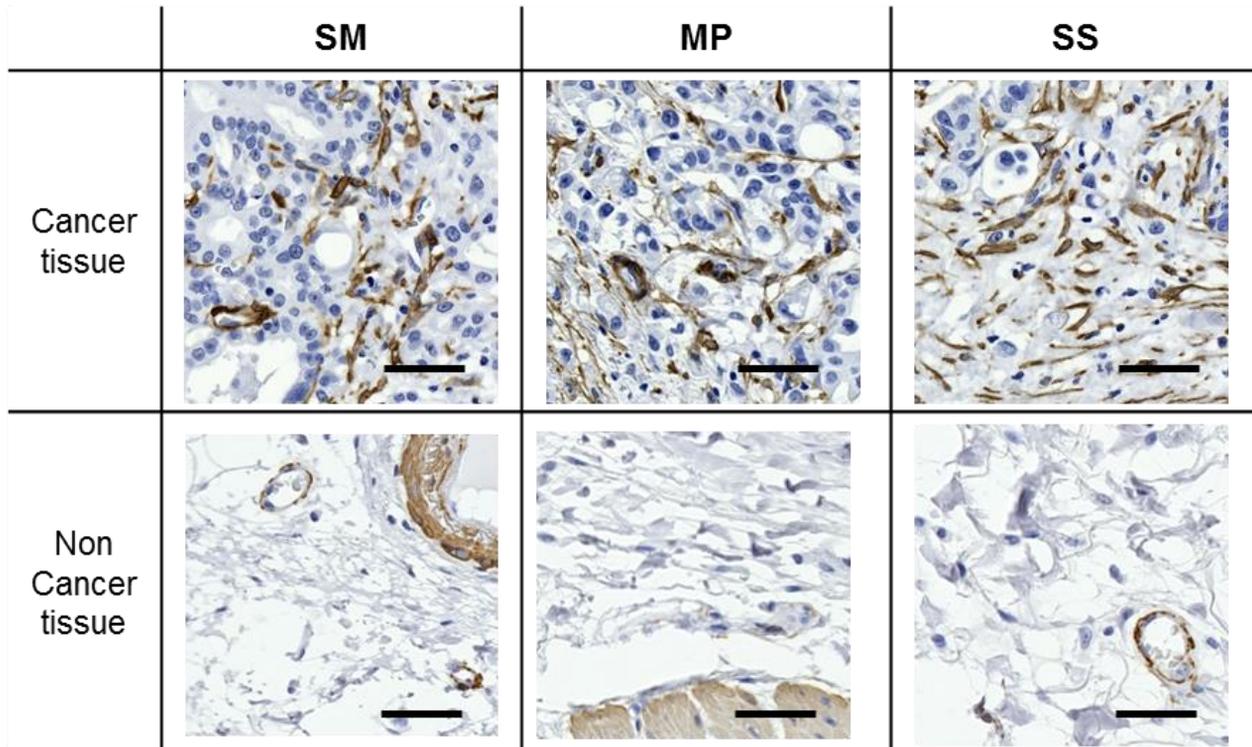
Supplementary Figure.1

図10. ヒト胃癌組織における免疫組織化学染色像



Gastric Cancer
 Abe A. et al. In press
 Figure.2

図11. ヒト胃がん組織におけるM2マクロファージの個数および割合

**B**

Gastric Cancer

Abe A. et al.

DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y

Figure.2

図12. ヒト胃がん組織中におけるalpha-SMA陽性線維芽細胞面積

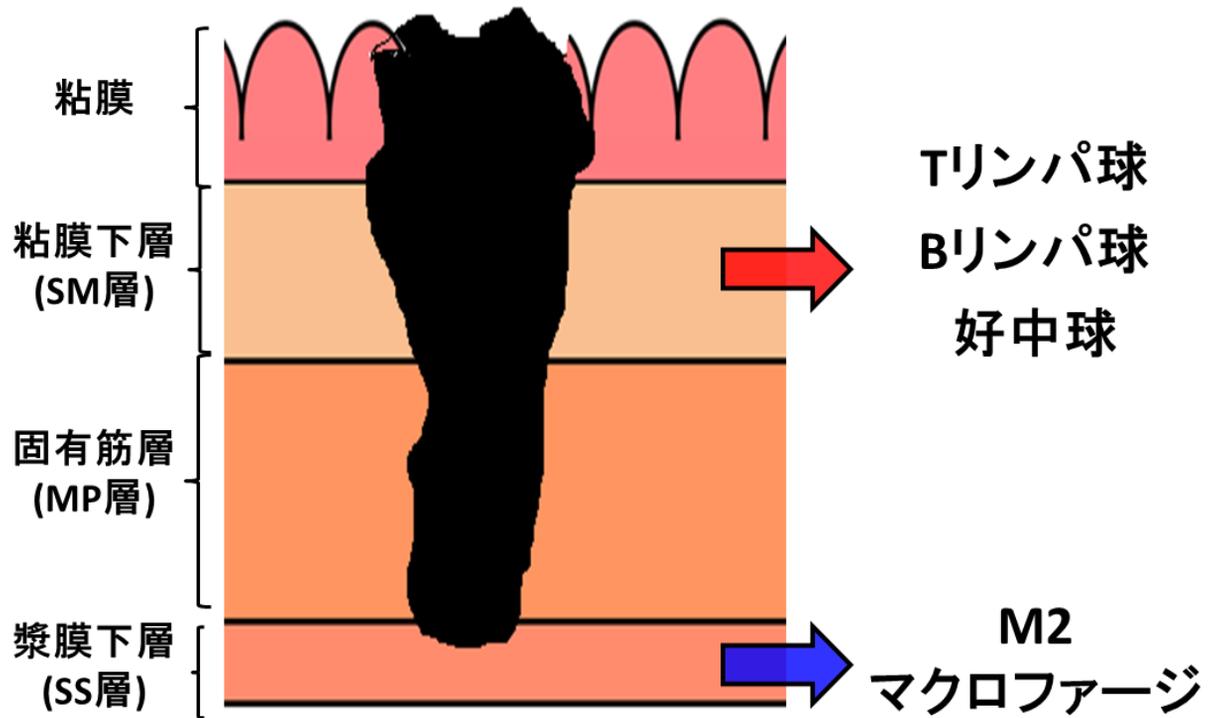


図13. 病理学的検討による胃がん組織の炎症環境

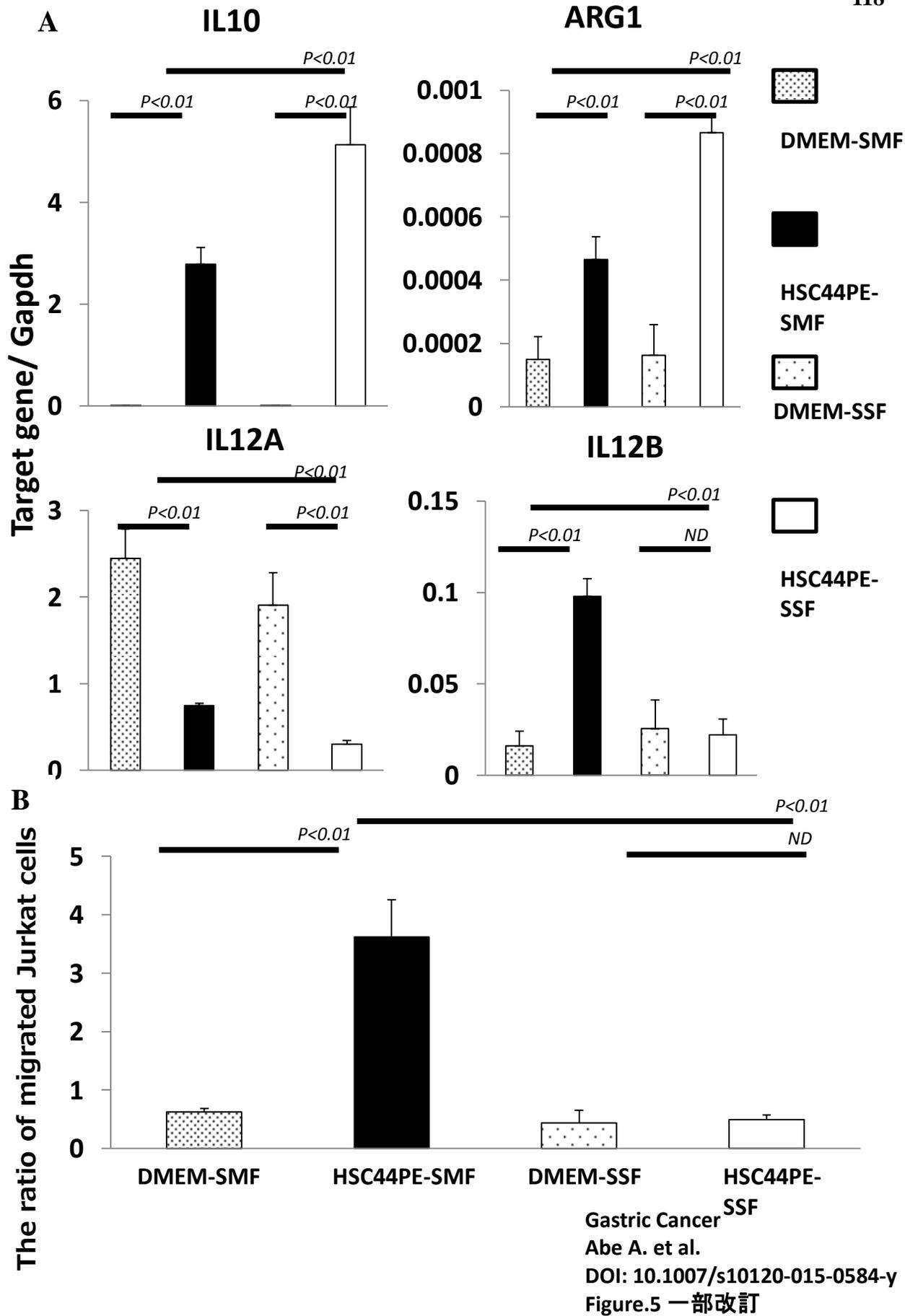


図14. HSC44PE培養上清で刺激した線維芽細胞が免疫細胞に与える影響

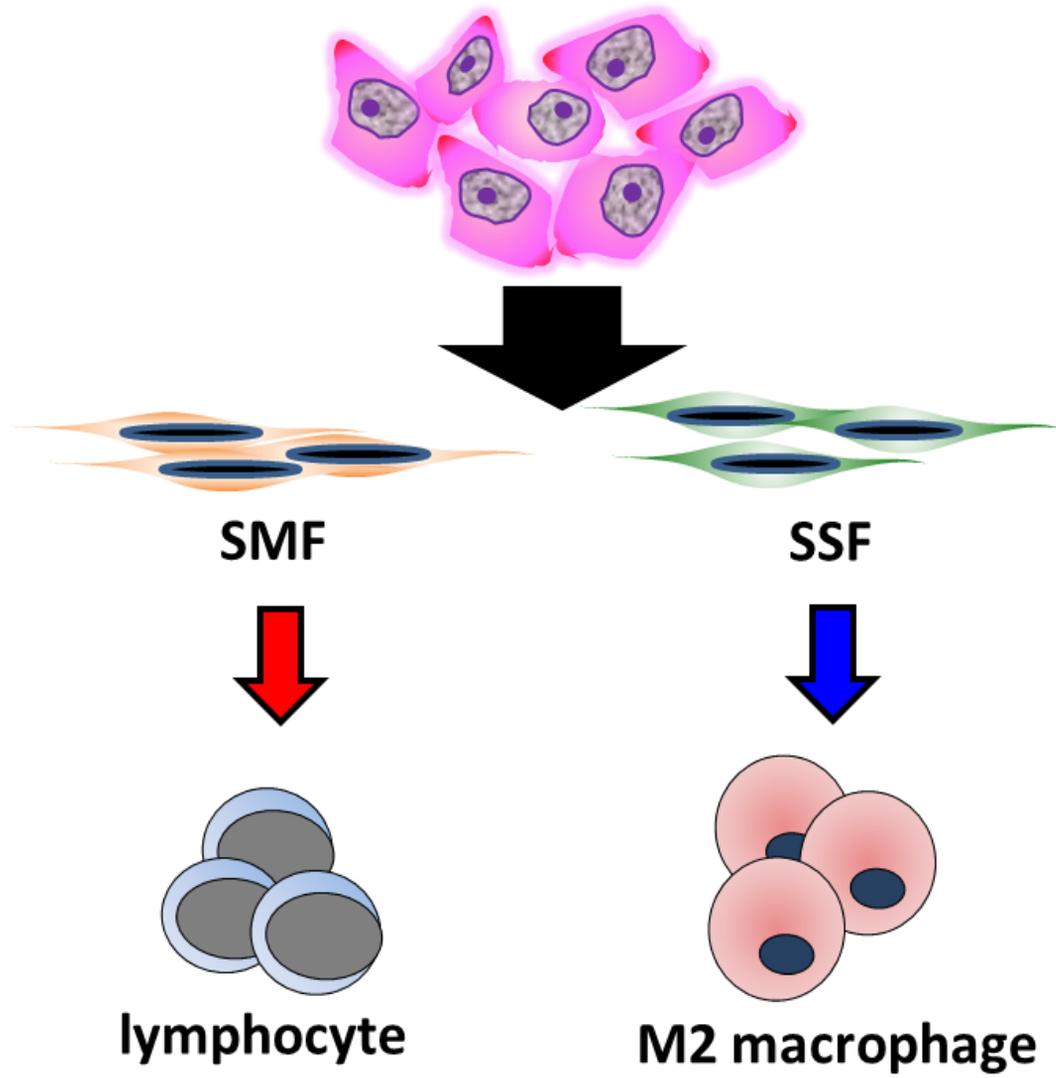
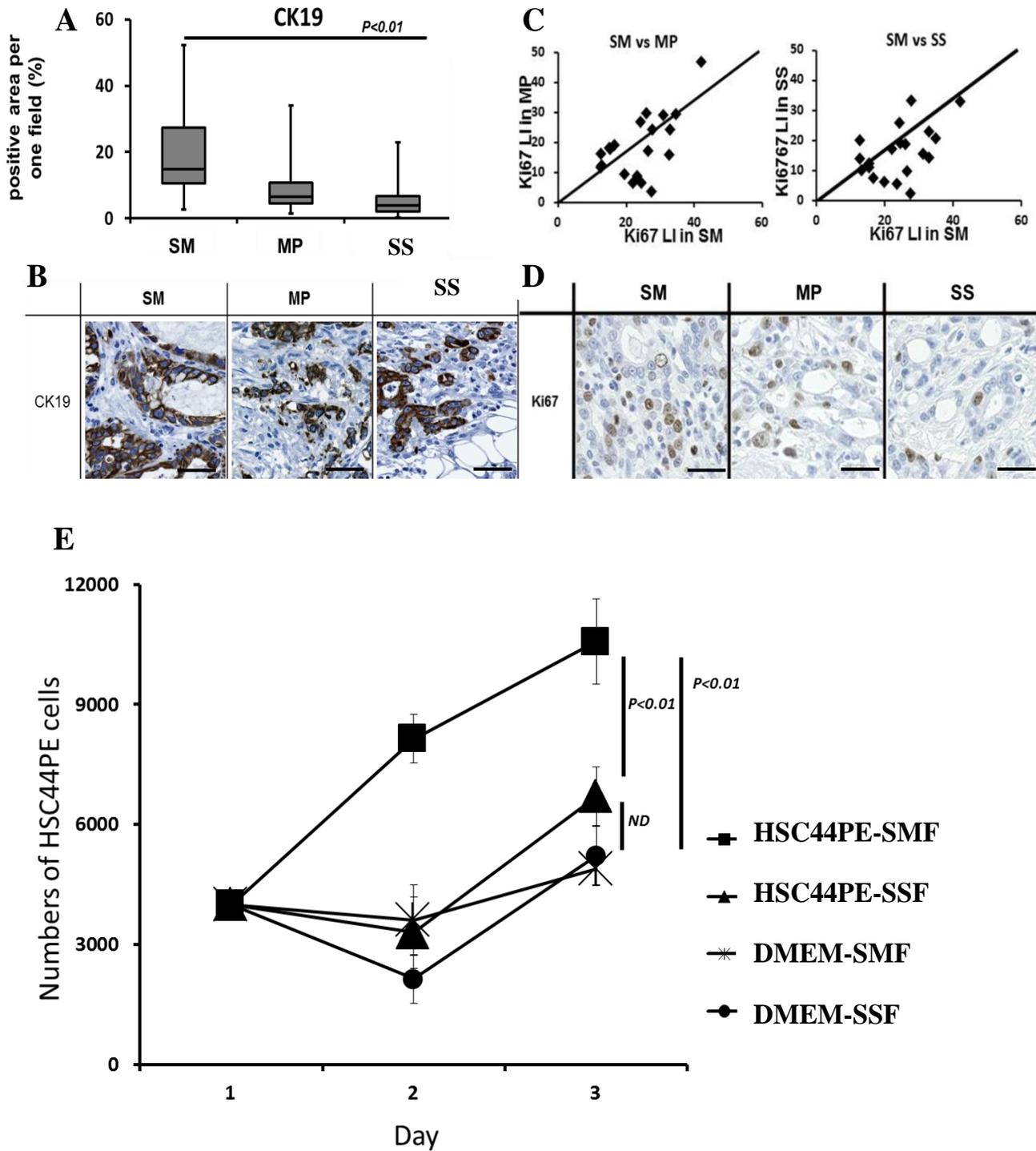


图15. 生物学的解析による炎症環境



Gastric Cancer
Abe A. et al.
DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y
Figure.4 一部改訂

図16. ヒト胃癌組織中において周囲の微小環境が胃癌細胞に与える影響

Term	遺伝子数	p-value
cytokine activity	195	9.58258E-21
chemokine activity	46	9.62574E-13
chemokine receptor activity	49	2.20107E-12
growth factor activity	161	5.36769E-08
copper ion binding	69	4.94874E-06
cadmium ion binding	10	7.18766E-06
glycosaminoglycan binding	140	0.003457548
carbohydrate binding	354	0.004040512
polysaccharide binding	154	0.005824936
pattern binding	154	0.005824936
tumor necrosis factor receptor superfamily binding	31	0.008992828
integrin binding	59	0.009162178
death receptor binding	11	0.009787228

