

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

阿部 杏奈

### 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(*J Exp Med 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*)。当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 Jun;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に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。

非がん部とがん部で比較すると、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, 2010, 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)。

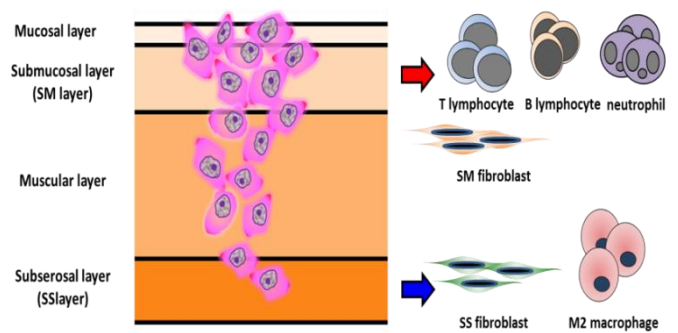


図 1. 病理学的検討における各層の免疫細胞分布

## 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SMFとSSF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考察した。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

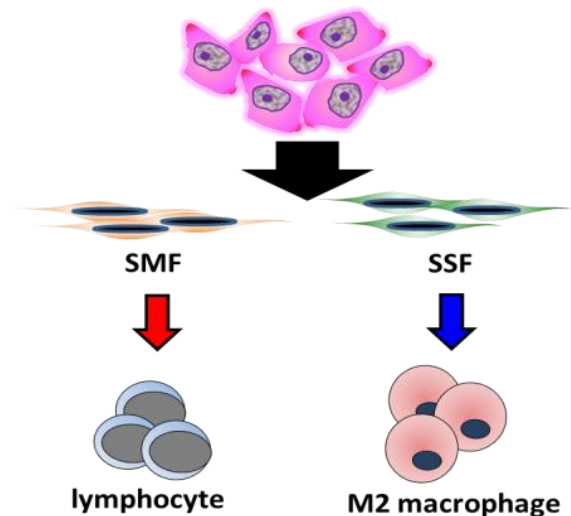


図 2.胃癌細胞株で刺激したSMFおよびSSFにおける免疫細胞の動態

殖能を検討した。その結果 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。

### 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。

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  
胃がん細胞株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、胃がん細胞株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、炎症に関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 Immune response に関与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。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

Term	遺伝子数	p-value
<b>cytokine activity</b>	<b>195</b>	<b>9.58258E-21</b>
<b>chemokine activity</b>	<b>46</b>	<b>9.62574E-13</b>
<b>chemokine receptor activity</b>	<b>49</b>	<b>2.20107E-12</b>
<b>growth factor activity</b>	<b>161</b>	<b>5.36769E-08</b>
<b>copper ion binding</b>	<b>69</b>	<b>4.94874E-06</b>
<b>cadium ion inding</b>	<b>10</b>	<b>7.18766E-06</b>

図 3.線維芽細胞における遺伝子発現

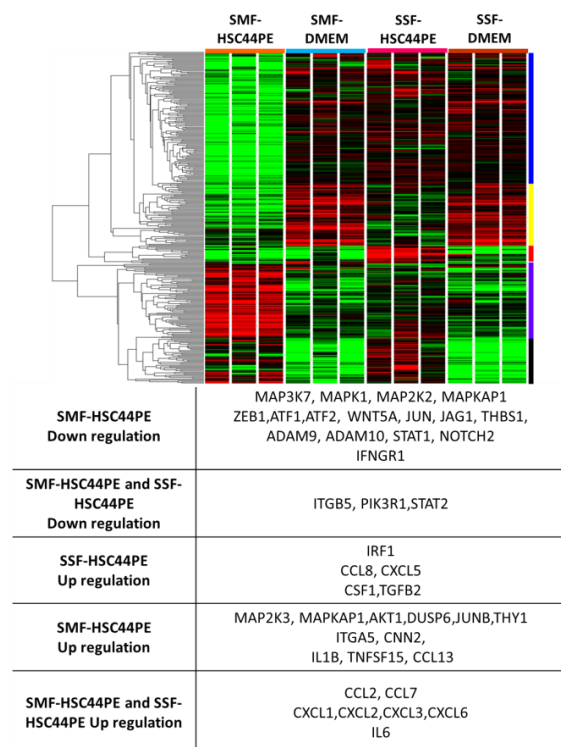


図 4.線維芽細胞における炎症遺伝子発現

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 (TGFB)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, TGFB2 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)。

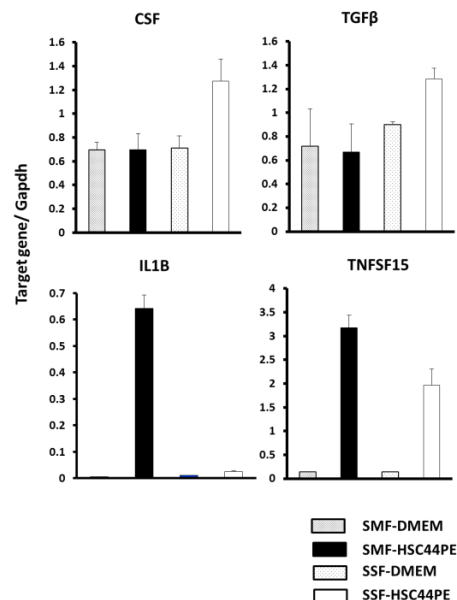


図 5.線維芽細胞におけるケモカイン、サイトカイン発現

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発現パターンの発現を示した。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。

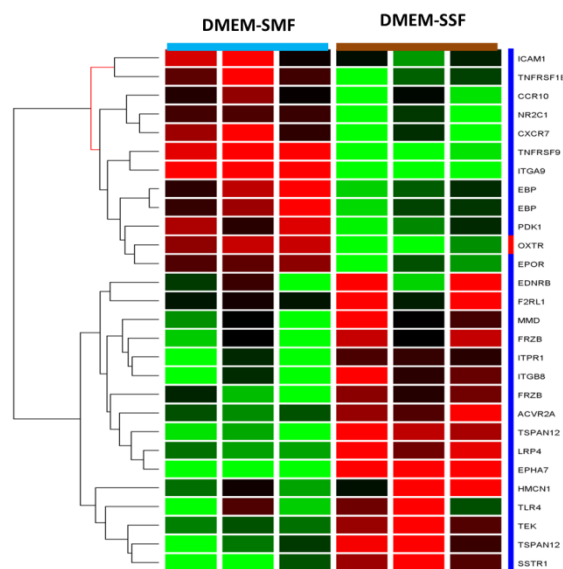


図 6.線維芽細胞における受容体関連遺伝子発現

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