

# 博士論文

## 遺伝子発現の臓器・解剖学的部位特異的な 多様性に基づく線維芽細胞の分類と その機能解析

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

2016年度 博士論文

47137313 樋口洋一

指導教官 落合淳志

# 目次

I. 要旨.....	P.5
II. 略語集.....	P.9
III. 遺伝子発現の網羅的解析に基づく線維芽細胞の系統的分類.....	P.16
(i) 背景	
(ii) 目的	
(iii) 実験材料および実験方法	
(iv) 結果	
(1) ヒト初代培養線維芽細胞は、個体間差ではなく、臓器および解剖学的部位に依存的な 遺伝子発現プロファイルを有する	
(2) 消化管線維芽細胞と非消化管線維芽細胞間における遺伝子発現の差異	
(3) 消化管線維芽細胞における解剖学的部位依存的な遺伝子発現	
(4) 消化管線維芽細胞における臓器依存的な遺伝子発現	
(5) マイクロアレイデータの再現性の検討	
(6) 線維芽細胞の臓器および解剖学的部位特異的な遺伝子のヒト消化管組織における発現	
(v) 考察	

(vi) 結論

IV. 臓器および解剖学的部位特異的な線維芽細胞が上皮細胞に与える影響の検討.....P.38

(i) 背景

(ii) 目的

(iii) 実験材料および実験方法

(iv) 結果

- (1) Caco-2 細胞は、コラーゲンゲル上における長期培養により腸上皮細胞様の分化を示す
- (2) 回腸粘膜下層由来線維芽細胞は、Caco-2 細胞の腸細胞分化および増殖を促進する
- (3) Caco-2 細胞に対する分化および増殖の促進作用は、腸管線維芽細胞に特徴的である
- (4) 腸管線維芽細胞に特徴的に発現する *CXCL12/SDF1* は、Caco-2 細胞の分化および増殖を促進する
- (5) 腸管線維芽細胞への shRNA ベクター導入による *CXCL12/SDF1* のノックダウンにより、Caco-2 細胞の分化および増殖の促進が阻害される
- (6) 腸管線維芽細胞において *NKX2-3* は *CXCL12/SDF1* の転写制御や Caco-2 細胞に対する分化および増殖の亢進に関与しない

(v) 考察

(vi) 結論

V. 総合考察.....	P.56
VI. 結論.....	P.61
VII. 参考文献.....	P.62
VIII. 謝辞.....	P.79
IX. 図表の説明.....	P.81
X. 図表.....	P.97

## I. 要旨

### 遺伝子発現の臓器・解剖学的部位特異的な多様性に基づく線維芽細胞の分類とその機能解析

学生証番号：47-137313 がん先端生命科学分野 樋口 洋一

#### [背景と目的]

線維芽細胞は生体組織に広く存在しており、臓器間質を充填する紡錘形の細胞である。線維芽細胞は、細胞外マトリクスの産生による組織構造の支持や各種増殖因子の産生による組織恒常性の維持のみならず、胚発生やがんの進展においても重要な働きを示す。生理的機能が異なる全身の様々な臓器に広く分布することから、各臓器における線維芽細胞の機能はそれぞれ異なっていることが予想される。しかし、全身に存在する線維芽細胞は均一な細胞形態を示し、それら線維芽細胞を区別する分子マーカーが同定されていないため、臓器や解剖学的部位特異的な線維芽細胞を対象とした機能的分類は未だに行われていない。近年、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析から、線維芽細胞の遺伝子発現はその解剖学的部位に依存していることが示された。しかし上記の報告は、皮膚や肺といった単一臓器内の部位の違いに着目した研究であり、機能の異なる複数臓器に由来する線維芽細胞を横断的に検討した報告はない。

本研究の目的は、全身臓器の線維芽細胞を遺伝子発現プロファイルの比較により分類し、その分類に基づいた線維芽細胞の機能解析を行うことである。本研究では、ヒトの13臓器18解剖学的部位より採取された63種類の正常線維芽細胞の初代培養を行い、その遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。さらに、臓器や解剖学的部位依存的な線維芽細胞の生物学的な意義を検証するため、臓器や部位の異なる多様な消化管線維芽細胞(GIFs)と腸管上皮細胞の分化モデルであるCaco-2細胞株との共培養系を作製し、各GIFsがCaco-2細胞の分化、成熟や増殖に与える影響を検討した。

#### [結果と考察]

##### 1. ヒト線維芽細胞は臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の多様性を示す

ヒトの全身13臓器18解剖学的部位に由来する初代培養線維芽細胞株を樹立した(表1)。採取された線維芽細胞は紡錘形の形態像を示し、間葉系細胞マーカーであるVimentinやCD105の発現が陽性、上皮細胞、筋細胞、神経細胞、中皮細胞、血管内皮細胞、リンパ球や単球のマーカー(Cytokeratin AE1/3, Desmin, GFAP, Calretinin, CD31, CD45, CD68)の発現が陰性であった。採取された線維芽細胞における遺伝子発現の類似性を教師無し階層クラスター解析により検討した。その結果、ヒト線維芽細胞における遺伝子発現は、年齢、性別、人種といった個体間差よりも、由来する臓器や解剖学的部位に依存していることが明らかとなった(図1)。また、系統樹の第一の分岐は、GIFsとNon-GIFsを区別した(GECおよびNGEC,  $P < 0.001$ )。更にGIFs内においても、消化管の各臓器や、粘膜下層由来線維芽細胞(SMFs)と漿膜下層由来線維芽細胞(SPFs)といった同一臓器内の解剖学的部位に依存して線維芽細胞の遺伝子発現が類似

表 1. 線維芽細胞の略称とその由来組織

Fibroblasts	Origin
EsSMFs	Esophagus submucosa
EsSPFs	Esophagus subperitoneum
StSMFs	Stomach submucosa
StSPFs	Stomach subperitoneum
DuSMFs	Duodenum submucosa
DuSPFs	Duodenum subperitoneum
ILSMFs	Ileum submucosa
ILSPFs	Ileum subperitoneum
CoSMFs	Colon submucosa
CoSPFs	Colon subperitoneum
DeFs	Dermal
MaFs	Mammary gland
UtFs	Uterine
PrFs	Prostate
LiFs, HSCs	Liver
GaFs	Gallbladder
LuFs	Lung
VAFs	Vascular Adventitial

する傾向を示した。これらの結果から、ヒト線維芽細胞において GIFs は他の臓器と異なる特殊な細胞群であり、また GIFs は臓器や解剖学的部位依存的な遺伝子発現プロファイルを有していることが判明した。そこで GIFs における臓器間および解剖学的部位の違いを規定している遺伝子群の同定を試みた。

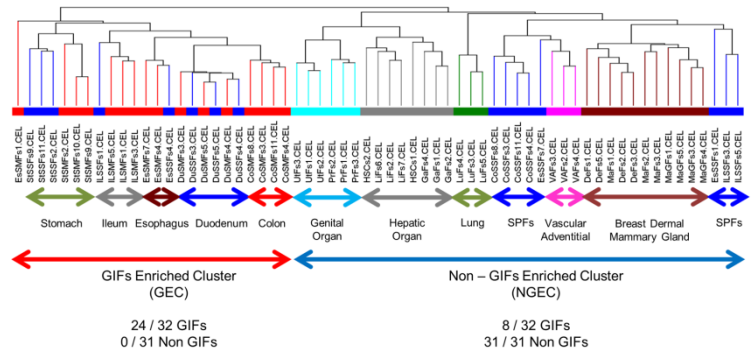


図 1. ヒト線維芽細胞における遺伝子発現プロファイルの類似性解析

臓器依存的に発現の異なる因子として 87 probe sets、SMFs, SPFs 間の解剖学的部位に依存して発現の異なる因子として 498 probe sets が同定された。これらの因子は主として、Homeobox 遺伝子を始めとする転写因子、増殖因子やサイトカインといった液性因子、そしてコラーゲン類などの細胞外マトリクスを制御する遺伝子群によって構成されていた。臓器特異的な遺伝子として大腸線維芽細胞に特異的な *HOXA10*、胃線維芽細胞に特異的な *HOXB8*、また解剖学的部位特異的遺伝子の内、SMFs 特異的遺伝子として *PITX1*、SPFs 特異的遺伝子として *MSX1* について、

マイクロアレイ解析結果の再現性を定量的 RT-PCR 法を用いて確認した (図 2)。これらの発現については免疫蛍光染色を用いたタンパク質レベルにおける検討でも同様の結果を得た。更に上記の 4 遺伝子の *in vivo* での発現を確認するため、大腸、胃の粘膜下層組織および漿膜下層組織、そして肺組織より total RNA を採取し、定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、4 遺伝子中 3 遺伝子は *in vitro* の線維芽細胞における遺伝子発現と類似する発現パターンを示した (図 3)。

以上の結果から、ヒト線維芽細胞は個体間差を超えた遺伝子発現パターンの多様性を示し、それらは臓器および解剖学的部位依存的であることが示された。特に消化管を構成する線維芽細胞には、頭尾軸に沿った臓器間と、消化管壁の層による解剖学的部位に依存した遺伝子発現が同定された (図 4)。これらの遺伝子の内、臓器依存的な Homeobox 遺伝子の発現パターンは、マウスやニワトリの胚発生段階における Homeobox 遺伝子の頭尾軸依存的な発現パターンと類似していた。従って、ヒト線維芽細胞に

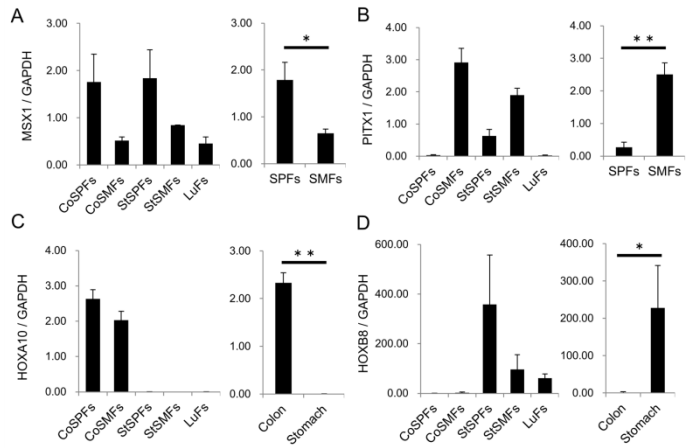


図 2. 定量 RT-PCR によるマイクロアレイ結果の再現性の検討  
マイクロアレイ解析に用いたサンプルとは独立した 3 検体における遺伝子発現の平均値を示した。(※:  $P < 0.05$ , ※※:  $P < 0.01$ )

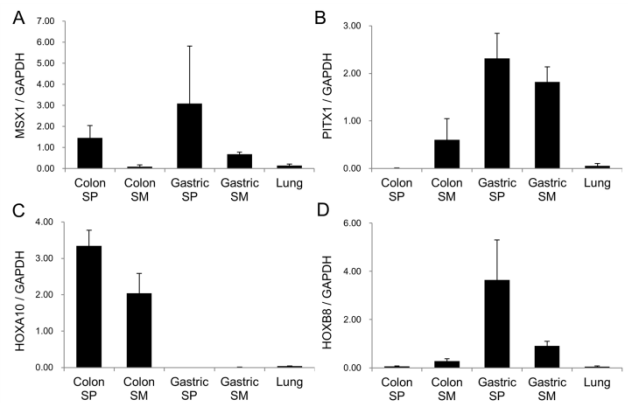


図 3. ヒト組織における部位特異的遺伝子の発現解析 (N=3)

における臓器依存的な遺伝子発現は胚発生の過程で獲得され、成人臓器の間質細胞においてもその発現パターンが維持されていると考えられる。また転写因子の発現と同様に、GIFs における液性因子や細胞外マトリクスの発現は臓器や解剖学的部位に依存して異なることが示され、各臓器に存在する線維芽細胞はその臓器固有の微小環境を構築する可能性が示唆された。

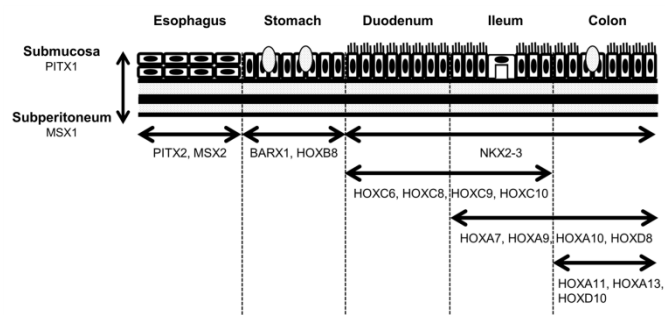


図 4. ヒト消化管を構成する線維芽細胞における Homeobox 遺伝子の多様性

## 2. 腸管線維芽細胞は、腸管上皮細胞の分化および増殖を亢進する

各臓器および解剖学的部位に特異的な GIFs が消化管の上皮細胞へ与える影響を検討するため、ヒト小腸上皮の分化モデル細胞である Caco-2 細胞株と線維芽細胞とを長期共培養することが可能な *in vitro* の 3 次元共培養系を作製した (図 5A)。Caco-2 細胞をコラーゲンゲルに包埋した 10 種類の GIFs (食道、胃、十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs) の上に播種し、共培養から 14 日目の Caco-2 における腸管上皮細胞の分化マーカー (CDX2)、成熟マーカー (MUC2: 杯細胞、CD10, ALPI, SI: 吸収上皮細胞、CHGA/B: 内分泌細胞)、そして増殖細胞マーカー (Ki-67) の発現を免疫化学的染色により評価した。その結果、Caco-2 細胞を単独で培養した群と比較し、腸管線維芽細胞 (十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs) と共培養した群では、CDX2 の陽性細胞割合が 1.8 倍、Ki-67 の陽性細胞割合が 2.9 倍に増加した。これらの発現変化は非腸管線維芽細胞 (食道、胃の SMFs および SPFs) と共培養した群では認められず、腸管線維芽細胞に特有の性質であることが示唆された (図 5B, C)。一方で、MUC2, CD10, ALPI, SI や CHGA/B の陽性細胞割合はいずれも変化しなかった。

腸管線維芽細胞が Caco-2 細胞の分化や増殖を促進する機序を明らかにするため、非腸管線維芽細胞と比較して腸管線維芽細胞に特徴的に発現している因子をマイクロアレイデータより抽出し、結果 33 probe sets が同定された。本研究に用いた共培養系がコラーゲンゲルを介した非接触系であったため、33 probe sets の中で唯一の液性因子であった CXCL12/SDF1 に着目した。CXCL12/SDF1 が Caco-2 細胞の分化や増殖を亢進するか検証するため、Caco-2 細胞に対して 50ng/ml の recombinant CXCL12/SDF1 (rCXCL12/SDF1) の添加実験を行った。その結果、無添加群と比較して、rCXCL12/SDF1 の添加

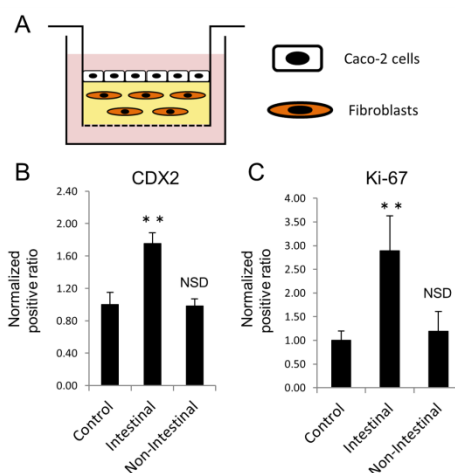


図 5. 各 GIFs と Caco-2 細胞との共培養実験

A. 共培養実験のスキーム。線維芽細胞が包埋されたコラーゲンゲル上に Caco-2 細胞を播種した。  
B-C. 共培養 14 日目における CDX2(B)および Ki-67(C)の陽性細胞割合。  
(N=3, \*\*:  $P < 0.01$ , NSD:  $P > 0.05$ )

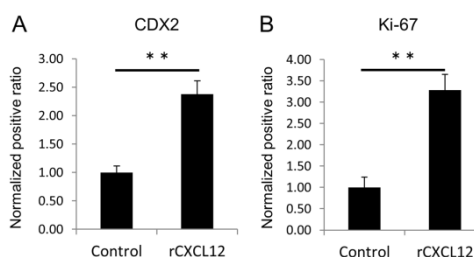


図 6. Caco-2 細胞に対する rCXCL12/SDF1 添加実験  
A-B. rCXCL12 で 14 日間刺激した Caco-2 細胞における CDX2(A)および Ki-67(B)の陽性細胞割合。2 日毎に rCXCL12 を添加した。  
(N=3, \*\*:  $P < 0.01$ )

により CDX2 が 2.4 倍、Ki-67 が 3.8 倍に陽性細胞割合が増加した (図 6)。

これら結果から腸管線維芽細胞が CXCL12/SDF1 を産生することにより、腸管上皮細胞である Caco-2 細胞の分化および増殖を促進していることが示唆された (図 7)。また、近年の研究から、Homeobox 遺伝子を始めとする転写因子は線維芽細胞における部位特異的な遺伝子発現を制御するマスター制御因子として機能することが報告されている。

本研究で同定された 33 probe sets の腸管線維芽細胞特異的に発現する遺伝子群には 10 probe sets (9 遺伝子) の転写因子が含まれており、これらの転写因子が CXCL12/SDF1 といった腸管線維芽細胞特異的な遺伝子発現の制御を介して臓器特異的な機能の維持に寄与していると考えられる。

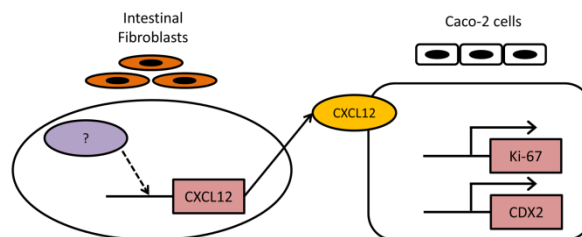


図 7. 腸管線維芽細胞による Caco-2 の分化、増殖促進機構

## [結論]

本研究では全身臓器のヒト線維芽細胞における遺伝子発現の網羅的解析から、由来する臓器や解剖学的部位によって線維芽細胞の遺伝子発現および上皮細胞へ与える影響が異なることを示した。特に消化管を構成する線維芽細胞は、その臓器および解剖学的部位によって明確に分類された。この内、腸管に由来する線維芽細胞は腸管上皮細胞の分化および増殖に寄与し、その機序に関わる機能分子の候補として CXCL12/SDF1 を見出した。一方、CXCL12/SDF1 を始めとする臓器および解剖学的部位特異的な線維芽細胞の遺伝子発現が、どのように制御されているのかは不明である。今後、線維芽細胞における解剖学的部位特異的な遺伝子発現を制御する詳細な分子機構を明らかにしていく必要があるだろう。

本研究で得られた知見は、発生学や解剖生理学といった基礎生命科学における間質細胞の役割を検討する上で重要な概念となる。また我々は、大腸や胃の SMFs と SPFs が、がんの進展に対して異なる影響を及ぼすことを見出した (Kojima M, et al, 2014; Abe A, et al, In press)。SMFs と比較して SPFs は高い腫瘍形成能を示し、SPFs に特徴的な遺伝子発現パターンを示すヒト大腸がんは予後不良であることを報告した (Yokota M, et al, 2015)。従って、我々の見出したヒト線維芽細胞における解剖学的部位特異的な遺伝子発現情報は基礎生命科学の領域のみならず、がんの予後予測を始めとする病態病理学的な研究の礎となると期待される。

## [発表論文]

1. Kojima M, **Higuchi Y**, Yokota M, Ishii G, Saito N, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiai A, Human Subperitoneal Fibroblast and Cancer Cell Interaction Creates Microenvironment That Enhances Tumor Progression and Metastasis. PLOS ONE (2014)
2. **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)
3. Yokota M, Kojima M, **Higuchi Y**, Nishizawa Y, Kobayashi A, Ito M, Saito N, Ochiai A, Gene expression profile in the activation of subperitoneal fibroblasts reflects prognosis of patients with colon cancer. International Journal of Cancer (2015)
4. **Higuchi Y**, Kojima M, Abe A, Suda Y, Miyashita T, Ishii G, Ochiai A, Intestinal Organ Specific Fibroblasts Expressing Stromal Cell-Derived Factor 1 That Enhance Enterocytic Differentiation and Proliferation of Caco-2 cells. In preparation.