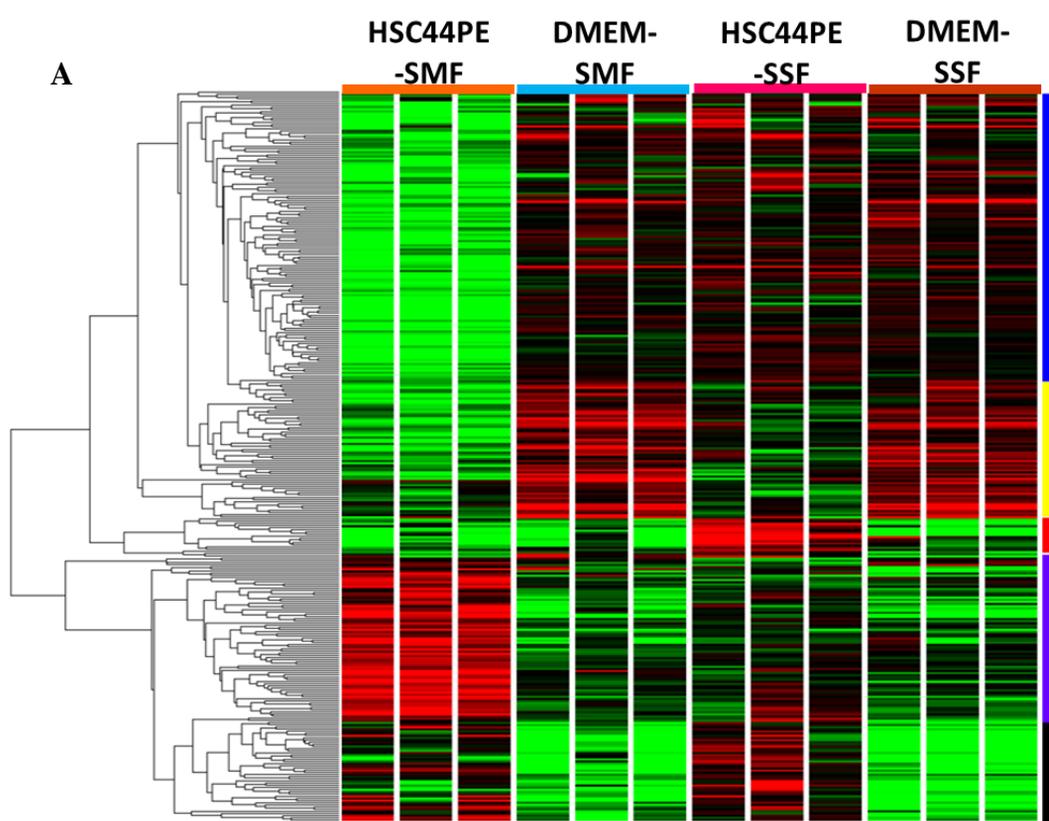
Gastric Cancer

Abe A. et al.

DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y

Table.1 一部改訂

図17. 胃がん細胞株培養上清で刺激した線維芽細胞での遺伝子発現解析



Gastric Cancer

Abe A, et al.

DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y

Figure.3 一部改訂

B	
① HSC44PE-SMF Down regulation	MAP3K7, MAPK1, MAP2K2, MAPKAP1 ZEB1,ATF1,ATF2, WNT5A, JUN, JAG1, THBS1, ADAM9, ADAM10, STAT1, NOTCH2 IFNGR1
② HSC44PE-SMF and HSC44PE-SSF Down regulation	ITGB5, PIK3R1,STAT2
③ HSC44PE-SSF Up regulation	IRF1 CCL8, CXCL5 CSF1,TGFB2
④ HSC44PE-SMF Up regulation	MAP2K3, MAPKAP1,AKT1,DUSP6,JUNB,THY1 ITGA5, CNN2, IL1B, TNFSF15, CCL13
⑤ HSC44PE-SMF and HSC44PE -SSF Up regulation	CCL2, CCL7 CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL6 IL6

図18. 胃がん細胞株HSC44PE培養上清で刺激したSMFとSSF間の炎症関連遺伝子解析

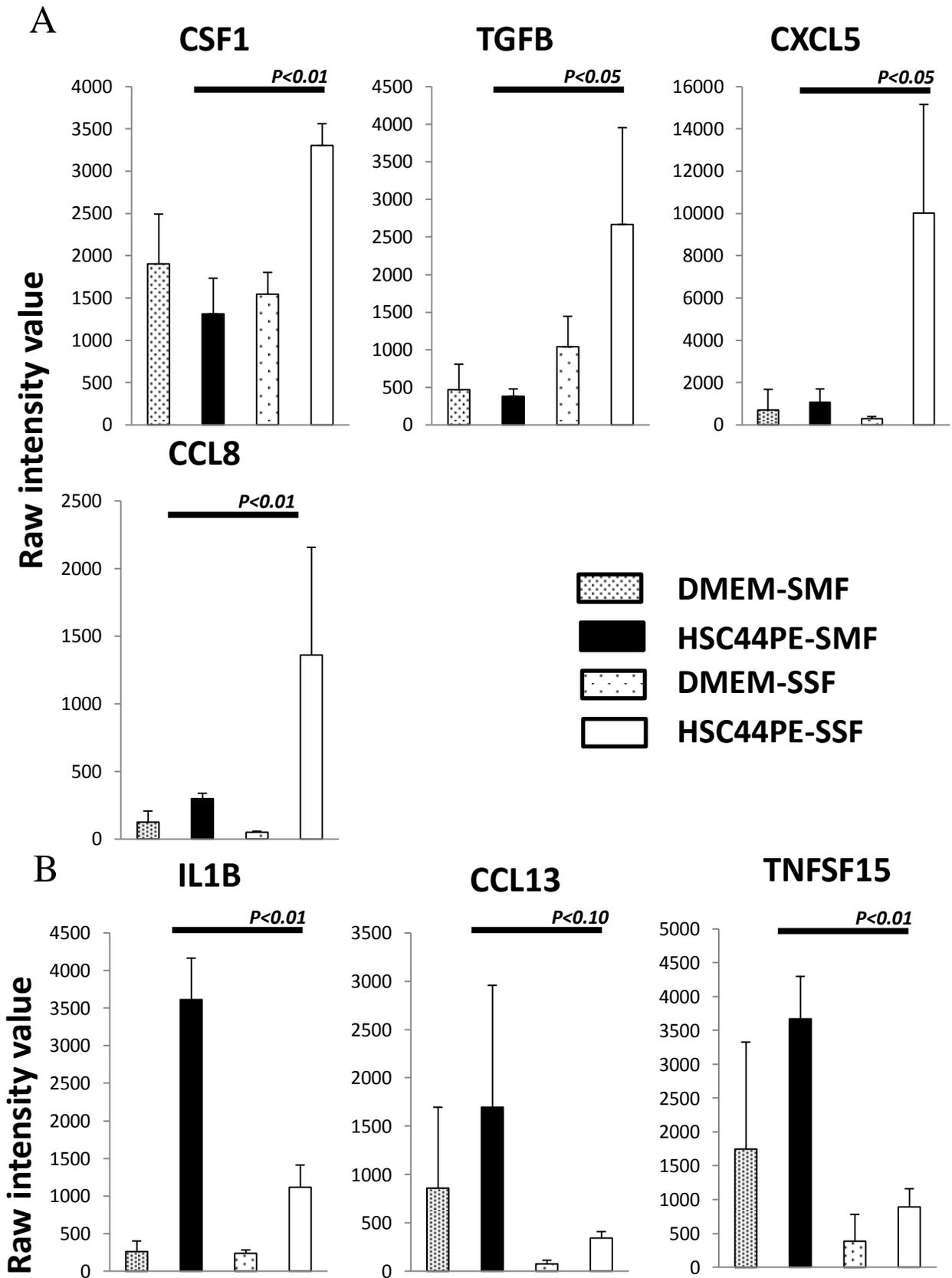


図19. 胃がん細胞株HSC44PE培養上清で刺激したSMFとSSF間のサイトカイン、ケモカイン発現解析

C

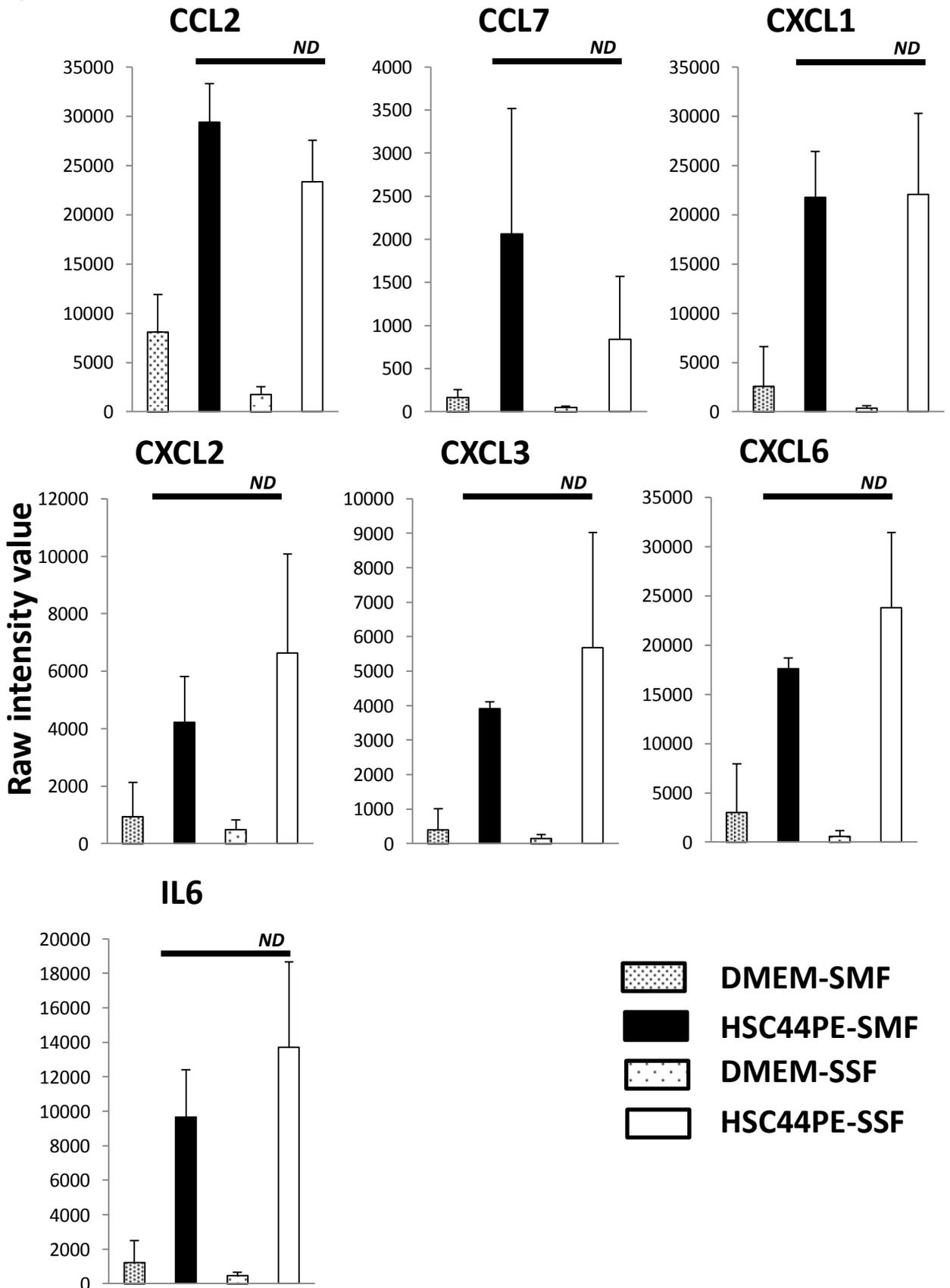
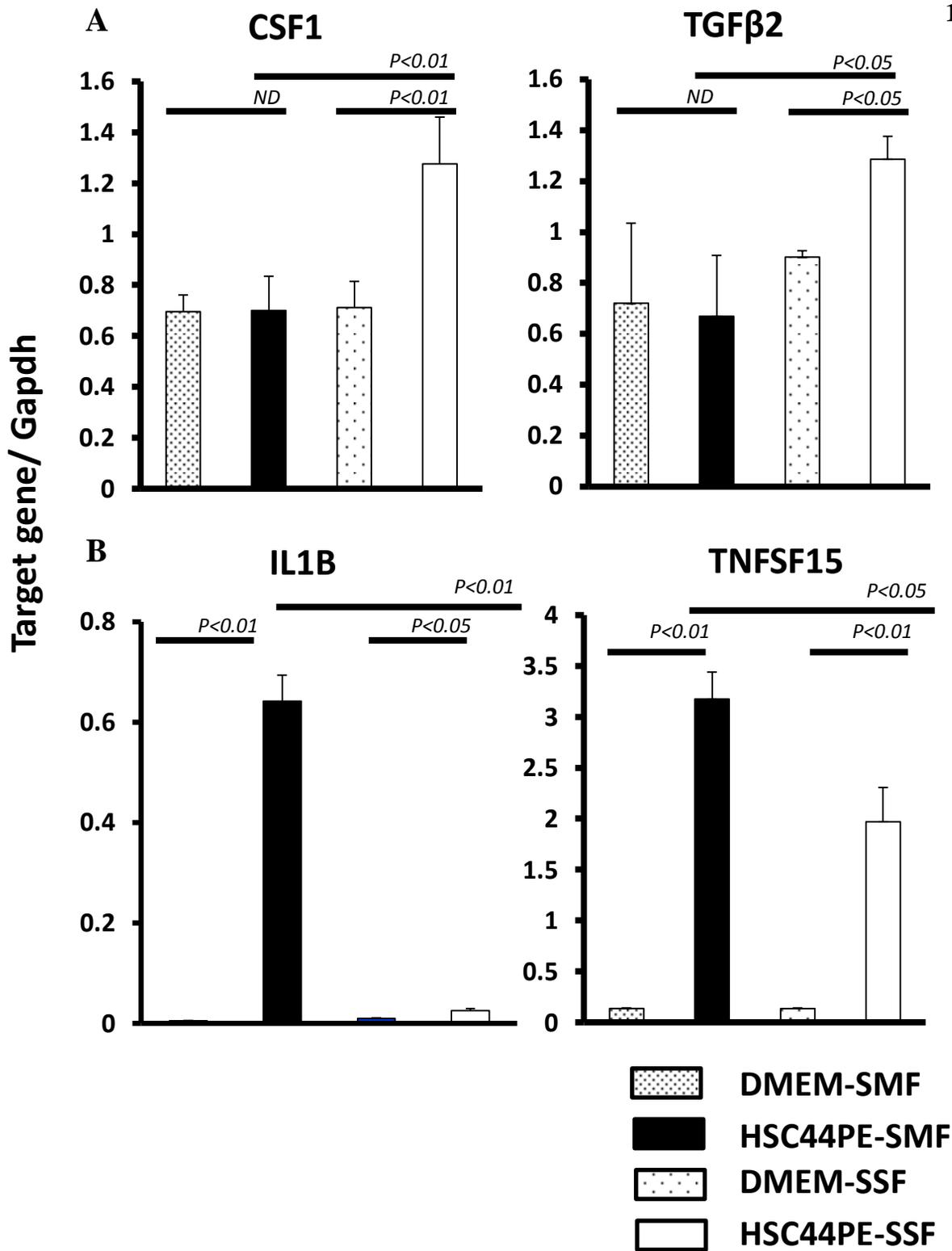