## II. 略語表

ALPI	Alkaline Phosphatase, Intestinal
ANOVA	Analysis of variance
ATCC	American Type Culture Collection
BARX1	BARX Homeobox 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
C_MaFs	Mammary Fibroblasts from Caucasian
CCCM	Cancer-Cell-Conditioned Medium
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CDX2	Caudal Type Homeobox 2
CHGA/B	Chromogranin A/B
CoSMFs	Colon Submucosal Fibroblasts
CoSPFs	Colon Subperitoneal Fibroblasts
cRNA	complementary RNA
CXCL12	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12
CXCR4	Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole

DeFs	Dermal Fibroblasts
Dkk1	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSS	Dextran sulfate sodium
DuSMFs	Duodenum Submucosal Fibroblasts
DuSPFs	Duodenum Subperitoneal Fibroblasts
EBF	Early B-Cell Factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EsSMFs	Esophagus Submucosal Fibroblasts
EsSPFs	Esophagus Subperitoneal Fibroblasts
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FOX	Forkhead Box
GaFs	Gallbladder Fibroblasts
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GATA	GATA Binding Protein
GEC	GIFs Enriched Cluster
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green fluorescence protein
GIFs	Gastrointestinal Fibroblasts
GO	Gene Ontology
HGF	Hepatocyte growth factor
HLX	H2.0-Like Homeobox
HOX	Homeobox
HOXA10	Homeobox A10
HOXA13	Homeobox A13
HOXA9	Homeobox A9
HOXB8	Homeobox B8
HOXD4	Homeobox D4
HOXD-AS2	HOXD Cluster Antisense RNA 2
HRP	Horseradish peroxidase
HSCs	Hepatic Stellate Cells
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunoglobulin G

ILSMFs	Ileum Submucosal Fibroblasts
ILSPFs	Ileum Subperitoneal Fibroblasts
J_MaFs	Mammary Fibroblasts from Japanese
KGF	Keratinocyte growth factor
LiFs	Liver Fibroblasts
lncRNA	long non-coding RNA
LPS	Lipopolysaccharide
LuFs	Lung Fibroblasts
LUM	Lumican
LYZ	Lysozyme
MAB21L2	Mab-21-Like 2 (C. Elegans)
MaFs	Mammary Fibroblasts
MaGFs	Mammary Gland Fibroblasts
MAS5	Microarray Suitable 5
MEK	MAPK-ERK kinase
miRNA	micro-RNA
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MSX1	Msh Homeobox 1

MUC2	Mucin 2, Oligomeric Mucus/Gel-Forming
MYO1A	Myosin 1 A
NGEC	Non-GIFs Enriched Cluster
NKX2-3	NK2 Homeobox 3
NSS	Normal saline solution
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PITX1	Paired-Like Homeodomain 1
PrFs	Prostate Fibroblasts
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
rCXCL12/SDF1	Recombinant CXCL12/SDF1
RIN	RNA Intefrity Number
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
rpm	Revolutions per minute
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SD	Standard deviation
SDF1	Stromal cell-derived factor 1

SE	Standard error
Sfrp	Secreted frizzled-related protein
Shh	Sonic Hedgehog
shRNA	short hairpin RNA
SI	Sucrase-Isomaltase (Alpha-Glucosidase)
siRNA	small interfering RNA
SMFs	Submucosal Fibroblasts
SPFs	Subperitoneal Fibroblasts
SSFs	Subserosal Fibroblasts
StSMFs	Stomach Submucosal Fibroblasts
StSPFs	Stomach Subperitoneal Fibroblasts
SV	Supervised
TBX5	T-Box 5
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor, Beta
TLE2	Transducin-Like Enhancer of Split 2
USV	Unsupervised
UtFs	Uterine Fibroblasts
VAFs	Vascular Adventitial Fibroblasts
VIL1	Villin 1

WT1

Wilms Tumor 1

$\alpha$ -MEM

Minimum Essential Medium alpha

### III. 遺伝子発現の網羅的解析に基づく線維芽細胞の系統的分類

#### (i) 背景

線維芽細胞は生体組織に広く存在しており、臓器間質を充填する紡錘形の細胞種である。

線維芽細胞は間質組織の主体を成す細胞種であり、細胞外マトリクスの産生による組織構造の支持、各種増殖因子の産生による細胞間シグナルを介した組織恒常性の維持、胚発生やがんの進展などにおいて重要な働きを示す[1, 2]。生理的機能の異なる全身の様々な臓器に広く分布していることから、各臓器に存在する線維芽細胞の機能はそれぞれ異なっていることが予想される。しかし全身に存在する線維芽細胞は均一な細胞形態を示し、それら線維芽細胞を区別する分子マーカーが同定されていないため、その機能的分類はこれまで行われていない[3]。近年の分子生物学的実験手法の発展により、幾つかの臓器においては解剖学的部位に依存した線維芽細胞の多様性が示されている。例えば、大腸の粘膜上皮近傍に存在する線維芽細胞は、上皮細胞の恒常性、創傷治癒や免疫反応に寄与する特殊な細胞集団であり[4, 5]、漿膜下層に存在する線維芽細胞は腹膜液を産生することで腹腔内臓器の運動および機能に寄与することが報告されている[6, 7]。また我々の研究室においても、ヒト肺組織と肺の血管外膜に存在する線維芽細胞は、脂肪や骨への分化能が異なり、がんの進展に対しても異なる影響を与えることを報告した[8, 9]。しかしながら、これらは1臓器の異なる部位に存在する線維芽細胞の違いを対象とした研究であり、全身の臓器に存在する線維芽細胞を横断的に検討した報告はない。近年、ヒトの皮膚や大腸の線維芽細胞における遺伝子発現の網羅的解析が



報告され、線維芽細胞における遺伝子発現は解剖学的部位に依存して異なることが示された [10-13]。従って遺伝子発現の網羅的解析は、各臓器に存在する線維芽細胞の臓器および解剖学的部位依存的な多様性を明らかとする上で有用な手法であると考えられる。全身臓器に由来する線維芽細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することで、各臓器に特異的な線維芽細胞の分子マーカーを同定するとともに、それらの線維芽細胞が構築する臓器に特徴的な微小環境を把握する上で重要な基礎的情報が得られると期待される。

## (ii) 目的

本研究の目的は、全身臓器に由来する線維芽細胞の遺伝子発現の多様性を明らかとし、各臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現パターンを構築している遺伝子を同定することである。研究は以下の手順で行われた。

1. ヒトの 13 臓器 18 解剖学的部位より採取された 63 種類の線維芽細胞の初代培養を行い、その遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、遺伝子発現の類似性を解析した。
2. 類似性の検討の結果、消化管由来線維芽細胞 (Gastrointestinal Fibroblasts: GIFs) は、臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の多様性を有する特殊な細胞集団であることが示された。そこで GIFs における臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現を構築する遺伝子群を同定した。
3. 同定された遺伝子発現パターンの *in vitro* および *in vivo* における再現性を、定量的 RT-PCR や免疫蛍光染色により確認した。

### (iii) 実験材料および実験方法

#### (1) 倫理規定

本研究は、国立がん研究センター東病院の研究倫理審査委員会の承認の下に行われた (No: 19-021)。本研究で用いた全ての患者由来試料の利用について、インフォームドコンセントに基づく書面での包括同意を得ている。具体的には、初代培養のヒト線維芽細胞 (SMFs, SPFs, LuFs, VAFs, DeFs, J\_MaFs, LiFs, GaFs)、組織由来 total RNA、そして組織切片を上記の研究倫理審査委員会に承認されたプロトコールを用いて得た。

#### (2) 線維芽細胞の単離と初代培養

本研究に用いたヒト由来線維芽細胞は、化学療法や放射線療法の施行されていないがん患者の非がん部から外科的に切除された組織片より単離、初代培養を行った。

食道、胃、十二指腸、回腸および大腸の消化管組織は、漿膜下層および粘膜下層を滅菌したピンセットとハサミを用いて物理的に剥ぎ取り (Fig 1)、0.05% Trypsin / EDTA (SIGMA) 中で 37°C 条件下で 30 分間振とうした。組織片を新たな 0.05% Trypsin / EDTA に移し更に 2 回振とうし、計 3 回の振とう操作を行った。3 回目の振とう後、組織片を取り除き、上清を 1000 rpm で 20 分間遠心した。遠心後上清を取り除き、10% FBS (ニチレイ) および 1% Penicillin / Streptomycin (SIGMA) を添加した 10 ml の  $\alpha$ -MEM (SIGMA) に懸濁し、1000 rpm で 10 分間遠心した。上清を取り除き得られたペレットを 2.0 ml の MF medium (TOYOBO)

に懸濁し、6 cm Dish (日本 BD) に播種した。播種から 7 日間は毎日 PBS (SIGMA) による洗浄と培地の交換を行った。Dish 上に細胞塊が確認されたら、細胞を 0.05% Trypsin / EDTA で剥がし回収した。回収した細胞を 10 cm Dish (日本 BD) に播種したものを Passage 1 とし、以降の実験では Passage 2~6 を用いた。

皮膚、乳腺、肝臓、胆嚢、肺組織および血管外膜からの線維芽細胞の単離、培養は以下の手順で行った。各臓器より得られた組織片を滅菌したはさみを用いて、2.0 mm<sup>2</sup> 程度に細かく切断し、1.0 ml の MF medium を添加した 6 cm Dish 上に播種した。播種した組織片が線維芽細胞に取り囲まれるまで、2 日に 1 回 培地の交換を行った。組織片が細胞に取り囲まれたのを確認した後、組織片を取り除き、細胞を 0.05% Trypsin / EDTA で剥がし回収した。回収した細胞を 10 cm Dish に播種したものを Passage 1 とし、以降の実験では Passage 2~6 を用いた。

また、一部の細胞については、外部機関より購入した。具体的には、白人種由来の乳腺線維芽細胞 (C\_MaFs または MaFs: Zenbio) および肝星細胞 (HSCs: Zenbio)、子宮線維芽細胞 (UtFs: LIFE LINE CELL TECHNOLOGY)、そして前立腺線維芽細胞 (PrFs: ScienCell) を購入した。これらの線維芽細胞は、解凍後は 6 cm Dish へと播種した。細胞がセミコンフルエントに達した後、10 cm Dish へと継代、播種したものを Passage 1 とし、以降の実験では Passage 2~6 を用いた。

### (3) 細胞培養

使用した細胞株は、 HT-29 (ヒト結腸腺がん細胞株; ATCC)、 MCF-7(ヒト乳腺がん細胞株; ATCC)、 Schwann 細胞 (ヒト脊椎神経由来初代培養細胞; ScienCell) である。 Schwann 細胞は RPMI1640 (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地で 37°C、 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。 HT-29 および MCF-7 は DMEM (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地で 37°C、 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。 採取した線維芽細胞の初代培養細胞は MF medium に添付の 0.2% Growth Factor Supplement (PDGF 等 間葉系細胞の増殖および未分化性の維持に対して寄与する増殖因子を豊富に含む) 及び 1% FCS を加えた培地で 37°C、 5% CO<sub>2</sub> の条件下で継代培養した。

### (4) 免疫蛍光染色

2.0 × 10<sup>3</sup> 個の線維芽細胞を 200 µl の MF medium に懸濁し CulterSlides (日本 BD) に添加した。 ネガティブコントロールまたはポジティブコントロールとして、同数の HT-29, MCF-7 および Schwann 細胞を 200 µl の 10% FBS DMEM 培地または 10% FBS RPMI1640 培地に懸濁し、同様に播種した。 播種から 2 日後、各細胞を 10% 中性緩衝ホルマリン (和光純薬) にて処理し、固定した。その後、非特異的結合をブロックするために 2% NSS/PBS に 30 分間浸漬した。一次抗体としては、mouse anti-Vimentin 抗体 (Dako), mouse anti-CytoKeratin (clone:AE1/AE3) 抗体 (Dako), mouse anti-Calretinin 抗体 (Dako), mouse anti-GFAP 抗体 (Dako) および mouse anti-Desmin 抗体 (Dako), goat anti-HOXA10 (Santa, Cruz), mouse

anti-HOXB8 (Abcam), rabbit anti-PITX1 (Atlas Antibodies), rabbit anti-MSX1 (Sigma) を用いて、4°C条件で Overnight で反応させた。二次抗体には、goat anti-mouse Alexa Fluor 488nm (Invitrogen), goat anti-rabbit Alexa Fluor 488nm (Invitrogen), または donkey anti-goat Alexa Fluor 488nm (Invitrogen) を用い、室温で 30 分間、反応させた。スライドガラスの封入および対比染色には VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES, INC.) を用いた。染色した細胞は Axio Vision 4.7.1 (Carl Zeiss) を用いて撮影した。

また、ヒト消化管組織における *MSX1* の免疫蛍光染色は以下の手順で行った。外科的に切除された大腸および胃の、各 3 検体の正常組織から 4.0 μm 厚の組織切片を得た。脱パラフィン処理の後、pH 9.0 Tris-EDTA Buffer (Dako) で 95°C, 20 分間の抗原賦活化処理を Microwave により行った。一次抗体として、mouse anti-Vimentin および rabbit anti-MSX1 を用い、4°C 条件下で Overnight で反応させた。二次抗体として、goat anti-mouse Alexa Fluor 546nm (Invitrogen) と goat anti-rabbit Alexa Fluor 488nm を用い、室温で 30 分間反応させた。組織の封入および対比染色は VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI を用いて行った。組織の観察および撮影は Axio Vision 4.7.1 を用いて行い、染色された組織の粘膜下層および漿膜下層の 40 倍の観察視野の中から無作為に 10 箇所を選択して撮影した。得られた視野中の Vimentin 陽性かつ紡錘形の形態像を示す線維芽細胞様細胞における核内 GFP 蛍光の輝度を Photoshop CS5 を用いて算出することにより *MSX1* 発現を半定量化した。本研究に用いた一次抗体のリストは Table 1 に示した。

## (5) フローサイトメトリー

1.0 × 10<sup>5</sup> 個の線維芽細胞を 100μl の 3% FBS / PBS に懸濁した。一次抗体としては、Mouse anti-CD31 抗体 (Dako)、 Mouse anti-CD34 抗体 (Dako)、 Mouse anti-CD45 抗体 (eBioscience)、 Mouse anti-CD68 抗体 (Dako)、および Mouse anti-CD105 抗体 (Dako) を用い、ネガティブコントロールとしては Mouse IgG1, k Control (eBioscience) を用いた。二次抗体としては、 Rabbit anti-mouse IgG / FITC (Dako) を用いた。各細胞表面抗原の発現を FACS Calibur (日本 BD) を用いて検出した。本研究に用いた一次抗体のリストは Table 1 に示した。

## (6) Total RNA の単離と精製

線維芽細胞からの total RNA の回収は以下の手順で行った。まず、5.0 × 10<sup>5</sup> 個の線維芽細胞を 10cm Dish に播種し、10% FBS DMEM 培地で 48 時間培養後、無血清 DMEM に培地を交換し 48 時間培養した。10ml の PBS で 2 回洗浄した後、1.0 ml の TRIzol reagent (Invitrogen) を加え、セルスクレーパー (ザルスタット) を用いて回収した。回収した TRIzol reagent に 200 μl のクロロホルム (和光純薬) を加え、4°C, 15000 rpm で 10 分間遠心して得られた上層から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を精製した。また、total RNA 中のゲノム DNA を除去するため、RNeasy Mini Kit のカラム上にて RNase-Free DNase Set (QIAGEN) による処理を行った。採取された total RNA サンプルのクオリティーは Agilent Bioanalyzer および RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent) を用いて行い、全てのサンプルの RIN 値が 9.0 より大きいことを確認した。

ヒト組織由来の total RNA は、大腸および胃の粘膜下層組織と漿膜下層組織、そして肺組織から採取した。組織片を細かく刻んで 1.0 ml の TRIZOL reagent に浸漬した後、TissueLyser (QIAGEN) を用いてホモジナイズした。以降は線維芽細胞と同様の手順で total RNA を精製した。

#### (7) マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析

遺伝子発現の網羅的解析は、GeneChip Human Genome U133 Plus 2 Array (Affymetrix) を用いて行った。上記の cDNA チップは、38,500 個の既知遺伝子を含む 47,000 個の転写産物が解析可能な 54,675 probe sets から構成されている。cDNA チップへのハイブリダイゼーションに用いる cRNA サンプルは、100 ng の total RNA を 3' IVT Express Kit (Affymetrix) により増幅させることで得た。cRNA のハイブリダイゼーションから蛍光ラベルの付加は、製造元 (Affymetrix) のプロトコール通りに行った。cDNA チップのスキャン画像は、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) を用いて所得した。得られたマイクロアレイの生データは、Gene Expression Omnibus (GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; NCBI) に登録した。63 種類の線維芽細胞のマイクロアレイデータの Accession number は GSE63626 であり、この内、3 ペアの大腸 SMFs と SPFs のデータは、我々が過去に GSE53059 に登録したサンプルと同一である。本研究で得られた線維芽細胞のマイクロアレイデータの詳細は Table 2 に示した。

cDNA チップを用いた遺伝子発現の網羅的解析は、国立がん研究センター中央研究所 発がん機構研究グループ 遺伝医学研究分野の佐々木 博己 先生、青柳 一彦 先生らとの共同研究



で実施された。具体的には、CoSMFs, CoSPFs, StSMFs, StSPFs, LuFs, そして VAFs の遺伝子発現データは国立がん研究センター中央研究所で、その他のサンプルの遺伝子発現データは全て国立がん研究センター東病院で得た。

#### (8) マイクロアレイデータの統計解析

マイクロアレイデータの統計解析は GeneSpring GX 12.6 (Agilent) を用いて行った。まず、遺伝子発現データの正規化処理（チップ間誤差の補正）を、MAS5 アルゴリズムを用いて行った。正規化後の遺伝子発現データ（Raw intensity value）は  $\log_2$  ベースで対数化することで標準化した（Normalized intensity value）。以降の遺伝子の選定やクラスタリングの統計解析は全て、Normalized intensity value を用いて行った。

##### ① 教師無し階層クラスター解析 (USV 階層クラスタリング)

USV クラスタリングに用いた遺伝子群の選定は以下の条件で行った。まず、USV クラスタリングに供試したサンプルの内、10% 以上のサンプルで明確な発現を認め（Frag status が “Perfect match” で特異的な発現が確認された probe sets ）、かつ 10% 以上のサンプルで全サンプルの中央値と比較して、3.0 以上の発現値の差（ $\log_2$ ; 発現倍率が 8 倍以上）を認める probe sets を選択した。選択された probe sets 群を用いて、Pearson 相関距離に基づく Average linkage 階層クラスタリングを行った。

## ② 教師有り階層クラスター解析 (SV 階層クラスタリング)

各サンプル間で発現の異なる probe sets として、 $P$  value が 0.05 未満、かつサンプル間の発現倍率 (Fold change) が 2.0 よりも大きい probe sets を選出した。 $P$  value の算出には、Unpaired t-test または ANOVA を用い、多重比較検定として Benjamini & Hochberg 法による  $P$  value の補正を行った。選出した probe sets を用いた SV 階層バイクラスタリングを行い、各サンプルにおける probe sets の発現状況を確認した。

## ③ 公共マイクロアレイデータを用いた遺伝子発現の再現性の検討

自施設で得られたマイクロアレイデータの再現性の検討のため、本研究で同定された部位特異的な線維芽細胞の遺伝子発現を、公共データベースである GEO に登録されている初代培養線維芽細胞の遺伝子発現と比較した。大腸粘膜由来線維芽細胞 8 サンプルを 3 データセット (GSE15322, GSE29316, GSE39394)、胃粘膜由来線維芽細胞 3 サンプルを 1 データセット (GSE44740)、乳腺由来線維芽細胞 9 サンプルを 2 データセット (GSE20086, GSE25619)、そして肺由来線維芽細胞 9 サンプルを 2 データセット (GSE23066, GSE44723) を解析に用いた [14-21]。