図19. 胃がん細胞株HSC44PE培養上清で刺激したSMFとSSF間のサイトカイン、ケモカイン発現解析



Gastric Cancer

Anna A, et al.

DOI: 10.1007/s10120-015-0584-y

Figure.3 一部改訂

図20. 胃がん細胞株HSC44PE培養上清で刺激した線維芽細胞における特定サイトカイン、ケモカイン発現解析

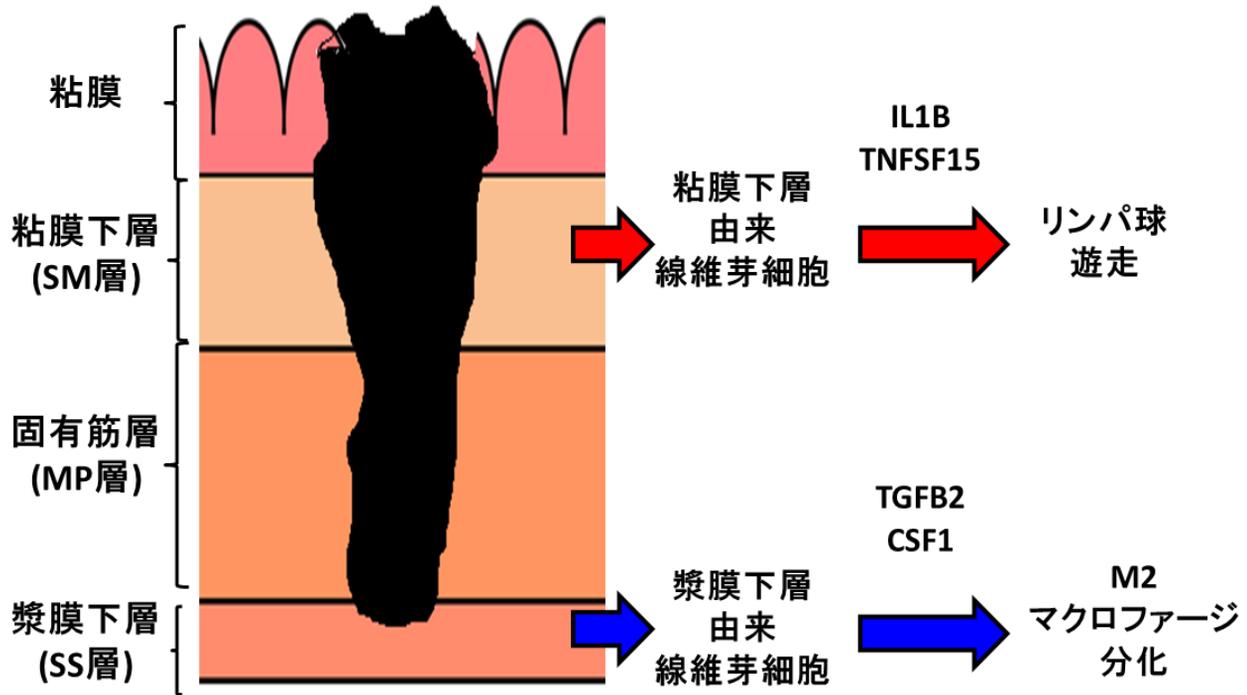


図21. 胃がん組織中における炎症環境のまとめ

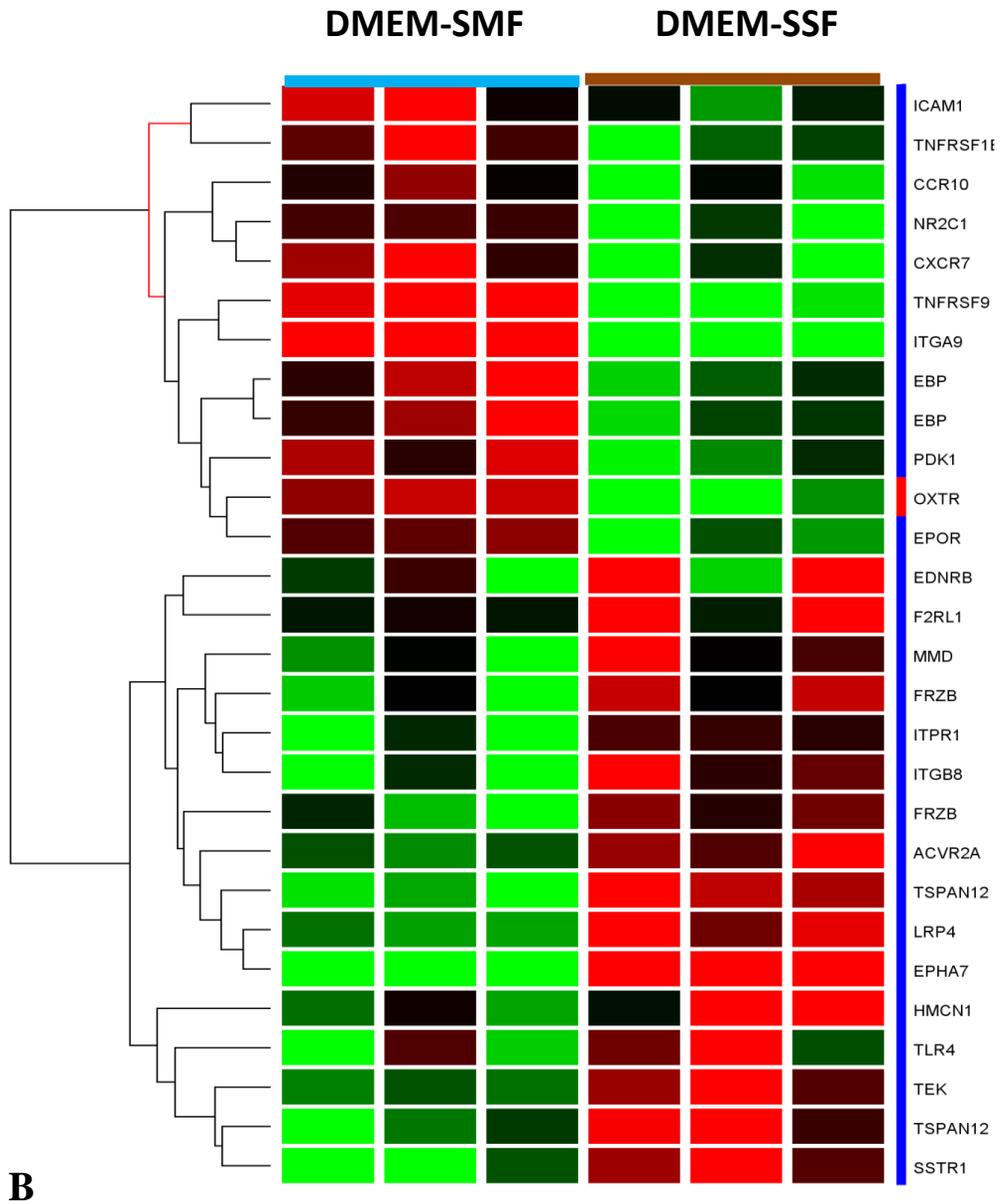


図22. DMEMで刺激したSMFとSSF間のReceptor activity遺伝子発現解析

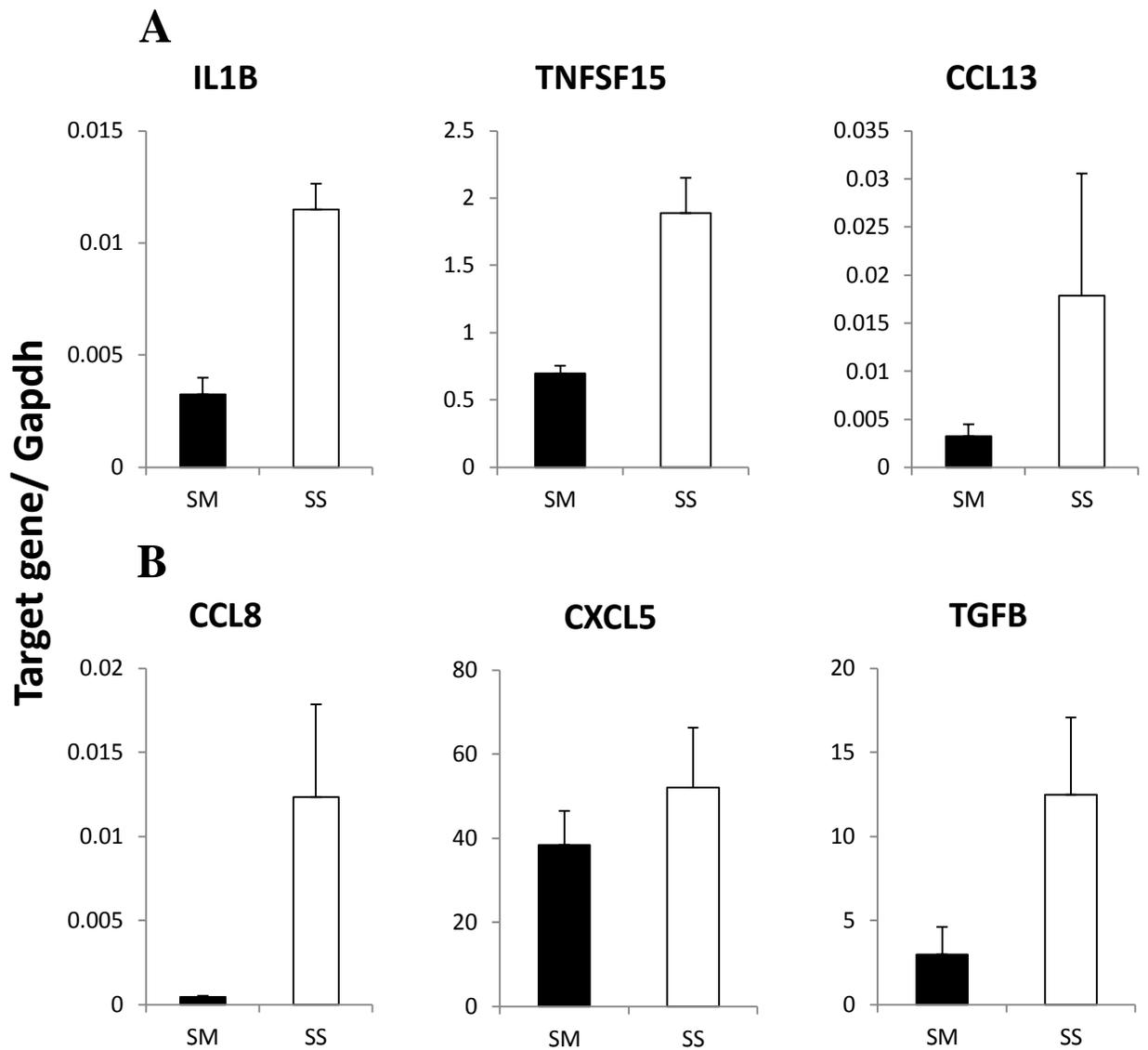
A**DMEM-SMF high expression gene**

Probe Set ID	SM Average	SS Average	SM fold	Gene Symbol	Gene Title
227297_at	29.8	2.8	10.5	ITGA9	integrin, alpha 9
207536_s_at	54.3	9.4	5.8	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
206825_at	403.5	117.6	3.4	OXTR	oxytocin receptor
232746_at	54.1	17.2	3.1	CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7
202637_s_at	397.7	149.7	2.7	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
203508_at	199.2	79.1	2.5	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
202735_at	2029.6	850.9	2.4	EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)
226452_at	1194.2	551.3	2.2	PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
209962_at	115.3	55.1	2.1	EPOR	erythropoietin receptor
220565_at	143.0	70.8	2.0	CCR10	chemokine (C-C motif) receptor 10