## (9) 定量的 RT-PCR (qRT-PCR)

精製された total RNA より、PrimeScript RT reagent Kit (TAKARA) を用いて cDNA を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus; TAKARA) を用いて Light Cycler 480 II

(Roche) による定量的 RT-PCR 反応を行った。標的遺伝子の mRNA の発現は *GAPDH* で標準化することで相対発現を定量した。使用したプライマーの配列は Table 3 に示した。

#### (10) 統計解析

2 サンプル間の比較については、F 検定により等分散の確認を行った後、スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行い、両側検定で *P* value が 0.05 未満であった場合に有意差があるとみなした。USV 解析における GIFs と Non-GIFs のクラスター間の偏りは、 $\chi^2$  の 2 項検定を用いて統計解析を行い、*P* value が 0.05 未満であった場合に有意差があるとみなした。

#### (iv) 結果

(1) ヒト初代培養線維芽細胞は、個体間差ではなく、臓器および解剖学的部位に依存的な遺伝子発現プロファイルを有する

線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルを比較するため、まずヒト全身の 13 臓器、18 解剖学的部位より 63 種類の線維芽細胞を単離・培養した。得られた線維芽細胞は全て紡錘形の形態像を示し、プラスチック Dish 上で、最低 6 passages 以上、培養可能であった (Fig 1)。免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーを用いた細胞抗原解析の結果から、得られた 18 種類の細胞の内、GaFs と LiFs を除く 16 種類の細胞は 間葉系細胞マーカー (Vimentin, CD105) が陽性で、上皮細胞マーカー (Cytokeratin AE1/3)、平滑筋マーカー (Desmin)、神経細胞マーカー (GFAP)、中皮細胞マーカー (Calretinin)、血管内皮細胞マーカー (CD34)、リンパ球マーカー (CD45)、そして単球マーカー (CD68) が陰性であった (Fig 2, 3)。一方、GaFs および LiFs は Desmin の発現が弱陽性であったことから、胆嚢や肝臓や膵臓など臓器に存在する間葉系細胞である星細胞様の細胞が採取されていると考えられた[22, 23]。

採取された線維芽細胞における遺伝子発現を Affymetrix GeneChip U133 Plus 2 チップを用いて網羅的に解析した。各線維芽細胞間の遺伝子発現プロファイルの類似性を検討するため、得られた遺伝子発現データの内、実験に供試験した 63 種の線維芽細胞で十分な発現が認められる 776 probe sets を用いた USV 階層クラスター解析を行った (Fig 4A, B)。その結果、ヒト線維芽細胞における遺伝子発現は、臓器や解剖学的部位に依存して異なることが明らかと

なった。得られた系統樹は、第一の分岐から 2 つのクラスターに分割され、左のクラスターは全て GIFs のサンプルから構成されるクラスター (GIFs enriched cluster: GEC; 24/32: GIFs, 0/31: Non-GIFs) であったのに対し、右のクラスターは Non-GIFs を多く含むクラスター (Non-GIFs enriched cluster: NGEC; 8/32: GIFs, 31/31: Non-GIFs) であった ( $P < 0.001$ ,  $\chi^2$  検定)。この内、SMFs は全て GEC に集積したのに対し、NGEC に集積した 8 つの GIFs は全て SPFs であった ( $P < 0.001$ )。これらの結果から GIFs と Non-GIFs は異なる遺伝子発現プロファイルを有することが示唆された。また、GEC および NGEC 内には、GIFs や Non-GIFs の臓器毎にサンプルが集積する傾向を示した。更に、GIFs の内、胃、回腸や大腸の SMFs と SPFs は異なるクラスターに集積する傾向を示した。

一方で、同一検体から採取された胃、回腸や大腸の SMFs および SPFs は異なるクラスターに集積したことから、解剖学的部位依存的な遺伝子発現プロファイルの類似性は、採取された検体の年齢、性別といった検体間差よりも強いことが示唆された。更に、白人種から採取された HSCs と日本人から採取された LiFs (肝臓由来線維芽細胞)、白人種から採取された C\_MaFs と日本人から採取された J\_MaFs (乳腺由来線維芽細胞) が、それぞれ同一のクラスターに集積したことから、人種による遺伝子発現の差も臓器間の差と比較して小さいことが示唆された。また、ヒト線維芽細胞において人種、年齢や性別に依存して発現の異なる遺伝子を探索したところ、人種間差に依存的な遺伝子が 16 probe sets、年齢に依存的な遺伝子が 2 probe sets 同定されたが、性別依存的な遺伝子は全く存在していなかった ( $R^2 > |0.6|$ , Supp Fig 1)。この結果は、ヒト線維芽細胞における人種や年齢間差の可能性を示しているが、

その影響は臓器や解剖学的部位の差と比較して限定的である示唆した。

以上の結果から、ヒトの全身臓器に由来する線維芽細胞は、個人間差を超えた、臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなった。また GIFs は Non-GIFs と異なる特殊な細胞群であり、GIFs は臓器や解剖学的部位に依存した多様な線維芽細胞により構成されていることが示唆された。そこで、GIFs – Non-GIFs 間、SMFs – SPFs 間、そして消化管の臓器間の遺伝子発現プロファイルの違いを規定している遺伝子群の同定を試みることにした。

## (2) 消化管線維芽細胞と非消化管線維芽細胞間における遺伝子発現の差異

GIFs と Non-GIFs の間で発現が有意に異なる遺伝子群を選出した結果、995 probe sets が同定された (Fig 5A;  $P < 0.05$ , Fold change  $> 2.0$ )。同定された 995 probe sets には、細胞の転写制御に関与する遺伝子群 (Transcriptional regulation)、細胞間シグナル伝達を制御する増殖因子やサイトカインなどの液性因子に関与する遺伝子群 (Signal ligands)、そして組織間質内の基質成分の産生や分化に関与する遺伝子群 (Extracellular matrix remodeling) が多く含まれていた (Fig 5B, Supp Fig 2A)。

## (3) 消化管線維芽細胞における解剖学的部位依存的な遺伝子発現

消化管を構成する 5 つの臓器の内、SMFs – SPFs 間の解剖学的部位による遺伝子発現の差が認められる臓器を明らかとするため、GIFs の各臓器の線維芽細胞について USV 階層クラ

スター解析を行った。その結果、5 臓器中 3 臓器（大腸、回腸、胃）では SMFs と SPFs は異なるクラスターに集積したのに対して、残りの 2 臓器（食道、十二指腸）では明確な解剖学的部位による遺伝子発現の差を認めなかった（Fig 6A）。そこで、大腸、回腸、胃の 3 臓器において SMFs と SPFs の間で発現の有意に異なる遺伝子群を選出したところ、合計 498 probe sets が同定された（Fig 6B）。これら 498 probe sets の遺伝子群には、GIFs – Non-GIFs 間の差と同様に、“Transcriptional regulation”、“Signal ligands” や “Extracellular matrix remodeling” に関連する遺伝子群が多く含まれていた（Fig 6C, Supp Fig 2B）。

#### (4) 消化管線維芽細胞における臓器依存的な遺伝子発現

GIFs における臓器依存的な遺伝子発現の多様性を検討するため、SMFs および SPFs のそれぞれのサンプルについて USV 階層クラスター解析を行い、遺伝子発現の類似性を検討した。その結果、SMFs, SPFs の遺伝子発現プロファイルは共に、臓器依存的に類似していることが示された（Fig 7A）。SMFs および SPFs においてそれぞれ臓器特異的に発現している遺伝子群の選出を行ったところ、SMFs の臓器特異的な遺伝子として 433 probe sets 、SPFs の臓器特異的な遺伝子として 526 probe sets が同定され、その内 87 probe sets は SMFs と SPFs で共通して発現が認められた（Fig 7B, C）。また興味深いことに、同定された臓器特異的な 87 probe sets の内、15 probe sets は Homeobox 遺伝子であった。そこで、GIFs において確かな発現が認められる 35 probe sets の Homeobox 遺伝子を用いた USV 階層クラスター解析を行った。その結果、GIFs における Homeobox 遺伝子の発現パターンは、消化管の

頭尾軸に依存していることが示された (Fig 8)。Homeobox 遺伝子の発現は、GIFs の臓器間のみならず SMFs – SPFs 間の解剖学的部位でも異なり (SMFs specific homeobox gene: *PITX1*, SPFs specific homeobox gene: *MSX1*)、GIFs における遺伝子発現プロファイルの多様性と Homeobox 遺伝子の発現パターンとの関連性が示唆された (Fig 9)。

#### (5) マイクロアレイデータの再現性の検討

マイクロアレイ解析の結果、明らかとなった GIFs の臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の再現性を確認するため、マイクロアレイに用いた線維芽細胞と同一の RNA サンプルと、独立した検体より採取されたサンプルを用いた再現性試験を行った。SMFs 特異的遺伝子として *PITX1*、SPFs 特異的遺伝子として *MSX1*、大腸線維芽細胞に特異的な遺伝子として *HOXA10*、そして胃線維芽細胞に特異的な遺伝子として *HOXB8* の遺伝子発現を qRT-PCR により確認した (Fig 10, Supp Fig 3)。また、独立した検体より採取された各部位の線維芽細胞に対する免疫蛍光染色を用いたタンパク質レベルでの検討においても、上記の 4 遺伝子の発現パターンは同様の傾向を示した (Fig 11, 12)。

また、公共マイクロアレイデータを用いた再現性の検討も行った。大腸粘膜由来線維芽細胞を 8 サンプル、胃粘膜由来線維芽細胞を 3 サンプル、乳腺由来線維芽細胞を 9 サンプル、そして肺由来線維芽細胞を 9 サンプルの合計 29 サンプルのプールデータを作製した。これらの 29 サンプルについて、GIFs – Non-GIFs 間で発現の異なっていた 995 probe sets を用いた階層クラスター解析を行ったところ、得られた系統樹の第一の分岐は GIFs (大腸粘膜お



よび胃粘膜由来線維芽細胞) と Non-GIFs (乳腺および肺由来線維芽細胞) を区別した (Fig 13A)。また、GIFs および SMFs に特異的な *PITX1*、Non-GIFs に特異的な *TBX5*、大腸線維芽細胞特異的な *HOXA13*、胃線維芽細胞に特異的な *BARX1* を始めとする複数の臓器、解剖学的部位特異的な遺伝子の発現パターンの再現が確認された (Fig 13B, C, D, E)。以上の結果から、本研究で明らかとなった線維芽細胞の臓器、解剖学的部位特異的な遺伝子発現の情報は、他検体および他施設のサンプルにおいても再現可能なデータであると考えられた。

#### (6) 線維芽細胞の臓器および解剖学的部位特異的な遺伝子のヒト消化管組織における発現

最後に、*in vitro* における線維芽細胞の臓器および解剖学的部位特異的な遺伝子発現が *in vivo* でも再現されるか検証するために、ヒト大腸、胃の粘膜下層組織および漿膜下層組織、そして肺組織における *MSX1*, *PITX1*, *HOXA10*, *HOXB8* の遺伝子発現を qRT-PCR により検討した。その結果、4 遺伝子中 3 遺伝子 (*MSX1*, *HOXA10*, *HOXB8*) において、*in vitro* における遺伝子発現と相関する発現パターンを得た (Fig 14A-D)。また上記の 4 遺伝子の内、ヒトパラフィン包埋標本の免疫組織蛍光染色に使用可能であった *MSX1* の大腸、胃の粘膜下層組織および漿膜下層組織における発現の局在と強度をタンパク質レベルで検討した。その結果、粘膜下層組織内と比較して、漿膜下層組織内の線維芽細胞様細胞における *MSX1* の核内発現が有意に高く、*MSX1* は *in vivo* においても SPFs に特徴的に発現していることが示された (Fig 14E, F)。

## (v) 考察

本研究では、ヒトの様々な臓器に由来する線維芽細胞を用いることで、全身臓器に存在する線維芽細胞における詳細な遺伝子発現情報を示した。まず我々は全身臓器に由来する線維芽細胞における臓器依存的な遺伝子発現パターンを示し、その中でも GIFs は特殊かつ多様な線維芽細胞集団であることを見出した。GIFs における臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の多様性は主として、“Transcriptional regulation”、“Signal ligands” や “Extracellular matrix remodeling” に関連する遺伝子群により構成されていた。本研究で得られた線維芽細胞における遺伝子発現情報は、全身臓器を広範かつ系統的に検討した唯一の報告であり、GIFs における多様な遺伝子発現パターンを示す直接的な根拠を提供した。

線維芽細胞の果たす役割の一つとして、種々の細胞外マトリクスの産生、分解が挙げられる。線維芽細胞は細胞外マトリクスを産生することで臓器構造を支持するだけでなく、細胞外マトリクスの構築する機械的環境は上皮細胞など、他の細胞種に影響することで臓器恒常性に寄与していることが知られている[24]。本研究において、各臓器に由来する線維芽細胞は、コラーゲン類、マイクロフィブリル類、グリコプロテイン類、プロテオグリカン類や MMPs 類の遺伝子発現が異なっていた。従って線維芽細胞は、臓器および解剖学的部位固有の機械的環境を構築することで、各臓器に特異的な生理的機能の維持に寄与していることが示唆される。

また胚発生の過程において線維芽細胞は、上皮細胞などの他細胞種を臓器や組織特有の形

質へと領域化する。特に消化管臓器において臓器固有の機能に直接的に寄与するのは上皮細胞であるが、その上皮細胞の臓器特異的な領域性を制御しているのは線維芽細胞を始めとする間葉系細胞であることが知られる[25-28]。本研究では、GIFs における Homeobox 遺伝子などの転写因子の臓器依存的な発現パターンが観察された。この Homeobox 遺伝子の発現パターンは、マウスやニワトリの胚発生期の間葉系組織における HOX 遺伝子の発現パターンに類似していたことから[29, 30]、線維芽細胞における臓器依存的な遺伝子発現は胚発生の過程で獲得されることが示唆された。このような臓器固有な線維芽細胞は、胚発生の過程において消化管の領域化に寄与していると考えられる。また、臓器や解剖学的部位特異的な線維芽細胞は、胚発生期のみならず、生体を構成する細胞の部位特異的な分化に影響することが報告されている[31-33]。従って本研究で明らかとされた GIFs の臓器依存的な多様性は、成人の消化管臓器に存在する幹細胞の臓器特異的な分化に対しても寄与している可能性がある。

更に GIFs において解剖学的部位による液性因子(増殖因子、ケモカインやサイトカイン、Wnts、BMPs や TGF $\beta$  シグナルのリガンド)の発現の違いが観察された。消化管組織において上記の液性因子は、上皮細胞、筋細胞の増殖や免疫細胞の動員により組織恒常性の維持に寄与することが知られる[34-37]。消化管臓器において粘膜下層組織は、粘膜固有層直下の粘膜筋板と固有筋層の2つの平滑筋からなる組織構造に挟まれて存在している。従って粘膜下層組織に局在する SMFs に特徴的に発現する液性因子は、これらの平滑筋細胞の恒常性にも寄与する可能性がある。また創傷治癒といった特殊な生理環境下において、漿膜下層に存在する間質細胞は粘膜上皮の創傷部に遊走し、非古典的 Wnt シグナルを介して上皮細胞の形態

形成や増殖に寄与することが報告されている[38-40]。以上のことから、消化管臓器の各解剖学的部位に存在する線維芽細胞はそれぞれが独立した生理的機能を有し、異なるシグナル伝達を介して消化管臓器の恒常性維持に寄与している可能性がある。

本研究で検討した全ての SMFs は典型的な GIFs 様の遺伝子発現パターンを示したのに対し、16 サンプル中 8 サンプルの SPFs は Non-GIFs 様の遺伝子発現パターンを示した (Fig 4B)。ヒトの漿膜および腹膜組織は、解剖学的に臓側腹膜と壁側腹膜と呼ばれる 2 つ領域に区別される。消化管臓器を構成する腹膜組織の大部分は臓側腹膜から構成されるが、食道外膜や十二指腸の腸間膜は壁側腹膜から構成される。また、腹膜組織は組織学的にも多様である。例えば、胃の漿膜下層組織は脂肪成分が少なく薄い組織構造を示すのに対し、大腸の漿膜下層組織は脂肪成分が豊富で厚い組織構造を示す。このような、解剖学的、組織学的な漿膜組織の不均一性が、SPFs における遺伝子発現の多様性と関連している可能性がある。更に興味深いことに、Non-GIFs 様の遺伝子発現を示した SPFs は VAFs と類似した遺伝子発現パターンを示した。解剖学的に漿膜下層組織と血管外膜組織は連続性があり、両者は豊富なエラスチン成分を含むという組織学的な類似性を示す[41]。我々は以前に、大腸の SPFs や VAFs は強い造腫瘍能を有することを示しており[9, 13]、SPFs や VAFs は特殊な病理学的機能を有する線維芽細胞の集団であると考えられる。従って本研究で得られた線維芽細胞の遺伝子発現情報は、胚発生や臓器恒常性の維持における線維芽細胞の生理的機能を理解するだけでなく、がんの進展などの病態病理学的な研究を行う上でも有用な知見になりうる。

## (vi) 結論

全身臓器に由来する線維芽細胞の中でも GIFs は特殊な線維芽細胞の集団であり、臓器および解剖学的部位により分類できることを示した。これらの遺伝子発現の多様性は、転写制御因子、液性のシグナルリガンドや細胞外マトリクスの産生、分解に関連する遺伝子発現により構築されていた。臓器や解剖学的部位依存的な遺伝子発現パターンと胚発生との関連性が示され、各臓器の線維芽細胞はその臓器固有の微小環境を構築することで組織恒常性の維持に寄与していることが示唆された。本研究の成果は、線維芽細胞の果たす生理的、病態病的な働きを理解する上で重要な概念を提供し、また将来の臓器再生研究に関するリソースとなることが期待される。

#### IV. 臓器および解剖学的部位特異的な線維芽細胞が上皮細胞に与える影響の検討

##### (i) 背景

腸管臓器の上皮は 3~4 日の短いサイクルで再生を繰り返す組織である。この腸上皮の脱落と再生のサイクルを支持しているのは、腸上皮の陰窩領域に存在する組織幹細胞と増殖性の上皮細胞である。陰窩底部領域に存在する腸上皮幹細胞は主として、吸収上皮、杯細胞（粘液産生細胞）、内分泌細胞およびパネート細胞の 4 種類の分化型腸上皮細胞を産生する。これらの細胞種の内、腸上皮の幹細胞ニッチである陰窩領域には腸上皮幹細胞、パネート細胞や増殖性上皮細胞が局在し、分化細胞領域である絨毛領域には吸収上皮、杯細胞や内分泌細胞が局在している (Fig 15)。このような腸上皮の分化様式の研究を行うための、細胞株を用いた *in vitro* 分化モデルが提唱されてきた。その一つとして、ヒト由来の細胞株を用いた分化モデルである Caco-2 細胞の単層培養モデルが挙げられる。Caco-2 細胞はヒト結腸がん由来のがん細胞株であるが、コンフルエント状態にて長期培養を行うことで小腸上皮細胞様に分化する。長期培養により Caco-2 細胞は、細胞極性や発達した微絨毛を獲得し、二糖類分解酵素やペプターゼといった小腸上皮に特徴的な消化酵素を産生する[42]。

腸上皮は周囲の微小環境の支持により、その恒常性を維持している。例えば、基底膜マトリクス成分であるラミニン I の存在下において、腸上皮は  $\beta$ 1-インテグリンを介したシグナル伝達により分化および消化酵素の産生が亢進すること[43]、免疫細胞の一種である M2 型の

マクロファージとの共培養により腸上皮の分化が亢進することが報告されている[44]。腸管臓器に存在する線維芽細胞も腸上皮に影響を与える微小環境として知られる。特に陰窩領域の腸上皮の近傍に存在する線維芽細胞は、各種増殖因子やサイトカインなど様々な液性因子を傍分泌することで、腸上皮の幹細胞性の維持、増殖や分化に寄与する[35-37]。また小腸由来線維芽細胞は Caco-2 細胞の分化や増殖に寄与することが報告されている[45]。

本論の III 章において我々は、ヒト成人から採取された GIFs は、胚発生と関連した臓器依存的な多様性を有することを示した。線維芽細胞を始めとする間葉系細胞による上皮細胞の領域特異的な分化は、胚発生の過程でも示されている現象である[25-28]。従って、臓器や解剖学的部位特異的な線維芽細胞は、成人臓器の上皮細胞における分化や増殖に対して寄与していることが示唆される。しかしながら、消化管の各臓器に由来する線維芽細胞が、消化管の上皮細胞に対して与える影響の違いについては、ほとんど明らかでない。

## (ii) 目的

本研究の目的は、消化管を構成する臓器および解剖学的部位特異的な線維芽細胞が、腸管上皮細胞モデルである Caco-2 細胞の分化や増殖に与える影響を検討することである。研究は以下の手順で行った。

1. Caco-2 細胞と線維芽細胞とを長期間共培養が可能な 3 次元共培養系を作製し、3 次元培養下において小腸線維芽細胞が Caco-2 細胞の分化や増殖に与える影響を遺伝子およびタンパク質発現から評価した。
2. Caco-2 細胞と腸管臓器由来の線維芽細胞（十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs）または非腸管臓器由来の線維芽細胞（食道、胃の SMFs および SPFs）を 3 次元培養条件下で共培養し、各線維芽細胞が Caco-2 細胞の分化や増殖に与える影響を検討した。
3. III 章で明らかとした GIFs の遺伝子発現情報から、Caco-2 細胞の分化や増殖に影響を与える機能分子の候補を選出し、その分子の機能性を検討した。



### (iii) 実験材料および実験方法

#### (1) 細胞培養および Caco-2 細胞の分化誘導実験

使用した細胞株は、Caco-2 細胞（ヒト結腸低分化がん細胞株; ATCC）、293T 細胞（ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株; ATCC）および III 章で採取した 10 種類の GIFs（EsSMFs, EsSPFs, StSMFs, StSPFs, DuSMFs, DuSPFs, ILSMFs, ILSPFs, CoSMFs, CoSPFs）である。Caco-2 細胞は DMEM に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地、293T 細胞は RPMI1640 に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。線維芽細胞の初代培養および継代維持の方法については、P.18-19 に前述した。

Caco-2 細胞の 2 次元および 3 次元での分化誘導実験は以下の手順で行った。2 次元共培養として 6 well culture plate (BD Falcon) に 3.0 ml の 10% FBS DMEM を添加し、0.4 μm ポアの Cell Culture Insert (BD Falcon) を各 well にセットした。Cell Culture Insert の上層に直接  $1.5 \times 10^5$  個の Caco-2 細胞を 1.0 ml の 10% FBS DMEM 培地に懸濁、播種したものを 2 次元分化誘導群、Cell Culture Insert の上に 2.0 ml の I 型コラーゲングル（新田ゼラチン）を重合させた後、コラーゲングル上に  $1.5 \times 10^5$  個の Caco-2 細胞を播種したものを 3 次元分化誘導群とした。Insert の下層および上層の培地は 2 日毎に交換、培養は最大 21 日間行い、培養 3, 7, 14, 21 目の total RNA およびホルマリン固定サンプルを回収した。また、コラーゲングル内に  $1.0 \times 10^5$  個 / ml ( $2.0 \times 10^5$  個 / well) の GIFs を包埋した後、 $1.5 \times 10^5$  個の Caco-2 細胞を播種したものを線維芽細胞との 3 次元共培養群とした。線維芽細胞

との共培養は 14 日間行い、ホルマリン固定サンプルを回収した。Caco-2 細胞単独 3 次元培養群に対する recombinant *CXCL12/SDF1* (r*CXCL12/SDF1*: R&D Systems) の添加は Caco-2 細胞の播種翌日から開始し、培養 14 日目まで 2 日毎に 50 ng/ml r*CXCL12/SDF1* + 10% FBS + DMEM を添加した。

## (2) Total RNA およびホルマリン固定サンプルの回収方法

Caco-2 細胞の 3 次元培養からの total RNA は以下の方法で回収した。培養から 3, 7, 14, 21 日目のコラーゲンゲルを、シリンジ針を用いて Insert より外した。PBS で洗浄後、コラーゲンゲルの半量を滅菌鋏により切り離し、1.0 ml の TRIzol reagent に浸漬し、TissueLyser を用いてコラーゲンゲルをホモジナイズした。また、Caco-2 の 2 次元培養からの total RNA は、Cell Culture Insert を PBS により洗浄後、Insert に 1.0 ml の TRIzol reagent を添加し、ピペッティングを行うことで回収した。回収した TRIzol reagent からの total RNA の精製法については P.22 に前述した。

Caco-2 細胞の 3 次元培養サンプルの固定には、10% 中性緩衝ホルマリン溶液を用いた。固定した標本は、Tissue-Tek VIP (サクラファインテックジャパン) および Tissue-Tek TEC (サクラファインテックジャパン) を用いてパラフィンブロックへと包埋した。

## (3) 定量的 RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA からの cDNA 逆転写および qRT-PCR の方法は、P.25 に前述した。本検討で用

いたプライマーの配列情報は Table 3 に示した。

### (3) 免疫細胞化学的染色

作製した Caco-2 細胞の 3 次元共培養のパラフィン包埋サンプルから、4.0  $\mu\text{m}$  厚の細胞切片を作製した。脱パラフィン処理の後、pH 6.7 のクエン酸 Buffer (LSI メディエンス) または pH 9.0 Tris-EDTA Buffer (Dako) で 95°C、20 分間の抗原賦活化処理を Microwave により行った。内因性ペルオキシターゼのブロッキングのため、3.0% の  $\text{H}_2\text{O}_2$  (和光純薬) メタノール溶液 (和光純薬) に浸漬し、室温で 30 分間反応させた。その後、切片を各一次抗体と 4°C、Overnight 条件で反応させた。二次抗体としては、goat anti-mouse IgG HRP (EnVision/HRP system: Dako) または goat anti-rabbit IgG HRP (EnVision/HRP system: Dako) を用い、室温で 30 分間反応させた。その後、3, 3'-diaminobenzidine (DAB: 和光純薬) を用いた化学発色を行うことで標的タンパク質を茶色に発色した。核の対比染色には、ヘマトキシリン (二倍法: 武藤化学) を用いた。本検討で用いた一次抗体の詳細は Table 1 に示した。

染色した細胞切片の高解像度画像は、NanoZoomer (浜松ホトニクス) を用いて撮影した。得られた画像データの解析は ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。各切片当たり 20 倍または 40 倍視野で 5 視野を無作為に選択し、視野内の Caco-2 細胞における各種マーカーの陽性細胞割合を算出した。

#### (4) マイクロアレイデータの統計解析

マイクロアレイデータの統計解析の方法については P.24-25 に前述した。

#### (5) 腸管線維芽細胞への shRNA ベクターの導入

レンチウイルスベクターを用いた回腸 SMFs への shRNA 導入は以下の手順で行った。ターゲット遺伝子に対する siRNA 配列の設計は siDirect 2.0 を用いて行った[46, 47]。設計したオリゴヌクレオチドの化学合成およびアニーリング反応を行うことで、Table 4. に示した相補配列を得た (siDirect を用いて設計した siRNA 配列部位を赤文字で示した)。得られた相補配列を XbaI および BglII 制限酵素で処理した pENTR4-H1 ベクター (RIKEN BioResource Center) にライゲーション (DNA Ligation Kit Ver.2.1: TAKARA) し、DH5 $\alpha$  (TOYOBO) へと形質導入することでエントリークローンを得た。得られたエントリークローンと CS-Rfa-EG (RIKEN BioResource Center) とのライゲーション反応を行い (Gateway LR Clonase: Life Technologies)、DH10B (Invitrogen) へと形質導入することで shRNA 発現用ベクターを得た。PCAG-HIV, pCMV-VSV-G-RSV-Rev および shRNA ベクターを 293T 細胞へとトランスフェクションすることで感染用のレンチウイルスを得た。トランスフェクションには LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen) を用いた。レンチウイルスベクターを含む 293T 細胞の培養上清は 0.45  $\mu$ m ポアのフィルター (Millex-HV: Millipore) により細胞成分を除去し、8  $\mu$ g/ml のポリブレン (Santa Cruz Biotechnology) を添加後、回腸 SMFs へと添加することで形質転換を行った。

## (6) 統計解析

2 サンプル間の比較については、F 検定により等分散の確認を行った後、スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行い、両側検定で  $P$  value が 0.05 未満であった場合に有意差があるとみなした。

#### (iv) 結果

(1) Caco-2 細胞は、コラーゲンゲル上における長期培養により腸上皮細胞様の分化を示す

まず Caco-2 細胞が 3 次元培養環境下においても、腸上皮細胞様の分化様式を示すかを検討するため、Caco-2 細胞の 2 次元および 3 次元培養を行い、培養 7, 14, 21 日目における腸上皮細胞の分化マーカーの発現を qRT-PCR により検討した。腸上皮細胞の分化関連遺伝子としては、Caco-2 細胞の 2 次元培養において継時的な発現変化が報告されている 4 遺伝子 (*CDX2*, *VIL1*, *SI*, *MYO1A*) を用いた [48]。その結果、2 次元培養群では培養 21 日目をピークに分化関連遺伝子の継時的な発現亢進を起こしたのに対して、3 次元培養群では培養 14 日目と 21 日目をピークとする発現変化が観察された (Fig 16)。更に、免疫細胞化学的染色を用いたタンパク質レベルでの検討においても、Caco-2 細胞の 3 次元培養における *CDX2* の陽性細胞割合は、培養 14 日目をピークとする継時的な発現変化が観察され、その発現は 21 日目まで維持されていた (Fig 17A, B)。また、3 次元培養における Caco-2 細胞の形態像は、培養 3 日目における横長の扁平状の形態像から、縦長の円柱状の形態像へと変化していく様子が観察された (Fig 17A: 上段)。形態像の変化と同様に、腸上皮細胞の刷子縁構成タンパク質である *CD10* の陽性細胞割合も、培養 3 日目から培養 21 日目にかけて継時的に増加した (Fig 17A: 下段, Fig17C)。これらの結果から、3 次元培養下において Caco-2 細胞は、2 次元培養下と同様に腸上皮様細胞へと分化することが示された。2 次元培養下と異なり *CDX2* を始めとする腸上皮細胞の分化関連マーカーの発現ピークは培養 14 日目であ

ったことから、以後の線維芽細胞との共培養実験の評価は共培養開始から 14 日目に行うことにした。

## (2) 回腸粘膜下層由来線維芽細胞は、Caco-2 細胞の腸細胞分化および増殖を促進する

小腸由来の線維芽細胞は Caco-2 細胞の分化や増殖を亢進することが報告されている。そこで、小腸線維芽細胞が Caco-2 細胞に対して与える影響を詳細に検討するため、Caco-2 細胞と回腸 SMFs (ILSMFs) との 3 次元共培養を行い (Fig 18A)、共培養 14 日目における分化マーカー (CDX2)、増殖マーカー (Ki-67)、そして成熟・機能性マーカー (MUC2: 杯細胞、CD10, ALPI, SI: 吸収上皮細胞、CHGA/B: 内分泌細胞、LYZ: パネート細胞) の発現を免疫化学的染色により検討した。その結果、ILSMFs と共培養した群では、Caco-2 における CDX2 および Ki-67 の陽性細胞割合が有意に増加した (Fig 18B, C, D, E)。一方、MUC2, CD10, ALPI, SI および CHGA/B の陽性細胞割合に変化はなかった (Fig 19)。また、LYZ 陽性細胞の存在は一つも認めなかった。これらの結果から、回腸 SMFs は Caco-2 細胞の腸細胞分化や増殖を促進するが、成熟や機能性の獲得には寄与しないことが示された。

## (3) Caco-2 細胞に対する分化および増殖の促進作用は、腸管線維芽細胞に特徴的である

GIFs を構成する臓器および解剖学的部位特異的な線維芽細胞が、Caco-2 細胞の分化や増殖に与える影響の違いを検討するため、Caco-2 細胞と 10 種類の GIFs (食道、胃、十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs) の 3 次元共培養を行った。その結果、Caco-2 細胞

を単独で培養した群と比較して、腸管臓器由来の線維芽細胞（十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs）と共培養した群において *CDX2* および *Ki-67* 陽性細胞割合の有意な増加が観察された (Fig 20)。これらの発現変化は、非腸管臓器由来の線維芽細胞（食道、胃の SMFs および SPFs）と共培養した群では認められなかった。この結果から、線維芽細胞による Caco-2 細胞の分化および増殖の亢進は、腸管臓器由来の線維芽細胞に特徴的な性質であることが示唆された。

(4) 腸管線維芽細胞に特徴的に発現する *CXCL12/SDF1* は、Caco-2 細胞の分化および増殖を促進する

腸臓器由来の線維芽細胞が Caco-2 細胞の分化および増殖を促進する分子機序を明らかにするため、非腸臓器由来の線維芽細胞と比較して、腸臓器由来の線維芽細胞において特徴的に発現が認められる遺伝子群をマイクロアレイデータから選出し、結果 33 probe sets が同定された (Table 5)。これら 33 probe sets の中には、“Transcriptional regulation” に関与する遺伝子が 10 probe sets (*NKX2-3*, *MAB21L2*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXD4*, *HOXD-AS2*, *TLE2*, *HLX*, *TCF4*)、 “Signal ligands” に関与する遺伝子が 2 probe sets (*CXCL12*)、 “Extracellular matrix remodeling” に関与する遺伝子が 1 probe sets (*LUM*) 含まれていた。本研究に用いた 2 次元共培養系がコラーゲンを介した非接触の実験系であったため、同定された遺伝子群の内、唯一の液性因子であった *CXCL12 (SDF1)* に着目した。

*CXCL12/SDF1* が Caco-2 細胞の分化や増殖を亢進するかを検証するため、*CXCL12/SDF1*



の recombinant protein (r*CXCL12/SDF1*) の Caco-2 細胞の単独培養群への添加実験を行った。

その結果、無添加群と比較して、r*CXCL12/SDF1* の添加により Caco-2 細胞における *CDX2*

および *Ki-67* 陽性細胞割合が有意に増加した (Fig 21)。

(5) 腸管線維芽細胞への shRNA ベクター導入による *CXCL12/SDF1* のノックダウンにより、

Caco-2 細胞の分化および増殖の亢進が阻害される

Caco-2 細胞の分化および増殖の亢進に対する、腸管線維芽細胞の産生する *CXCL12/SDF1* の影響を検討するため、回腸 SMFs に sh*CXCL12* ベクターを導入し、RNAi によって恒常的に *CXCL12/SDF1* の発現が抑制される初代培養の腸管線維芽細胞を得た (Fig 22A)。

sh*CXCL12* を導入した回腸 SMFs と Caco-2 細胞との共培養を行い、14 日目における *CDX2* および *Ki-67* 陽性細胞割合を算出した。その結果、*CXCL12/SDF1* の発現抑制により、腸管線維芽細胞による Caco-2 細胞に対する *CDX2* および *Ki-67* の発現亢進が阻害された (Fig 22B, C および Fig 23A, B)。

(6) 腸管線維芽細胞において *NKX2-3* は *CXCL12/SDF1* の転写制御や Caco-2 細胞に対する

分化および増殖の亢進に関与しない

最後に、*CXCL12/SDF1* が腸管線維芽細胞に特徴的に発現する機序を明らかにするため、腸管線維芽細胞で特異的に発現していた転写制御因子の内、最も発現倍率が大きい遺伝子であった *NKX2-3* の shRNA ベクターを回腸 SMFs に導入したノックダウン実験を行った (Fig

24A)。しかしながら、*NKX2-3* の発現抑制は、*CXCL12/SDF1* の発現 (Fig 24B) や、Caco-2 細胞に対する *CDX2*, *Ki-67* の発現亢進 (Fig 24C, D) に影響しなかった。従って *NKX2-3* は、*CXCL12/SDF1* を介した腸管線維芽細胞による Caco-2 細胞の分化や増殖の亢進に関与しないことが示された。

## (v) 考察

本研究では、腸上皮細胞株である Caco-2 細胞とヒト消化管を構成する臓器および解剖学的部位特異的な GIFs との 3 次元共培養を行うことで、GIFs の中でも腸管臓器に由来する線維芽細胞のみが Caco-2 細胞の分化および増殖を亢進することを示した。また、III 章で明らかとした GIFs の遺伝子発現情報の中から、腸管線維芽細胞に特異的に発現する *CXCL12/SDF1* が Caco-2 細胞の分化および増殖を亢進する機能分子であることを初めて明らかとした。

腸管線維芽細胞は、Caco-2 細胞における *CDX2* および *Ki-67* の発現を亢進することを見出した。*CDX2* は腸上皮の分化マーカーとして用いられるマスター転写因子であり、陰窩領域底部の組織幹細胞を除く全ての腸上皮細胞に発現が認められる[49]。腸上皮において *Ki-67* 陽性細胞が局在するのは陰窩の増殖性上皮細胞領域である。腸上皮組織に発現する *CDX2* には、領域特異的な機能の多様性が報告されている。腸上皮の陰窩領域において *CDX2* は腸上皮細胞の増殖を促進し、一方絨毛領域においては消化酵素の発現に寄与する[50, 51]。本研究において腸管線維芽細胞は Caco-2 細胞における消化酵素 (*SI*) の発現には影響を与えなかったことから、腸管線維芽細胞は腸上皮における増殖性上皮細胞の拡大に寄与していると考えられる。

腸管粘膜組織には増殖因子、サイトカインや細胞外マトリクスなどの様々な液性因子が存在し、これらの液性因子は腸上皮細胞の未分化性の維持や増殖に寄与することで腸管臓器の

恒常性維持に関与する。例えば、*TGF*, *IGF*, *HGF*, *FGF* や *KGF* といった増殖因子は、*in vitro* および *in vivo* で腸上皮細胞の分化や増殖に寄与することが報告されている[52-56]。この内、*TGF*, *HGF* や *KGF* などの液性因子は腸管線維芽細胞において発現が認められ、線維芽細胞はこれらの液性因子を産生することで腸上皮細胞の分化や増殖を亢進する[45, 57, 58]。また、線維芽細胞による腸上皮細胞の分化および増殖への影響は、線維芽細胞の由来臓器により異なることが報告されている。胃や皮膚組織に由来する線維芽細胞と比較して、腸管臓器に由来する線維芽細胞は腸上皮細胞の分化や増殖を強く促進する[58, 59]。これらの報告は、我々の実験結果と矛盾しない。しかしながら、これらの先行研究では、何故腸管線維芽細胞が特徴的に腸上皮細胞の分化や増殖を促進するのか、その機序は不明であった。これに対し我々は、過去に報告した各臓器の線維芽細胞における遺伝子発現の網羅的解析データから、腸管線維芽細胞に特徴的に発現する液性因子である *CXCL12/SDF1* を同定することに成功した。

*CXCL12/SDF1* は、主としてリンパ球や血管内皮細胞の遊走や活性化に関わるケモカインリガンドであり、そのレセプターとして *CXCR4* が知られる[60-62]。*CXCR4* は、脳、骨髄、血球細胞や腸管臓器において発現し[63, 64]、腸管臓器の中では腸上皮細胞における発現が報告されている[65]。*In vitro* の腸上皮細胞における *CXCR4* の発現抑制は、腸上皮細胞の *CXCL12/SDF1* 依存性の遊走を阻害する[66, 67]。また、*in vivo* における *CXCR4* の腸上皮特異的なノックアウトは、DSS 誘導性の腸潰瘍における再上皮化を阻害する[68]。すなわち、これまで *CXCL12/SDF1* は腸上皮細胞の遊走に寄与することが知られていた。本研究では、*CXCL12/SDF1* が腸上皮細胞の遊走だけでなく *CDX2* や *Ki-67* の発現を亢進する機能分子