210530_s_at	74.9	36.7	2.0	NR2C1	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1

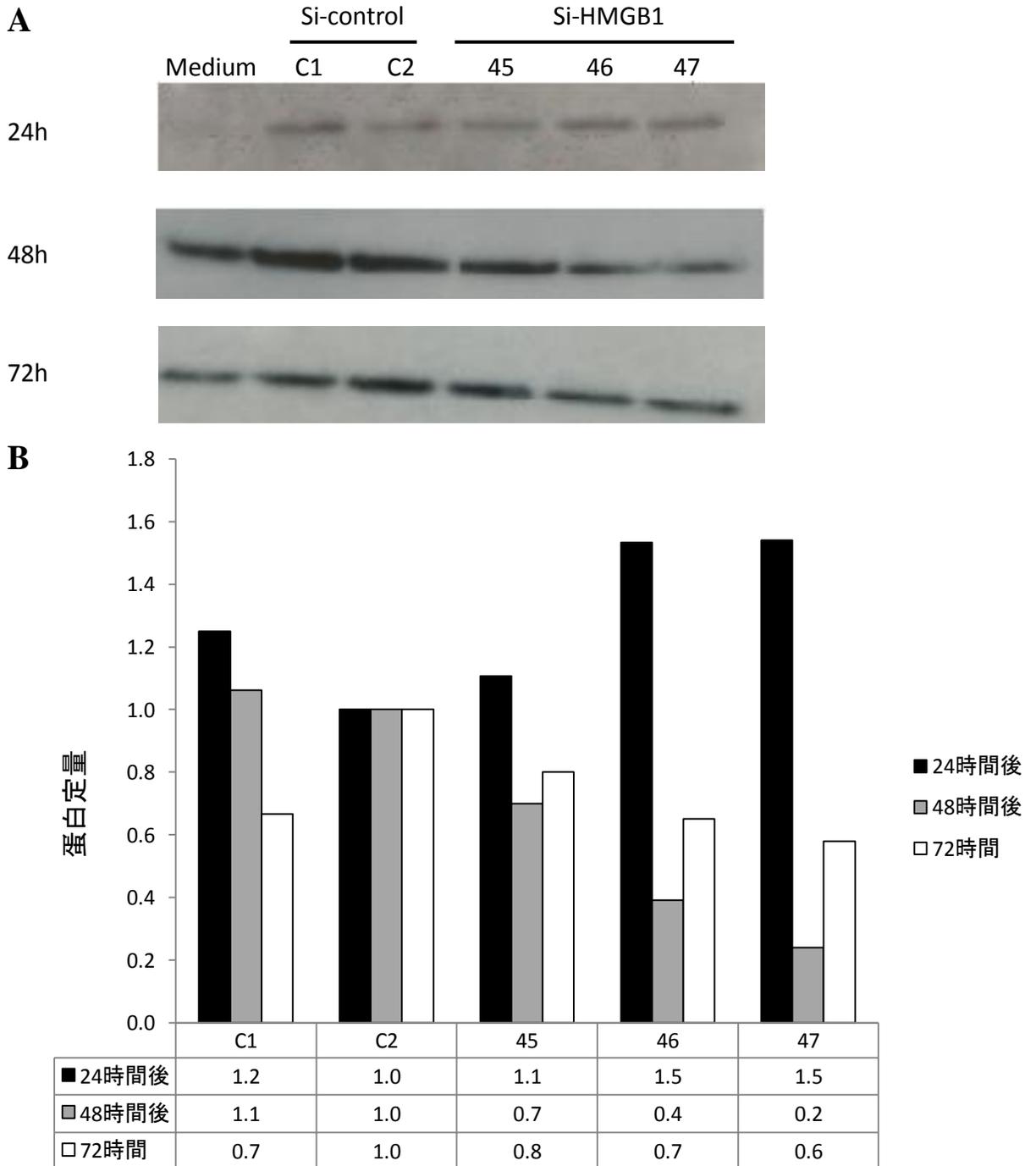
B**DMEM-SSF high expression gene**

Probe Set ID	SM Average	SS Average	SS fold	Gene Symbol	Gene Title
229288_at	5.7	154.0	27.0	EPHA7	EPH receptor A7
219274_at	366.6	1447.2	3.9	TSPAN12	tetraspanin 12
235591_at	94.5	357.9	3.8	SSTR1	somatostatin receptor 1
226189_at	897.5	3326.4	3.7	ITGB8	integrin, beta 8
235944_at	252.7	860.7	3.4	HMCN1	hemicentin 1
206429_at	128.1	389.2	3.0	F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1
212850_s_at	279.5	754.4	2.7	LRP4	low density lipoprotein receptor-related protein 4
204273_at	953.4	2380.9	2.5	EDNRB	endothelin receptor type B
206702_at	257.4	580.5	2.3	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
203697_at	185.0	406.4	2.2	FRZB	frizzled-related protein
1552798_a_at	47.7	101.9	2.1	TLR4	toll-like receptor 4
211323_s_at	153.8	322.9	2.1	ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1
203414_at	776.1	1607.2	2.1	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated
228416_at	636.4	1314.4	2.1	ACVR2A	activin A receptor, type IIA

図23. DMEMで刺激したSMFとSSF間のReceptor activity遺伝子



補足図1. LPSで刺激したSMFとSSFにおける各種サイトカイン、ケモカイン発現解析



補足図2. si-HMGB1を導入したHSC44PE培養上清中のHMGB1タンパク量