であることを初めて見出した。また、*CXCL12/SDF1-CXCR4* の下流シグナルとしては、MEK/ERK シグナルや PI3K/Akt シグナルが知られる[69]。これらのシグナルは共に腸上皮細胞の増殖を亢進する[70]。一方で、*CDX2* の発現について MEK/ERK および PI3K/Akt シグナルは、発現亢進および発現抑制の双方に寄与する報告が成されている[71-73]。本研究で観察された *CXCL12/SDF1* による Caco-2 細胞における *CDX2* および *Ki-67* の発現亢進について、今後その下流シグナルを含めた詳細な分子機序の解明が必要と考える。

最後に、我々は *CXCL12/SDF1* が腸管線維芽細胞に特徴的に発現する分子機序の解明を試みた。ヒト皮膚線維芽細胞において、Homeobox 遺伝子は部位特異的な遺伝子発現パターンを制御するマスター転写因子であることが報告されている[32]。我々が着目した転写因子である *NKX2-3* はマウスやニワトリの脾臓および腸管臓器の間質において特徴的に発現する Homeobox 遺伝子であり、マウスにおける *NKX2-3* の機能欠失は腸管間質の減少や腸管粘膜構造の異常を引き起こす[74, 75]。従って、腸管間質における *NKX2-3* の機能性が予想される。しかしながら、本研究にて腸管線維芽細胞に発現する *NKX2-3* の機能性は確認されず、*CXCL12/SDF1* の発現制御機構の解明には至らなかった。III 章で得られた線維芽細胞において *CXCL12/SDF1* は、腸管線維芽細胞だけでなく、Non-GIFs の肝臓、胆嚢や肺の線維芽細胞においても発現が認められた (Supp Fig 4A)。そこで、63 種の線維芽細胞において *CXCL12/SDF1* と相関関係を認める probe sets を探索した結果 1 probe sets が同定されたが、上記因子は転写制御因子ではなかった ( $R^2 > |0.6|$ , Supp Fig 4B)。従って *CXCL12/SDF1* の発現制御は、Homeobox 遺伝子のようなマスター転写因子以外の転写制御に依存している可能

性が推察される。今後、腸管線維芽細胞特異的な *CXCL12/SDF1* の発現制御機構について、ユビキチン化による転写因子の修飾やエピジェネティクスな制御といった転写因子の遺伝子発現に依存しない機序も視野に入れて検討を行うべきと考える。

## (vi) 結論

消化管由来の線維芽細胞において、腸管臓器に由来する線維芽細胞のみが腸上皮細胞株である Caco-2 細胞の分化および増殖に寄与することを示した。更にその分子機序として、腸管線維芽細胞が特徴的に産生する液性因子である *CXCL12/SDF1* が機能分子として働くことを明らかとした。本研究の成果は、腸管臓器の恒常性維持における線維芽細胞の働きに関する新しい知見を提供する。また、各臓器の線維芽細胞は液性因子等の産生を介し、その臓器固有の微小環境を構築することで組織恒常性の維持に寄与している可能性が支持された。

## V. 総合考察

### (i) 臓器依存的な線維芽細胞の多様性

本研究では、線維芽細胞における遺伝子発現プロファイルの解析により、由来臓器や解剖学的部位に依存した線維芽細胞の多様性を見出した。またその中でも、腸管臓器に由来する線維芽細胞が腸上皮の恒常性維持に寄与する可能性を示した。このような臓器固有の線維芽細胞による臓器の機能性獲得や維持については、腸管臓器以外の臓器でも報告されている。胃の間葉系組織に特異的に発現する *Barx1* は *Dkk1* や *Sfrp* の発現を誘導することにより、胃の内胚葉組織における *Wnt* シグナルを抑制することで、胃特異的な上皮細胞の分化を誘導すると報告されている[76-78]。腸管臓器や胃の線維芽細胞と同様に、他の臓器においても臓器特異的な間質細胞による恒常性維持機構が存在することが示唆される。本研究で得られた線維芽細胞における液性因子、細胞外マトリクスなどの臓器特異的な遺伝子発現情報は、生体臓器の恒常性維持や発生過程における、臓器特異的な上皮-間葉相互作用を解明する上で重要な知見となることが期待される。

また各臓器に固有の線維芽細胞は、その臓器固有の疾患等にも関与している可能性がある。例えば我々のデータにおいて、肝臓および胆嚢の線維芽細胞では、多くのサイトカインやケモカインの発現が顕著に高い傾向を示した (Supp Fig 5)。肝臓や胆嚢の線維芽細胞は星細胞とも呼ばれ、肝臓や胆嚢の炎症や線維化との関与が知られる[22, 23, 79]。一方で、線維芽細胞と炎症や線維化との関連は、肺や胃といった他の臓器でも報告されている[80, 81]。炎症性サ



イトカインの発現が内因性に高い肝臓や胆嚢の線維芽細胞とその他の臓器の線維芽細胞とでは、炎症における役割やその分子機序が異なる可能性が考えられる。今後、線維芽細胞を LPS やサイトカインなどの炎症惹起性因子で刺激しその応答性を検討することで、各臓器の炎症における線維芽細胞の役割の違いが明らかとなる可能性がある。

#### (ii) 消化管の解剖学的部位特異的な線維芽細胞

我々は線維芽細胞の臓器依存的な多様性のみならず、消化管の同一臓器内の解剖学的部位にも依存して線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルが異なることを明らかとした。しかしながら Caco-2 細胞を用いた分化アッセイにおいては、SMFs と SPFs の間に機能的な違いを認めなかった。従って SMFs と SPFs の解剖学的部位特異的な線維芽細胞には、その臓器の機能や恒常性の維持以外の役割もあると考えられる。この点について我々は、SMFs や SPFs と大腸がんの進展との関連性を報告してきた(小嶋、横田、樋口らの共同研究)。大腸の SMFs および SPFs を大腸がん細胞株である DLD-1 の培養上清で刺激すると、SMFs と比較して SPFs において多くの遺伝子発現の変化が観察され、SPFs は大腸がん細胞に対して高い反応性を示すことが示唆された (Supp Fig 6A)。また SMFs および SPFs を DLD-1 とマウス皮下に共移植すると SPFs においてより強い腫瘍形成能が確認された (Supp Fig 6B) [13]。更に DLD-1 で刺激した際に SPFs において特徴的に発現する遺伝子 (SPFs Cancer-Cell-Conditioned Medium: SPF-CCCM signature) のヒト大腸がん組織 (GSE14333, [82]) における発現パターンを検討したところ、SPF-CCCM signature が高発現する集団が確認され

た (Supp Fig 6C)。SPFs-CCCM signature の発現が高い大腸がん患者は有意に予後不良であり、高反応性の線維芽細胞とがん生物像との関連性が示唆された (Supp Fig 6D) [83]。以上の結果から、消化管組織において SPFs は、がんなどの疾患の際に特殊な役割を果たす線維芽細胞集団であると推察される。また興味深いことに、本研究で得られた SPFs において、腹膜を構成する上皮細胞である中皮細胞に特徴的な転写因子 *WT1* の高発現が認められた (Fig 6B)。一般的に *WT1* は中皮細胞のマーカーとして用いられるが、本論で採取した SPFs は、他の中皮細胞マーカーである *Calretinin* が陰性であり、紡錘形の形態像を示すことから中皮細胞ではないと考えられる。大腸がんや炎症性潰瘍の創傷治癒において、*WT1* 陽性間質細胞はがんの進展や創傷治癒に寄与することが報告されている[40, 84]。従って、SPFs は創傷治癒過程に対しても寄与する可能性がある。

### (iii) 線維芽細胞における臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の獲得機序

本研究で用いたヒト由来線維芽細胞は全て成人由来であるにも関わらず、GIFs における臓器依存的な遺伝子発現パターンは、胚発生期の間葉系組織における遺伝子発現と関連していた。胚発生の過程において原腸組織の各消化管臓器への領域化は、分節化された脊索組織からのモルフォゲン産生により決定する[29]。消化管の上皮細胞、SMFs、SPFs が類似した頭尾軸依存的な多様性を有していたことから、これらの細胞は共通のモルフォゲンの影響により分化していると考えられる。実際、多能性幹細胞を *Shh*, *Dkk1* および *Noggin* による共通の液性因子で処理することにより、成熟した胃上皮細胞と *Barx1* 陽性の胃特異的間質細胞の両

者を同時に分化できることが報告されている[78]。

線維芽細胞における部位特異的な遺伝子発現の制御に対する、Homeobox 遺伝子を始めとする転写因子の部位特異的な発現パターンの関与が知られる[3]。本研究においても、線維芽細胞における臓器特異的な転写因子（Homeobox 遺伝子、*GATA*、*FOX*、*TBX*、*EBF* など）の発現パターンを認めた（Supp Fig 5）。これらの転写因子は、線維芽細胞における臓器および解剖学的部位特異的な遺伝子発現プロファイルの制御に寄与していると考えられる。一方で、腸管線維芽細胞に特徴的に発現していた *CXCL12/SDF1* のように、転写因子による発現制御を必ずしも受けていないと考えられる遺伝子の存在も認めた（Supp Fig 4）。線維芽細胞における部位特異的な遺伝子発現には DNA メチル化、lncRNA、miRNA などのエピジェネティックな発現制御も報告されており[32, 85-87]、*CXCL12/SDF1* のような遺伝子の発現への関与が推察される。

また本研究で使用した線維芽細胞は、多数の細胞により構築される細胞集団である。*In vitro* における線維芽細胞は異なる性質の細胞から構築される不均一な細胞集団であり[88-90]、その中には臓器や組織常在性の集団と骨髄などから動員された異所由来の集団が存在する[91]。本論 III 章において GEC に集積する SPFs と NGEC に集積する SPFs が存在することを示したが、興味深いことに上記の 2 種類の SPFs の間で発現が顕著に異なる遺伝子として、SMFs 特異的遺伝子 *PITX1* が観察された（Supp Fig 7）。免疫蛍光染色を用いた解析から、NGEC に集積する胃 SPFs には *PITX1* 陽性細胞集団の存在を認めるのに対して、GEC に集積する大腸 SPFs ではほとんど認めなかった（Fig 11C）。すなわち、SPFs という線維芽細胞

集団における遺伝子発現に対して、細胞集団内の不均一性が影響を与えていることが示唆される。今後、各臓器や解剖学的部位に特異的な線維芽細胞を濃縮する細胞表面抗原の探索や細胞寿命延長技術を用いた単細胞クローンの作製により、部位特異的な線維芽細胞における遺伝子発現制御や機能の詳細な機序の解析が可能になると期待される。

## VI. 結論

ヒト線維芽細胞はその遺伝子発現情報を基に臓器および解剖学的部位毎に分類されることを示した。このような臓器および解剖学的部位特異的な線維芽細胞の性状が、臓器恒常性の維持やがんの進展に関わることを示した。線維芽細胞における液性因子の発現の多様性は上皮細胞などの他細胞種との相互作用に寄与し、転写因子の発現は臓器固有の遺伝子発現プロファイルの制御に関与すると考えられた。本研究で得られた成果は、ヒト全身臓器における恒常性維持やがんの進展のみならず、胚発生、創傷治癒や炎症といった間質細胞が関与するあらゆる現象を理解する上で重要な基礎的情報となることが期待される。

## VII. 参考文献

1. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392–401. Epub 2006/03/31. doi: 10.1038/nrc1877 pmid:16572188.
2. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol*. 2012;180(4):1340–55. Epub 2012/03/06. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004 pmid:22387320; PubMed Central PMCID: PMC3640252.
3. Rinn JL, Wang JK, Liu H, Montgomery K, van de Rijn M, Chang HY. A systems biology approach to anatomic diversity of skin. *J Invest Dermatol*. 2008;128(4):776–82. Epub 2008/03/14. doi: 10.1038/sj.jid.5700986 pmid:18337710.
4. Kaye GI, Lane N, Pascal RR. Colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. II. Fine structural aspects of normal rabbit and human colon. *Gastroenterology*. 1968;54(5):852–65. Epub 1968/05/01. pmid:5652519.
5. Beswick EJ, Johnson JR, Saada JI, Humen M, House J, Dann S, et al. TLR4 activation enhances the PD-L1-mediated tolerogenic capacity of colonic CD90+ stromal cells. *J Immunol*. 2014;193(5):2218–29. doi: 10.4049/jimmunol.1203441 pmid:25070848; PubMed Central PMCID: PMC4142442.
6. Witowski J, Tayama H, Ksiazek K, Wanic-Kossowska M, Bender TO, Jorres A. Human

peritoneal fibroblasts are a potent source of neutrophil-targeting cytokines: a key role of IL-1beta stimulation. *Lab Invest.* 2009;89(4):414–24. Epub 2009/02/04. doi: 10.1038/labinvest.2009.1  
pmid:19188907.

7. Witowski J, Thiel A, Dechend R, Dunkel K, Fouquet N, Bender TO, et al. Synthesis of C-X-C and C-C chemokines by human peritoneal fibroblasts: induction by macrophage-derived cytokines. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1441–50. Epub 2001/04/06. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64095-3  
pmid:11290562; PubMed Central PMCID: PMC1891925.

8. Hoshino A, Chiba H, Nagai K, Ishii G, Ochiai A. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):305–10. Epub 2008/01/31. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.090 pmid:18230345.

9. Hoshino A, Ishii G, Ito T, Aoyagi K, Ohtaki Y, Nagai K, et al. Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma tumor formation: podoplanin in fibroblast functions for tumor progression. *Cancer Res.* 2011;71(14):4769-79. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3228. PubMed  
PMID: 21610106.

10. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12877–82. Epub 2002/09/26. doi: 10.1073/pnas.162488599 pmid:12297622; PubMed  
Central PMCID: PMC130553.

11. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional

variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* 2006;2(7):e119. Epub 2006/08/10. doi: 10.1371/journal.pgen.0020119 pmid:16895450; PubMed Central PMCID: PMC1523235.

12. Janson DG, Saintigny G, van Adrichem A, Mahe C, El Ghalbzouri A. Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2012;132(11):2565–72. Epub 2012/06/15. doi: 10.1038/jid.2012.192 pmid:22696053.

13. Kojima M, Higuchi Y, Yokota M, Ishii G, Saito N, Aoyagi K, et al. Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. *PLoS One.* 2014;9(2):e88018. Epub 2014/02/08. doi: 10.1371/journal.pone.0088018 pmid:24505356; PubMed Central PMCID: PMC3913740.

14. Gimenez-Bastida JA, Martinez-Florensa M, Espin JC, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT. A citrus extract containing flavanones represses plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression and regulates multiple inflammatory, tissue repair, and fibrosis genes in human colon fibroblasts. *J Agric Food Chem.* 2009;57(19):9305–15. Epub 2009/09/05. doi: 10.1021/jf901983g pmid:19728713.

15. Chen W, Tang T, Eastham-Anderson J, Dunlap D, Alicke B, Nannini M, et al. Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9589–94. Epub 2011/05/21. doi: 10.1073/pnas.1017945108 pmid:21597001; PubMed Central PMCID: PMC3111273.

16. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis



initiation. *Cancer Cell*. 2012;22(5):571–84. Epub 2012/11/17. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013

pmid:23153532; PubMed Central PMCID: PMC3512565.

17. Balabanova S, Holmberg C, Steele I, Ebrahimi B, Rainbow L, Burdyga T, et al. The neuroendocrine phenotype of gastric myofibroblasts and its loss with cancer progression. *Carcinogenesis*. 2014;35(8):1798–806. doi: 10.1093/carcin/bgu086 pmid:24710625; PubMed Central PMCID: PMC4123646. Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*. 2010;29(12):1732–40. Epub 2010/01/12. doi: 10.1038/onc.2009.463 pmid:20062080; PubMed Central PMCID: PMC2845730.

18. Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*. 2010;29(12):1732–40. Epub 2010/01/12. doi: 10.1038/onc.2009.463 pmid:20062080; PubMed Central PMCID: PMC2845730.

19. Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, Nilsson B, Reinhardt F, Bray MA, et al. Human tumors instigate granulysin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(2):784–99. Epub 2011/01/27. doi: 10.1172/jci43757 pmid:21266779; PubMed Central PMCID: PMC3026724.

20. Gottschling S, Granzow M, Kuner R, Jauch A, Herpel E, Xu EC, et al. Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer—different from others? Insights from comparative molecular and

functional analyses. *Lung Cancer*. 2013;80(1):19–29. Epub 2013/01/09. doi:

10.1016/j.lungcan.2012.12.015 pmid:23294501.

21. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P, et al. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease. *PLoS One*. 2013;8(4):e59348. Epub 2013/04/09. doi: 10.1371/journal.pone.0059348 pmid:23565148; PubMed Central PMCID: PMC3614979.

22. Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1988;56(1):45–9. Epub 1988/01/01. pmid:2907200. doi: 10.1007/bf02890000

23. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology*. 2012;143(4):1073–83.e22. Epub 2012/07/04. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.036 pmid:22750464; PubMed Central PMCID: PMC3848328.

24. Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(5):911–20. Epub 2009/04/03. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.01.012 pmid:19339214.

25. McLin VA, Henning SJ, Jamrich M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2074–91. Epub 2009/03/24. doi:

10.1053/j.gastro.2009.03.001 pmid:19303014.

26. Pispá J, Thesleff I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol.* 2003;262(2):195–205.

Epub 2003/10/11. pmid:14550785. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00325-7

27. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev.* 2000;92(1):55–81. Epub 2000/03/08.

pmid:10704888. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00325-1

28. Takashima S, Gold D, Hartenstein V. Stem cells and lineages of the intestine: a developmental and evolutionary perspective. *Dev Genes Evol.* 2013;223(1–2):85–102. Epub 2012/11/28. doi:

10.1007/s00427-012-0422-8 pmid:23179635; PubMed Central PMCID: PMC3873164.

29. Roberts DJ. Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev Dyn.* 2000;219(2):109–20. doi: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1047>3.0.CO;2-6.

PubMed PMID: 11002332.

30. Kawazoe Y, Sekimoto T, Araki M, Takagi K, Araki K, Yamamura K. Region-specific gastrointestinal Hox code during murine embryonal gut development. *Dev Growth Differ.*

2002;44(1):77–84. Epub 2002/03/01. pmid:11869294. doi: 10.1046/j.1440-169x.2002.00623.x

31. Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, Hosokawa K, Miura H, Yoshikawa K. Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):483–8. Epub 1999/04/14. doi:

10.1046/j.1523-1747.1999.00544.x pmid:10201533.

32. Rinn JL, Wang JK, Allen N, Brugmann SA, Mikels AJ, Liu H, et al. A dermal HOX transcriptional program regulates site-specific epidermal fate. *Genes Dev.* 2008;22(3):303–7. Epub 2008/02/05. doi: 10.1101/gad.1610508 pmid:18245445; PubMed Central PMCID: PMC2216690.
33. Kurashima Y, Amiya T, Fujisawa K, Shibata N, Suzuki Y, Kogure Y, et al. The enzyme *cyp26b1* mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity.* 2014;40(4):530–41. Epub 2014/04/15. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.014 pmid:24726878.
34. Nair DG, Miller KG, Lourenssen SR, Blennerhassett MG. Inflammatory cytokines promote growth of intestinal smooth muscle cells by induced expression of PDGF-R $\beta$ . *J Cell Mol Med.* 2014;18(3):444–54. doi: 10.1111/jcmm.12193 pmid:24417820; PubMed Central PMCID: PMC3955151.
35. Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:213–37. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100646 pmid:21054163; PubMed Central PMCID: PMC3754809.
36. Farin HF, Van Es JH, Clevers H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology.* 2012;143(6):1518–29.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2012.08.031 pmid:22922422.
37. Kabiri Z, Greicius G, Madan B, Biechele S, Zhong Z, Zaribafzadeh H, et al. Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development.* 2014;141(11):2206–15. doi: 10.1242/dev.104976 pmid:24821987.

38. Wilm B, Ipenberg A, Hastie ND, Burch JB, Bader DM. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development*. 2005;132(23):5317–28. doi: 10.1242/dev.02141 pmid:16284122.

39. García-Arrarás JE, Valentín-Tirado G, Flores JE, Rosa RJ, Rivera-Cruz A, San Miguel-Ruiz JE, et al. Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*. *BMC Dev Biol*. 2011;11:61. doi: 10.1186/1471-213X-11-61 pmid:22004330; PubMed Central PMCID: PMC3207902.

40. Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, Yamaguchi TP, Stappenbeck TS. Wnt5a potentiates TGF- $\beta$  signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science*. 2012;338(6103):108–13. doi: 10.1126/science.1223821 pmid:22956684; PubMed Central PMCID: PMC3706630.

41. Darryl C, Lawrence T, Christopher NO (2006) Serous Membranes. In: Stacey EM, editor. *Histology for Pathologists*, 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2006. pp. 547–562.

42. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(4):241-56. doi: 10.1007/s10565-006-0175-0. PubMed PMID: 17171431.

43. Turck N, Gross I, Gendry P, Stutzmann J, Freund JN, Kedinger M, et al. Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2005;303(2):494-503. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.10.025. PubMed PMID: 15652360.

44. Cosín-Roger J, Ortiz-Masiá D, Calatayud S, Hernández C, Alvarez A, Hinojosa J, et al. M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis. *PLoS One*. 2013;8(10):e78128. doi: 10.1371/journal.pone.0078128. PubMed PMID: 24167598; PubMed Central PMCID: PMC3805515.

45. Visco V, Bava FA, d'Alessandro F, Cavallini M, Ziparo V, Torrisi MR. Human colon fibroblasts induce differentiation and proliferation of intestinal epithelial cells through the direct paracrine action of keratinocyte growth factor. *J Cell Physiol*. 2009;220(1):204-13. doi: 10.1002/jcp.21752. PubMed PMID: 19326389.

46. Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:392. doi: 10.1186/1471-2105-10-392. PubMed PMID: 19948054; PubMed Central PMCID: PMC2791777.

47. Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Web Server issue):W124-9. doi: 10.1093/nar/gkh442. PubMed PMID: 15215364; PubMed Central PMCID: PMC441580.

48. Fleet JC, Wang L, Vitek O, Craig BA, Edenberg HJ. Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation. *Physiol Genomics*. 2003;13(1):57-68. doi: 10.1152/physiolgenomics.00152.2002. PubMed PMID: 12644633.

49. Benoit YD, Paré F, Francoeur C, Jean D, Tremblay E, Boudreau F, et al. Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(4):G504-17. doi: 10.1152/ajpgi.00265.2009. PubMed PMID: 20133952; PubMed Central PMCID: PMCPMC2907224.

50. Verzi MP, Shin H, He HH, Sulahian R, Meyer CA, Montgomery RK, et al. Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev Cell.* 2010;19(5):713-26. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.006. PubMed PMID: 21074721; PubMed Central PMCID: PMCPMC3001591.

51. San Roman AK, Aronson BE, Krasinski SD, Shivdasani RA, Verzi MP. Transcription factors GATA4 and HNF4A control distinct aspects of intestinal homeostasis in conjunction with transcription factor CDX2. *J Biol Chem.* 2015;290(3):1850-60. doi: 10.1074/jbc.M114.620211. PubMed PMID: 25488664; PubMed Central PMCID: PMCPMC4340426.

52. Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;142(3):775-82. PubMed PMID: 3548718.

53. Guo YS, Narayan S, Yallampalli C, Singh P. Characterization of insulinlike growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology.* 1992;102(4 Pt 1):1101-8. PubMed PMID:

1312970.

54. Dignass AU, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;202(2):701-9. PubMed PMID: 8048940.

55. Dignass AU, Tsunekawa S, Podolsky DK. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology.* 1994;106(5):1254-62. PubMed PMID: 7513666.

56. Housley RM, Morris CF, Boyle W, Ring B, Biltz R, Tarpley JE, et al. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest.* 1994;94(5):1764-77. doi: 10.1172/JCI117524. PubMed PMID: 7962522; PubMed Central PMCID: PMC294567.

57. Halttunen T, Marttinen A, Rantala I, Kainulainen H, Mäki M. Fibroblasts and transforming growth factor beta induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology.* 1996;111(5):1252-62. PubMed PMID: 8898639.

58. Göke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol.* 1998;274(5 Pt 1):G809-18. PubMed PMID: 9612260.

59. Ratineau C, Plateroti M, Dumortier J, Blanc M, Kédinger M, Chayvialle JA, et al. Intestinal-type fibroblasts selectively influence proliferation rate and peptide synthesis in the murine



entero-endocrine cell line STC-1. *Differentiation*. 1997;62(3):139-47. doi:

10.1046/j.1432-0436.1997.6230139.x. PubMed PMID: 9447708.

60. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*.

1996;382(6594):829-33. doi: 10.1038/382829a0. PubMed PMID: 8752280.

61. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996;382(6594):833-5. doi: 10.1038/382833a0. PubMed PMID: 8752281.

62. Arenzana-Seisdedos F. SDF-1/CXCL12: A Chemokine in the Life Cycle of HIV. *Front Immunol*. 2015;6:256. doi: 10.3389/fimmu.2015.00256. PubMed PMID: 26097474; PubMed Central PMCID: PMC4456947.

63. Liang TS, Hartt JK, Lu S, Martins-Green M, Gao JL, Murphy PM. Cloning, mRNA distribution, and functional expression of an avian counterpart of the chemokine receptor/HIV coreceptor CXCR4. *J Leukoc Biol*. 2001;69(2):297-305. PubMed PMID: 11272281.

64. Yeh HY, Klesius PH. Sequence analysis, characterization and mRNA distribution of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818) chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) cDNA. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;134(3-4):289-95. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.022. PubMed PMID: 19853928.

65. Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. Chemokine receptor expression

by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 1999;117(2):359-67. PubMed PMID: 10419917.

66. Agle KA, Vongsa RA, Dwinell MB. Calcium mobilization triggered by the chemokine CXCL12 regulates migration in wounded intestinal epithelial monolayers. *J Biol Chem*. 2010;285(21):16066-75. doi: 10.1074/jbc.M109.061416. PubMed PMID: 20348095; PubMed Central PMCID: PMC2871475.

67. Wang B, Wang W, Niu W, Liu E, Liu X, Wang J, et al. SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin  $\alpha v \beta 6$ . *Carcinogenesis*. 2014;35(2):282-91. doi: 10.1093/carcin/bgt331. PubMed PMID: 24085800.

68. Zimmerman NP, Vongsa RA, Faherty SL, Salzman NH, Dwinell MB. Targeted intestinal epithelial deletion of the chemokine receptor CXCR4 reveals important roles for extracellular-regulated kinase-1/2 in restitution. *Lab Invest*. 2011;91(7):1040-55. doi: 10.1038/labinvest.2011.77. PubMed PMID: 21537329; PubMed Central PMCID: PMC3167207.

69. Lombardi L, Tavano F, Morelli F, Latiano TP, Di Sebastiano P, Maiello E. Chemokine receptor CXCR4: role in gastrointestinal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(3):696-705. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.005. PubMed PMID: 24120239.

70. Yang L, Wang R, Gao Y, Xu X, Fu K, Wang S, et al. The protective role of interleukin-11 against neutron radiation injury in mouse intestines via MEK/ERK and PI3K/Akt dependent pathways. *Dig Dis Sci*. 2014;59(7):1406-14. doi: 10.1007/s10620-013-3015-0. PubMed PMID: 24452839.

71. Jinawath A, Akiyama Y, Yuasa Y, Pairojkul C. Expression of phosphorylated ERK1/2 and homeodomain protein CDX2 in cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132(12):805-10. doi: 10.1007/s00432-006-0129-1. PubMed PMID: 16794828.
72. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem*. 2011;286(36):31263-71. doi: 10.1074/jbc.M111.238147. PubMed PMID: 21771795; PubMed Central PMCID: PMC3173073.
73. Derbal-Wolfrom L, Pencreach E, Saandi T, Aprahamian M, Martin E, Greferath R, et al. Increasing the oxygen load by treatment with myo-inositol trispyrophosphate reduces growth of colon cancer and modulates the intestine homeobox gene Cdx2. *Oncogene*. 2013;32(36):4313-8. doi: 10.1038/onc.2012.445. PubMed PMID: 23045284.
74. Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development*. 1999;126(10):2215-25. PubMed PMID: 10207146.
75. Bovári J, Czömpöly T, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(3):227-35. doi: PAOR.2007.13.3.0227. PubMed PMID: 17922052.
76. Kim BM, Buchner G, Miletich I, Sharpe PT, Shivdasani RA. The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev Cell*. 2005;8(4):611-22. doi: 10.1016/j.devcel.2005.01.015. PubMed PMID: 15809042.

77. Kim BM, Miletich I, Mao J, McMahon AP, Sharpe PA, Shivdasani RA. Independent functions and mechanisms for homeobox gene *Barx1* in patterning mouse stomach and spleen. *Development*. 2007;134(20):3603-13. doi: 10.1242/dev.009308. PubMed PMID: 17855428.
78. Noguchi TK, Ninomiya N, Sekine M, Komazaki S, Wang PC, Asashima M, et al. Generation of stomach tissue from mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2015;17(8):984-93. doi: 10.1038/ncb3200. PubMed PMID: 26192439.
79. Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*. 2015;61(3):1066-79. doi: 10.1002/hep.27332. PubMed PMID: 25066777; PubMed Central PMCID: PMC4306641.
80. Alkhouri H, Poppinga WJ, Tania NP, Ammit A, Schuliga M. Regulation of pulmonary inflammation by mesenchymal cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;29(2):156-65. doi: 10.1016/j.pupt.2014.03.001. PubMed PMID: 24657485.
81. 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(6):267-75. doi: 10.1111/pin.12167. PubMed PMID: 24965109.
82. Jorissen RN, Gibbs P, Christie M, Prakash S, Lipton L, Desai J, et al. Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7642-51. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1431. PubMed PMID: 19996206; PubMed Central PMCID: PMC2920750.

83. Yokota M, Kojima M, Higuchi Y, Nishizawa Y, Kobayashi A, Ito M, et al. Gene expression profile in the activation of subperitoneal fibroblasts reflects prognosis of patients with colon cancer. *Int J Cancer*. 2015. doi: 10.1002/ijc.29851. PubMed PMID: 26370611.
84. Rynne-Vidal A, Jiménez-Heffernan JA, Fernández-Chacón C, López-Cabrera M, Sandoval P. The Mesothelial Origin of Carcinoma Associated-Fibroblasts in Peritoneal Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):1994-2011. doi: 10.3390/cancers7040872. PubMed PMID: 26426054.
85. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-23. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.022. PubMed PMID: 17604720; PubMed Central PMCID: PMC2084369.
86. Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*. 2011;472(7341):120-4. doi: 10.1038/nature09819. PubMed PMID: 21423168; PubMed Central PMCID: PMC3670758.
87. Kim BM, Woo J, Kanellopoulou C, Shivdasani RA. Regulation of mouse stomach development and Barx1 expression by specific microRNAs. *Development*. 2011;138(6):1081-6. doi: 10.1242/dev.056317. PubMed PMID: 21307095; PubMed Central PMCID: PMC3042866.
88. Goldring SR, Stephenson ML, Downie E, Krane SM, Korn JH. Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *J Clin Invest*.

1990;85(3):798-803. doi: 10.1172/JCI114506. PubMed PMID: 2155928; PubMed Central PMCID: PMCPMC296497.

89. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. *Cell Tissue Res.* 2007;327(3):499-510. doi: 10.1007/s00441-006-0317-y. PubMed PMID: 17093925.

90. Neri S, Hashimoto H, Kii H, Watanabe H, Masutomi K, Kuwata T, et al. Cancer cell invasion driven by extracellular matrix remodeling is dependent on the properties of cancer-associated fibroblasts. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015. doi: 10.1007/s00432-015-2046-7. PubMed PMID: 26374424.

91. Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, et al. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science.* 2015;348(6232):aaa2151. doi: 10.1126/science.aaa2151. PubMed PMID: 25883361.

## VIII. 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心な御指導と御高配を賜りました東京大学新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野教授 兼 国立がん研究センター東病院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。

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

cDNA チップ解析の実施にあたりデータの解析をして頂いたことに加え、その解釈に関して親身に御指導を賜りました国立がん研究センター研究所発がん機構研究グループ遺伝医学研究分野ユニット長 佐々木博己先生、主任研究員 青柳一彦先生に御礼申し上げます。至らぬ点が多々あったにも関わらず、多くの時間を割いて丁寧な御指導、有益な御助言を戴いたことを心から感謝致します。

共同研究の形で研究遂行に御尽力頂いた国立がん研究センター東病院 横田満先生、河野信吾先生を始めとする医師の皆様に深く御礼申し上げます。国立がん研究センターという環境にて現場で活躍される医師と研究を行う機会を頂き、大変貴重な経験となりました。

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 桑田健先生、藤井誠志先生、光永修一先生、山内稚佐子先生、菅野雅人先生、中村優子様、橋本弘子様、トランスレーショナルリサーチ分野の牧野嶋秀樹先生に御礼申し上げます。また研究生活を支えてくださった臨床腫瘍病理分野の須崎

資子様、大沼世史子様を始めとしたスタッフ、そして東京大学大学院生の皆様々に感謝致します。

最後に、国立がん研究センターでの5年間の研究生活にて、数々の苦楽を共に過ごした東京大学大学院の同期である阿部杏奈さんに御礼申し上げます。研究遂行にあたり有益な御助言を戴いた他、精神的な面でも支えになって戴いたこと、誠に感謝しております。

心から尊敬できる先生、先輩方に恵まれ、東京大学大学院生としての5年間、充実した研究生活を送れたことを幸せに思います。



## IX. 図表の説明

Table 1. 本研究に用いた一次抗体の詳細

Table 2. マイクロアレイ解析に用いた線維芽細胞の詳細

Table 3. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列情報

Table 4. RNAi に用いた shRNA ベクターの配列情報

Table 5. 腸管線維芽細胞において特徴的に発現する遺伝子群

Fig 1. 消化管臓器からの線維芽細胞の採取法

(A) 消化管の層構造。消化管は体腔側から、粘膜固有層、粘膜下層、固有筋層および漿膜下層と呼ばれる複数の組織が層構造を形成している。

(B) 消化管臓器からの SMFs および SPFs の採取の模式図。ヒト消化管臓器からピンセットと鉗を用いて粘膜下層組織と漿膜下層組織を物理的に分離した後、それぞれの組織から線維芽細胞をペアで採取した。

### Fig 2. 免疫蛍光染色による線維芽細胞の性状解析

ヒト線維芽細胞における各種細胞マーカーの発現を 細胞免疫染色法 を用いて確認した (Vimentin: 間葉系細胞マーカー、CytoKeratin: 上皮細胞マーカー、Desmin: 筋系細胞マーカー、GFAP: 神経細胞マーカー、Calretinin: 中皮細胞マーカー)。

Vimentin のネガティブコントロール及び CytoKeratin, Desmin のポジティブコントロールとして MCF-7 細胞株、GFAP のポジティブコントロールとして Schwann 細胞、Calretinin のポジティブコントロールとして HT-29 細胞株を用いた。

### Fig 3. FACS による線維芽細胞の性状解析

ヒト線維芽細胞における細胞表面抗原の発現を FACS を用いて検出した (CD31: 血管内皮マーカー、CD34: 造血系前駆細胞マーカー、CD45: リンパ球マーカー、CD68: 単球マーカー、CD105: 間葉系細胞マーカー)。

採取された細胞は、線維芽細胞以外の間質細胞を示すマーカーの発現は陰性で (negative ratio: > 95%)、かつ間葉系細胞マーカーである CD105 の発現は陽性 (positive ratio: > 80%) を示す細胞集団であった。

### Fig 4. ヒト線維芽細胞は、臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の多様性を有する

(A) 63 種類のヒト初代培養線維芽細胞における遺伝子発現の多様性。樹形図の各カラムの色は線維芽細胞の由来臓器を示した (DeFs, J\_MaFs, C\_MAFs: 茶色、PrFs, UtFs: 水色、GaFs,

HSCs, LiFs: 灰色、LuFs: 緑色、SMFs: 赤色、SPFs: 青色、VAFs: ピンク)。ヒートマップ上の遺伝子の発現は、-5 (緑色) ~ 5 (赤色) の範囲で示した (log<sub>2</sub> ベース)。

(B) (A) 上部の系統樹の拡大像。系統樹上の第一の分岐により、消化管線維芽細胞 (GIFs) と非消化管線維芽細胞 (Non-GIFs) は有意に分離した (\*:  $P < 0.001$ )。また、GEC および NGEC 内では、臓器や解剖学的部位依存的な小クラスターが形成された。

図中の SSFs は SPFs、MaGFs は J\_MaFs、MaFs は C\_MaFs を示す。

#### Fig 5. 消化管線維芽細胞は非消化管線維芽細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを有する

(A) GIFs と Non-GIFs 間で発現が有意に異なっていた 995 probe sets を用いた SV 階層クラスター解析 ( $P < 0.05$ : unpaired t-test, fold change  $> 2.0$ )。ヒートマップ上部の赤いバーは GIFs、青いバーは Non-GIFs を示す。Fold change 順で発現変動が大きい上位 20 遺伝子をヒートマップの右に示した。ヒートマップ上の遺伝子の発現は、-5 (緑色) ~ 5 (赤色) の範囲で示した (log<sub>2</sub> ベース)。

(B) GIFs および Non-GIFs において特徴的に発現する遺伝子の内、“transcriptional regulation”、“Signal ligands” および “Extracellular matrix remodeling” に関連する遺伝子群のリスト。

#### Fig 6. 消化管線維芽細胞は、解剖学的部位依存的な遺伝子発現プロファイルを有する

(A) 消化管の各臓器の線維芽細胞毎の USV 階層クラスター解析。ヒートマップ上部の赤い

バーは SMFs、青いバーは SPFs を示す。5 臓器中 3 臓器（大腸、回腸、胃）において SMFs と SPFs は明確に独立したクラスターを形成した。

(B) 大腸、回腸、胃の 3 臓器の SMFs と SPFs の間で発現が有意に異なる 498 probe sets を用いた SV 階層クラスター解析 ( $P < 0.05$ : unpaired t-test, fold change  $> 2.0$ )。発現変動が上位の遺伝子群をヒートマップの右に示した。

(C) SMFs および SPFs において特徴的に発現する遺伝子の内、“transcriptional regulation”、“Signal ligands” および “Extracellular matrix remodeling” に関連する遺伝子群のリスト。

#### Fig 7. 消化管線維芽細胞は、臓器依存的な遺伝子発現プロファイルを有する

(A) SMFs および SPFs サンプルを用いた USV 階層クラスター解析。ヒートマップ上部のバーは GIFs の由来臓器を示す（食道: 茶色、胃: 緑色、十二指腸: 水色、回腸: 灰色、大腸: 橙色）。SMFs および SPFs 共に、消化管の臓器依存的にサンプルが集積する傾向を示した。

(B) SMFs および SPFs において臓器特異的に発現する遺伝子群のベン図。消化管のある臓器において発現が Fold change  $> 2.0$ 、 $P < 0.05$  を満たす probe sets を抽出した。SMFs で各臓器に特異的に発現する遺伝子として 433 probe sets、SPFs で各臓器に特異的に発現する遺伝子として 526 probe sets が同定された ( $P < 0.05$ : ANOVA, fold change  $> 2.0$ )。この内、87 probe sets が SMFs と SPFs で共通して発現していた (Common organ signature)。

(C) 同定された 87 probe sets の Common organ signature を用いた階層クラスター解析。

GIFs の各サンプルは、解剖学的部位ではなく臓器に依存したクラスターを形成した。

#### Fig 8. 消化管線維芽細胞における Homeobox 遺伝子の臓器依存的な階層性

GIFs において確かな発現が認められる 35 probe sets の Homeobox 遺伝子を用いた USV 階層クラスター解析。Homeobox 遺伝子の多くは GIFs の臓器や頭尾軸に依存した遺伝子発現の階層性を示した。

#### Fig 9. ヒト消化管組織を構成する線維芽細胞における Homeobox 遺伝子の発現の多様性

#### Fig 10. 定量的 RT-PCR によるマイクロアレイデータの再現性確認

マイクロアレイに用いた検体とは独立した 3 検体における解剖学的部位および臓器特異的遺伝子の発現解析。解剖学的部位特異的な遺伝子として *MSX1* (A: SPFs signature) および *PITX1* (B: SMFs signature)、臓器特異的な遺伝子として *HOXA10* (C: Colon fibroblasts signature) および *HOXB8* (D: Stomach fibroblasts signature) を示した。(mean ± SE, N=3, \*:  $P < 0.05$ , \*\* \*:  $P < 0.01$ )

#### Fig 11. 免疫蛍光染色によるマイクロアレイデータの再現性確認 (*MSX1*, *PITX1*)

(A) SPFs 特異的遺伝子 *MSX1* の免疫蛍光染色像。図中の矢印は核に *MSX1* の染色が確認された陽性細胞を示した。

(B) 大腸および胃の SMFs および SPFs における *MSXI* 陽性細胞割合。

(C) SMFs 特異的遺伝子 *PITXI* の免疫蛍光染色像。

(D) 大腸および胃の SMFs および SPFs における *PITXI* 陽性細胞割合。

(mean ± SE, N=3, \*:  $P < 0.05$ )

Fig 12. 免疫蛍光染色によるマイクロアレイデータの再現性確認 (*HOXA10*, *HOXB8*)

(A) 大腸線維芽細胞の特異的遺伝子 *HOXA10* の免疫蛍光染色像。図中の矢印は核に *HOXA10* の染色が確認された陽性細胞を示した。

(B) 大腸および胃の SMFs および SPFs における *HOXA10* 陽性細胞割合。

(C) 胃線維芽細胞の特異的遺伝子 *HOXB8* の免疫蛍光染色像。

(D) 大腸および胃の SMFs および SPFs における *HOXB8* 陽性細胞割合。

(mean ± SE, N=3, \*:  $P < 0.05$ )

Fig 13. 公共マイクロアレイデータを用いた部位特異的遺伝子の発現の再現性確認

(A) Fig 5 で同定された 995 probe sets の GIFs signature を用いた階層クラスタ解析。ヒートマップ上部に各サンプルの由来臓器を示した（胃由来線維芽細胞: 灰色、大腸由来線維芽細胞: 橙色、乳腺由来線維芽細胞: 茶色、肺由来線維芽細胞: 緑色）。系統樹の第一の分岐は GIFs（大腸および胃）のサンプルと Non-GIFs（乳腺と肺）のサンプルとを明確に分離した。

(B-E) 公共マイクロアレイデータにおける *PITXI* (B: GIFs や SMFs に特異的遺伝子)、

*TBX5* (C: Non-GIFs に特異的遺伝子)、*HOXA13* (D: 大腸線維芽細胞に特異的遺伝子) および *BARX1* (E: 胃線維芽細胞に特異的遺伝子) の遺伝子発現。(mean±SE)

Fig 14. ヒト消化管組織における臓器、解剖学的部位特異的遺伝子の発現

(A-D) ヒト組織中における *MSX1* (A: SPFs signature)、*PITX1* (B: SMFs signature)、*HOXA10* (C: Colon fibroblasts signature) および *HOXB8* (D: Stomach fibroblasts signature) の遺伝子発現。*PITX1* を除く 3 遺伝子の発現は *in vitro* の線維芽細胞における発現パターンと類似していた。(mean±SD, N=3)

(E) ヒト消化管組織における *MSX1* の免疫蛍光染色像。図中の矢印は Vimentin 陽性かつ紡錘状の形態像を示す線維芽細胞様細胞を示す。

(F) ヒト消化管組織の線維芽細胞様細胞の核における *MSX1* のタンパク質発現の半定量。大腸および胃の漿膜下層組織における *MSX1* の発現は、同じ臓器の粘膜下層組織における発現よりも強かった。(mean±SE, N=3, \*:  $P < 0.05$ )

Fig 15. 腸管粘膜における腸上皮細胞の分化系譜と局在

腸管粘膜は、陰窩領域と絨毛領域から構成されるユニット構図を有する。陰窩領域には組織幹細胞やパネート細胞から構成される幹細胞領域と増殖性細胞領域が存在し、陰窩上皮近傍の線維芽細胞により裏打ちされている。一方、絨毛領域には吸収上皮細胞、杯細胞（粘液産生細胞）や内分泌細胞が存在し、栄養吸収、粘膜保護や消化ホルモン産生といった腸管臓

器の機能の主体を果たす。

Fig 16. Caco-2 細胞の長期培養に伴う、腸上皮分化関連遺伝子の発現変化（定量的 RT-PCR）

(A) Caco-2 細胞の 2 次元および 3 次元培養の模式図。Cell Culture Insert 上に直接 Caco-2 細胞を播種したものを 2 次元培養群、Cell Culture Insert 上にコラーゲンゲルを重合し、その上に Caco-2 細胞を播種したものを 3 次元培養群とした。

(B) 2 次元培養群の Caco-2 細胞における腸上皮分化関連遺伝子の遺伝子発現の継時的変化。分化関連遺伝子はいずれも、培養 21 日目において最大の発現を示した。

(C) 3 次元培養群の Caco-2 細胞における腸上皮分化関連遺伝子の遺伝子発現の継時的変化。分化関連遺伝子はいずれも、培養 14 日目において最大の発現を示した。

Fig 17. Caco-2 細胞の長期培養に伴う、腸上皮分化関連因子のタンパク質発現変化(免疫染色)

(A) 3 次元長期培養下の Caco-2 細胞における形態像および腸上皮分化関連因子の染色像。

(B) 3 次元培養下の Caco-2 細胞における *CDX2* 陽性細胞割合の継時的変化。

(C) 3 次元培養下の Caco-2 細胞における *CD10* 陽性細胞割合の継時的変化。

Fig 18. 3D 共培養下において回腸粘膜下層由来線維芽細胞は、Caco-2 細胞における *CDX2* および *Ki-67* の発現を亢進する

(A) Caco-2 細胞と線維芽細胞との 3 次元共培養の模式図。コラーゲンゲル中に線維芽細胞



を包埋した後、Caco-2 細胞を重合したコラーゲンゲル上に播種した。

(B) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *CDX2* の免疫化学的染色像。

(C) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *CDX2* の陽性細胞割合。

(D) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *Ki-67* の免疫化学的染色像。

(E) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *Ki-67* の陽性細胞割合。

(mean±SD, N=3, \*:  $P < 0.05$ )

Fig 19. 回腸粘膜下層由来線維芽細胞は、Caco-2 細胞の成熟・機能性の獲得に寄与しない

(A) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *CD10* の免疫化学的染色像。

(B) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *CD10* の陽性細胞割合。回腸 SMFs は、Caco-2 細胞における *CD10* の発現に影響しなかった (mean±SD, N=3, NSD:  $P > 0.05$ )。

(C) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *MUC2* の免疫化学的染色像 (左: 弱拡大、右: 強拡大)。Caco-2 細胞における *MUC2* 陽性細胞の存在は

極低頻度であった。また、回腸 SMFs の存在による影響は観察されなかった。

(D) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *CHGA/B* の免疫化学的染色像（左：弱拡大、右：強拡大）。Caco-2 細胞における *CHGA/B* 陽性細胞の存在は極低頻度であった。また、回腸 SMFs の存在による影響は観察されなかった。

(E) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *SI* の免疫化学的染色像。両群共に大部分の細胞が陽性となり、回腸 SMFs による影響は確認されなかった。

(F) Caco-2 細胞単独群および回腸粘膜下層線維芽細胞との共培養群における *ALPI* の免疫化学的染色像。

Fig 20. Caco-2 細胞に対する *CDX2* および *Ki-67* の発現亢進は、腸管線維芽細胞に特有である

(A) Caco-2 細胞と各種 GIFs との共培養群における *CDX2* の免疫化学的染色像。

(B) Caco-2 細胞と各種 GIFs との共培養群における *CDX2* の陽性細胞割合。腸管線維芽細胞と共培養した群（青色：十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs）においてのみ *CDX2* 陽性細胞割合の増加を認めた。

(C) Caco-2 細胞と各種 GIFs との共培養群における *Ki-67* の免疫化学的染色像。

(D) Caco-2 細胞と各種 GIFs との共培養群における *Ki-67* の陽性細胞割合。腸管線維芽細胞と共培養した群（青色：十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs）においてのみ *Ki-67*

陽性細胞割合の増加を認めた。

(mean±SD, N=3, \*\*:  $P < 0.01$ )

Fig 21. Recombinant CXCL12/SDF1 は、Caco-2 細胞における CDX2 および Ki-67 の発現を亢進する

(A) rCXCL12/SDF1 で 14 日間処理した Caco-2 細胞における CDX2 の免疫化学的染色像。

(B) rCXCL12/SDF1 で 14 日間処理した Caco-2 細胞における CDX2 の陽性細胞割合。

(C) rCXCL12/SDF1 で 14 日間処理した Caco-2 細胞における Ki-67 の免疫化学的染色像。

(D) rCXCL12/SDF1 で 14 日間処理した Caco-2 細胞における Ki-67 の陽性細胞割合。

(mean±SD, N=3, \*\*:  $P < 0.01$ )

Fig 22. 腸管線維芽細胞における CXCL12/SDF1 のノックダウンにより、Caco-2 細胞に対する CDX2 の発現亢進が阻害される

(A) shCXCL12 による回腸 SMFs における CXCL12 発現のノックダウン効率の検討。

shCXCL12 ベクター導入による顕著な発現抑制が確認された。

(B) shCXCL12 を導入した回腸 SMFs と Caco-2 細胞を共培養した際の CDX2 の免疫化学的染色像。

(C) shCXCL12 を導入した回腸 SMFs と Caco-2 細胞を共培養した際の CDX2 の陽性細胞割合。

(Only: Caco-2 単独群、Sham: ベクター未導入群、shLuc: shLuciferase ベクター導入群、shCXCL12\_#1: shCXCL12 ベクター導入群(#1)、shCXCL12\_#2: shCXCL12 ベクター導入群(#2)、mean±SD, N=2, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ )

Fig 23. 腸管線維芽細胞における CXCL12/SDF1 のノックダウンにより、Caco-2 細胞に対する Ki-67 の発現亢進が阻害される

(A) shCXCL12 を導入した回腸 SMFs と Caco-2 細胞を共培養した際の Ki-67 の免疫化学的染色像。

(B) shCXCL12 を導入した回腸 SMFs と Caco-2 細胞を共培養した際の Ki-67 の陽性細胞割合。

(mean±SD, N=2, \*:  $P < 0.05$ )

Fig 24. NKX2-3 は腸管線維芽細胞における CXCL12/SDF1 の発現制御、および Caco-2 細胞に対する CDX2 や Ki-67 の発現亢進に関与しない

(A) shNKX2-3 による回腸 SMFs における NKX2-3 発現のノックダウン効率の検討。shNKX2-3 ベクター導入による遺伝子発現抑制が確認された。

(B) shNKX2-3 を導入した回腸 SMFs における CXCL12/SDF1 の遺伝子発現。NKX2-3 の発現抑制に伴う CXCL12/SDF1 の発現抑制は確認されなかった。

(C-D) shNKX2-3 を導入した回腸 SMFs と Caco-2 細胞を共培養した際の CDX2 (C) および

*Ki-67* (D) の陽性細胞割合。*NKX2-3* の発現抑制による影響は観察されなかった。

(mean ± SD, N=2)

#### Fig 25. 腸管線維芽細胞による Caco-2 細胞の分化および増殖促進機構

#### Supp Fig 1. ヒト線維芽細胞における個体間差に依存した遺伝子発現の解析 (人種および年齢依存的な遺伝子の探索)

(A) ヒト線維芽細胞において人種依存的に発現する遺伝子のリスト。日本人由来のサンプルを“0”、白人種由来のサンプルを“1”とした際、 $R^2 > |0.6|$  かつ  $P < 0.05$ , Fold change  $> 2.0$  で有意に発現が異なる probe sets を示した。

(B) (A) で同定した 16 probe sets のヒートマップ。図上部の赤いバーは日本人由来のサンプル、青いバーは白人種由来のサンプルを示す。ヒートマップ上の遺伝子の発現は、-2 (緑色) ~ 2 (赤色) の範囲で示した ( $\log_2$  ベース)。

(C) ヒト線維芽細胞において年齢依存的に発現する遺伝子のリスト。 $R^2 > |0.6|$  の条件を満たす遺伝子は 2 probe sets 同定された。

#### Supp Fig 2. GIFs – Non-GIFs 間、および SMFs – SPFs 間で発現の異なる遺伝子群に対する Gene Ontology 解析 (Fig 5, 6 と関連)

(A) GIFs – Non-GIFs 間で発現が異なる 995 probe sets に対する GO 解析。

(B) SMFs – SPFs 間で発現が異なる 498 probe sets に対する GO 解析。

$P < 0.05$  を満たす GO term を選出し、上位 20 term をリストに示した。赤い文字は発生に関わる転写因子群、青は細胞外マトリクス成分の産生や分解、紫は細胞間のシグナル伝達に関わる GO term を示した。

Supp Fig 3. マイクロアレイに用いたのと同じの total RNA サンプルを用いた再現性解析

(qRT-PCR ; Fig 10 と関連)

マイクロアレイに用いたのと同じのサンプルにおける遺伝子発現を斜線、独立した 3 検体における遺伝子発現を黒棒で示した。SPFs に特徴的な遺伝子：MSX1 (A)、SMFs に特徴的な遺伝子：PITX1 (B)、大腸線維芽細胞に特徴的な遺伝子：HOXA10 (C)、胃線維芽細胞に特徴的な遺伝子：HOXB8 (D) を示した。

Supp Fig 4. ヒト線維芽細胞において CXCL12/SDF1 と発現が相関する転写因子は存在しな

い

(A-B) ヒト線維芽細胞における CXCL12/SDF1 の遺伝子発現 (A: 203666\_at, B: 209687\_at)。

CXCL12/SDF1 は腸管線維芽細胞だけでなく、肝臓、胆嚢や肺の線維芽細胞においても高発現を認めた (mean ± SE)。

(C) ヒト線維芽細胞において CXCL12/SDF1 と発現が相関する遺伝子の探索。R2 < 0.6 において発現が逆相関する遺伝子を 1 probe sets 認めたが転写制御因子ではなかった。

#### Supp Fig 5. ヒト線維芽細胞における臓器特異的な転写因子および液性因子の発現

#### Supp Fig 6. SPFs のがん細胞に対する反応性と大腸がん患者の予後との関連

(A) 大腸 SPFs の大腸がん細胞株 (DLD-1) 培養上清刺激に対する応答性。大腸がん細胞株培養上清 (Cancer-Cell-Conditioned Medium: CCCM) の刺激により、SPFs では 142 probe sets、SMFs では 59 probe sets の遺伝子の発現亢進を認めた ( $P < 0.05$ , fold changes  $> 2.0$ )。SPFs で特徴的に発現が亢進した 91 probe sets を SPFs-CCCM signature とした。

(B) DLD-1 と SMFs または SPFs をマウス (balb/c) 皮下に移植した際の腫瘍サイズの継時的な推移。DLD-1 と SMFs を共移植した群と比較して、SPFs を共移植した群において有意に腫瘍形成能が高かった (本実験は共同研究者の小嶋によって行われた。\*:  $P < 0.05$ )。

(C) ヒト大腸がん患者の公共マイクロアレイデータ (GSE14333) における SPFs-CCCM signature の発現。SPFs-CCCM signature の発現が高い High SPFs Gene Signature (HSGS) 群と、発現が低い Low SPFs Gene Signature (LSGS) 群に分離された。

(D) HSGS 群と LSGS 群における患者予後の比較。HSGS 群の患者の無再発生存期間 (RFS) が有意に短く予後不良であった (Kaplan-Meier 法による生存曲線の作製は共同研究者の横田により行われた)。

#### Supp Fig 7. SPFs における *PITX1* 発現の多様性

Fig 4. において GEC の集積した SPFs および NGEC に集積した SPFs における *PITX1*

の遺伝子発現 (A: 208502\_s\_at, B: 209587\_at)。GEC に集積した SPFs において顕著に *PITXI*

の発現が高かった (mean±SE)。



## X. 図表

Table 1. 本研究に用いた一次抗体の詳細

Antibody	Host	Dilution	Manufacturer	Experiment
Vimentin	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Immunofluorescence
Cytokeratin	Mouse Monoclonal	1:200	Dako	Immunofluorescence
Calretinin	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Immunofluorescence
GFAP	Mouse Monoclonal	1:50	Dako	Immunofluorescence
Desmin	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Immunofluorescence
CD31	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Flow cytometry
CD34	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Flow cytometry
CD45	Mouse Monoclonal	1:100	eBioscience	Flow cytometry
CD68	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Flow cytometry
CD105	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Flow cytometry
HOXA10	Goat Polyclonal	1:100	Santa, Cruz	Immunofluorescence
HOXB8	Mouse Monoclonal	1:100	Abcam	Immunofluorescence
PITX1	Rabbit Polyclonal	1:100	Atlas antibodies	Immunofluorescence
MSX1	Rabbit Polyclonal	1:100	Sigma	Immunofluorescence
CDX2	Mouse Monoclonal	1:100	BioGene	Immunohistochemistry
Ki-67	Mouse Monoclonal	1:100	Dako	Immunohistochemistry
CD10	Rabbit Monoclonal	1:100	Ventana	Immunohistochemistry
MUC2	Mouse Monoclonal	1:100	Novovastra	Immunohistochemistry
CHGA/B	Rabbit Polyclonal	1:100	PROGEN	Immunohistochemistry
Lysozyme	Mouse Monoclonal	1:100	Abcam	Immunohistochemistry
SI	Rabbit Polyclonal	1:100	Atlas antibodies	Immunohistochemistry
ALPI	Rabbit Polyclonal	1:100	Atlas antibodies	Immunohistochemistry

Table 2. マイクロアレイ解析に用いた線維芽細胞の詳細

Sample	Origin	SEX	Age	Race	Doner #
CoSMFs3.CEL	Colon Submucosa	M	65	Japanese	1
CoSMFs4.CEL	Colon Submucosa	F	61	Japanese	2
CoSMFs8.CEL	Colon Submucosa	F	71	Japanese	3
CoSMFs11.CEL	Colon Submucosa	F	58	Japanese	4
CoSSFs3.CEL	Colon Subperitoneum	M	65	Japanese	1
CoSSFs4.CEL	Colon Subperitoneum	F	61	Japanese	2
CoSSFs8.CEL	Colon Subperitoneum	F	71	Japanese	3
CoSSFs11.CEL	Colon Subperitoneum	F	58	Japanese	4
DeFs1.CEL	Breast Dermal	F	36	Japanese	5
DeFs2.CEL	Breast Dermal	F	65	Japanese	6
DeFs3.CEL	Breast Dermal	F	50	Japanese	7
DeFs5.CEL	Breast Dermal	F	43	Japanese	8
DuSMFs3.CEL	Duodenum Submucosa	M	82	Japanese	9
DuSMFs4.CEL	Duodenum Submucosa	M	65	Japanese	10
DuSMFs5.CEL	Duodenum Submucosa	M	63	Japanese	11
DuSSFs3.CEL	Duodenum Subperitoneum	M	82	Japanese	9
DuSSFs4.CEL	Duodenum Subperitoneum	M	65	Japanese	10
DuSSFs5.CEL	Duodenum Subperitoneum	M	63	Japanese	11
EsSMFs1.CEL	Esophagus Submucosa	F	64	Japanese	12
EsSMFs4.CEL	Esophagus Submucosa	F	65	Japanese	13
EsSMFs7.CEL	Esophagus Submucosa	M	78	Japanese	14
EsSSFs1.CEL	Esophagus Subperitoneum	F	64	Japanese	12
EsSSFs4.CEL	Esophagus Subperitoneum	F	65	Japanese	13
EsSSFs7.CEL	Esophagus Subperitoneum	M	78	Japanese	14
GaFs1.CEL	Gallbladder	F	73	Japanese	15
GaFs2.CEL	Gallbladder	M	74	Japanese	16
GaFs4.CEL	Gallbladder	F	73	Japanese	17
HSCs1.CEL	Liver	M	5	Caucasian	18
HSCs2.CEL	Liver	F	54	Caucasian	19
ILSMFs1.CEL	Ileum Submucosa	F	65	Japanese	20
ILSMFs3.CEL	Ileum Submucosa	F	74	Japanese	21
ILSMFs5.CEL	Ileum Submucosa	M	61	Japanese	22
ILSSFs1.CEL	Ileum Subperitoneum	F	65	Japanese	20
ILSSFs3.CEL	Ileum Subperitoneum	F	74	Japanese	21
ILSSFs5.CEL	Ileum Subperitoneum	M	61	Japanese	22
LiFs2.CEL	Liver	F	58	Japanese	23
LiFs6.CEL	Liver	M	54	Japanese	24
LiFs7.CEL	Liver	F	50	Japanese	25
LuFs3.CEL	Lung	F	83	Japanese	26
LuFs4.CEL	Lung	F	66	Japanese	27
LuFs5.CEL	Lung	F	50	Japanese	28
C_MaFs1.CEL	Mammary Gland	F	66	Caucasian	29
C_MaFs2.CEL	Mammary Gland	F	53	Caucasian	30
C_MaFs3.CEL	Mammary Gland	F	43	Caucasian	31
J_MaFs1.CEL	Mammary Gland	F	36	Japanese	5
J_MaFs3.CEL	Mammary Gland	F	65	Japanese	7
J_MaFs4.CEL	Mammary Gland	F	50	Japanese	32
J_MaFs5.CEL	Mammary Gland	F	43	Japanese	8
PrFs1.CEL	Prostate	M	36	Caucasian	33
PrFs2.CEL	Prostate	M	NA	Caucasian	34
PrFs3.CEL	Prostate	M	48	Caucasian	35
StSMFs2.CEL	Stomach Submucosa	M	74	Japanese	36
StSMFs9.CEL	Stomach Submucosa	M	69	Japanese	37
StSMFs10.CEL	Stomach Submucosa	F	57	Japanese	38
StSSFs2.CEL	Stomach Subperitoneum	M	74	Japanese	36
StSSFs9.CEL	Stomach Subperitoneum	M	69	Japanese	37
StSSFs11.CEL	Stomach Subperitoneum	M	73	Japanese	39
UtFs1.CEL	Uterus	F	33	Caucasian	40
UtFs2.CEL	Uterus	F	46	Caucasian	41
UtFs3.CEL	Uterus	F	28	Caucasian	42
VAFs2.CEL	Vascular Adventitia	M	65	Japanese	43
VAFs3.CEL	Vascular Adventitia	F	83	Japanese	26
VAFs4.CEL	Vascular Adventitia	F	66	Japanese	27

Table 3. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列情報

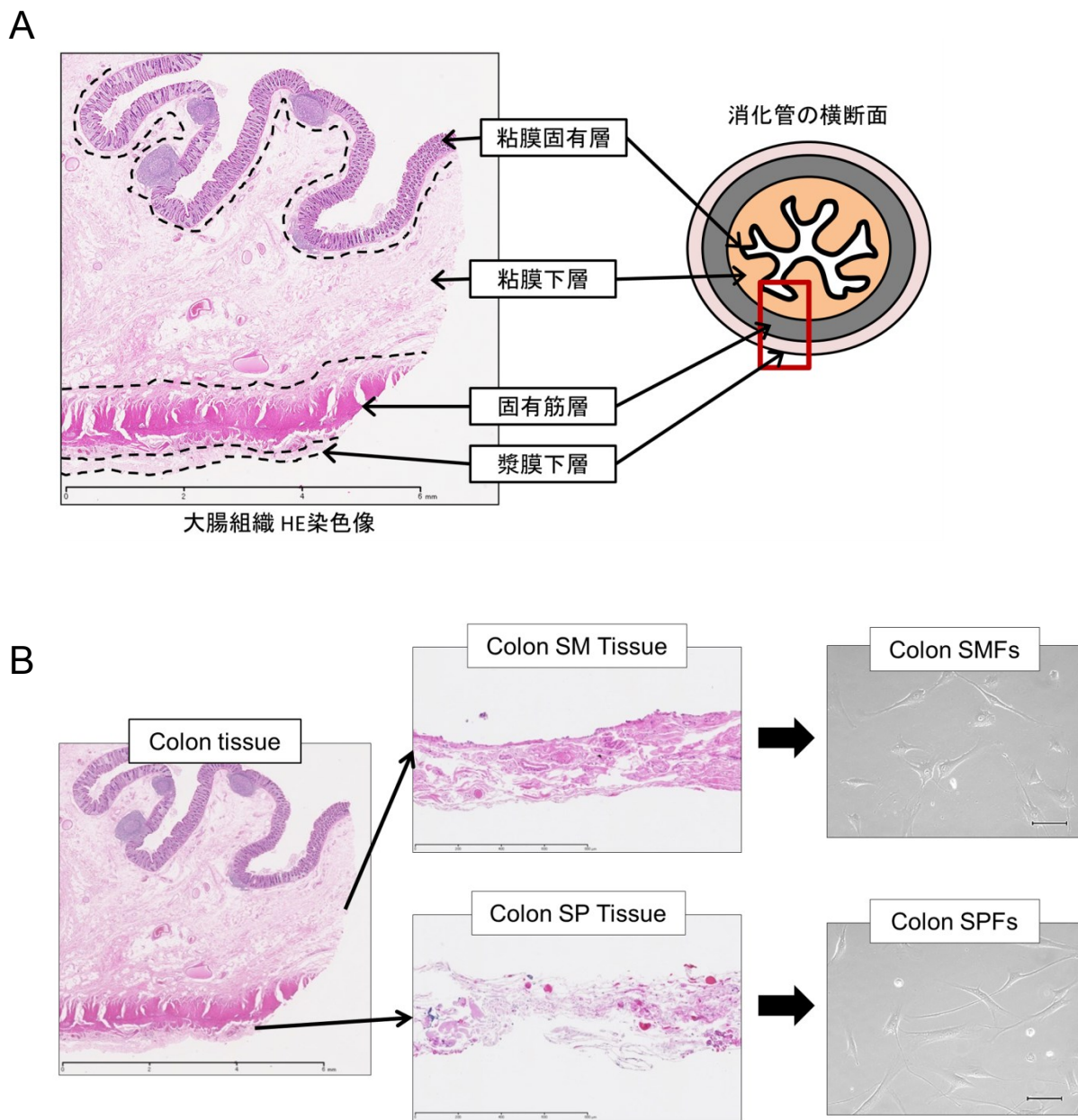
Gene Name	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC - 3'	5' - ATGGTGGTGAAGACGCCAGT - 3'
<i>HOXA10</i>	5' - CAGCTGTCCCTTGGCAGTGAT - 3'	5' - TCCAGTGTCTGGTGCTTCGTG - 3'
<i>HOXB8</i>	5' - CCCGGCAATTTCTACGGCTA - 3'	5' - AGTCTGCGTACTGCACCAGGTC - 3'
<i>MSX1</i>	5' - GCAAGTTCCGCCAGAAGCA - 3'	5' - CGGTTCTGGAACCATATCTTCAC - 3'
<i>PITX1</i>	5' - TCCCTGTGTATGTTGGACTGACTG - 3'	5' - CTTAGCACGCTCGGACTATGG - 3'
<i>CDX2</i>	5' - GGAACCTGTGCGAGTGGATG - 3'	5' - CGGATGGTGTGTAGCGACTGTA - 3'
<i>VIL1</i>	5' - GCTTGGCAACTCTAGGGACTGG - 3'	5' - TGAGGTTGCTGTTAGCATTGAACAC - 3'
<i>SI</i>	5' - AGACAACCTATGCACGATGGGACAA - 3'	5' - CATCCAGCGGGTACAGAGATGA - 3'
<i>MYO1A</i>	5' - TGCCTCAGCACAGCAAATCAG - 3'	5' - GCCCAATGTAGTCACCACAGAATG - 3'
<i>NKX2-3</i>	5' - TTCGAGCTGGAACGCAGGT - 3'	5' - AGAGACTTGTCTGCCGCTGT - 3'
<i>CXCL12</i>	5' - TGTGCATTGACCCGAAGCTAA - 3'	5' - GGTTTCAGAGCTGGGCTCCTAC - 3'

Table 4. RNAi に用いた shRNA ベクターの配列情報

Luciferase sh	
5'	GATCCCC ACGTTGAGTGCTTCGGAAT ACGTGTGCTGTCCGT <b>ATTTGGAAGTACTCAGCGT</b> TTTTT GGAAAT - 3'
3'	GGG TGCAACTCACGAAGCCTTA TGCACACGACAGGCA <b>TAAAGCTTCATGAGTCGCA</b> AAAAA CCTTTAGATC - 5'
CXCL12 sh#1	
5'	GATCCCC GTATTGACCTGAAGCTGAA ACGTGTGCTGTCCGT <b>TTTAGCTTCGGGTCAATGC</b> TTTTT GGAAAT - 3'
3'	GGG CATAACTGGACTTCGACTT TGCACACGACAGGCA <b>AAATCGAAGCCCAGTTAGC</b> AAAAA CCTTTAGATC - 5'
CXCL12 sh#2	
5'	GATCCCC GGGAACTGTGTAACGTGTA ACGTGTGCTGTCCGT <b>TACATGTTACATAGTTTCC</b> TTTTT GGAAAT - 3'
3'	GGG CCCTTGACACATTGCACAT TGCACACGACAGGCA <b>ATGTACAATGTATCAAAGG</b> AAAAA CCTTTAGATC - 5'
NKX2-3 sh#1	
5'	GATCCCC GTGAGAAGTTGCCTGTTT ACGTGTGCTGTCCGT <b>AAATAGGACAATTTCTCGC</b> TTTTT GGAAAT - 3'
3'	GGG CACTCTTCAACAGGACAAA TGCACACGACAGGCA <b>TTTATCCTGTTAAGAGCG</b> AAAAA CCTTTAGATC - 5'
NKX2-3 sh#2	
5'	GATCCCC GGTGCAAGTGTAAGAGGCA ACGTGTGCTGTCCGT <b>TGTCTCTTGCACTTGTACC</b> TTTTT GGAAAT - 3'
3'	GGG CCACGTTACATTCTCCGT TGCACACGACAGGCA <b>ACAGAGAACGTGAACATGG</b> AAAAA CCTTTAGATC - 5'

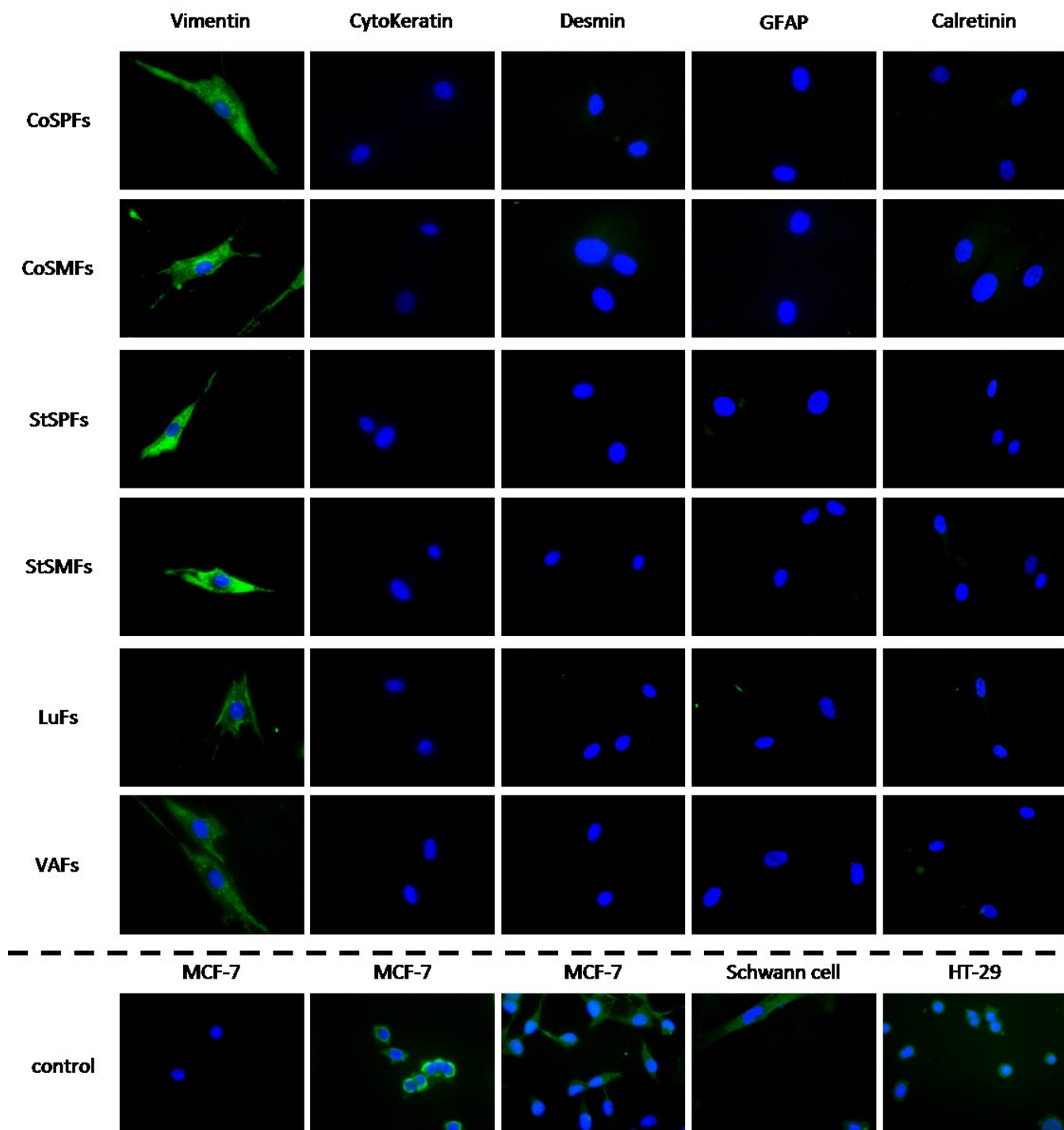
Table 5. 腸管線維芽細胞において特徴的に発現する遺伝子群

Probe Set ID	Fold change	Gene Symbol
1553808_a_at	846.72	NKX2-3
210302_s_at	210.89	MAB21L2
209905_at	32.09	HOXA10-HOXA9///HOXA9
210303_at	22.28	MAB21L2
214651_s_at	19.75	HOXA10-HOXA9///HOXA9///MIR196B
214043_at	10.64	PTPRD
218345_at	8.91	TMEM176A
1558795_at	8.77	LOC728052
220532_s_at	8.52	TMEM176B
229749_at	8.16	ANO4
1560425_s_at	8.13	LOC100506247
205522_at	6.34	HOXD4
228564_at	5.94	LOC375295
205578_at	5.85	ROR2
236420_s_at	5.84	ANO4
209687_at	5.62	CXCL12
229493_at	4.82	HOXD-AS2
203666_at	4.71	CXCL12
201641_at	4.35	BST2
40837_at	4.26	TLE2
214438_at	3.84	HLX
219594_at	3.71	NINJ2
211538_s_at	3.68	HSPA2
220351_at	3.09	CCRL1
218546_at	2.78	C1orf115
203337_x_at	2.28	ITGB1BP1
206540_at	2.27	GLB1L
220166_at	2.26	CNNM1
228837_at	2.24	TCF4
212692_s_at	2.23	LRBA
229554_at	2.19	LUM
210837_s_at	2.06	PDE4D
214109_at	2.00	LRBA



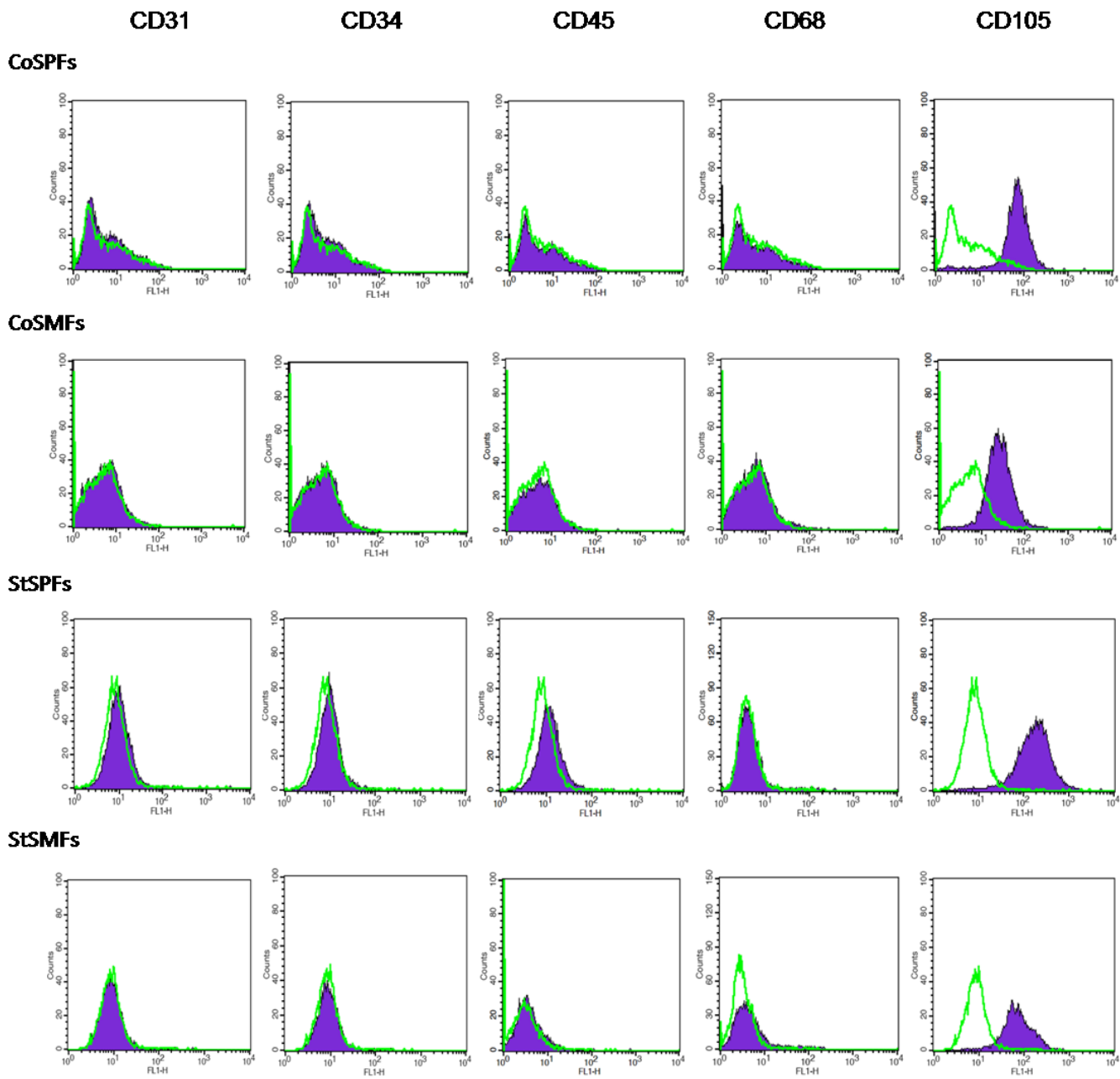
Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S1\_Fig (Modified)  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.s001

Fig 1. 消化管臓器からの線維芽細胞の採取法



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S1\_Fig (Modified)  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.s001

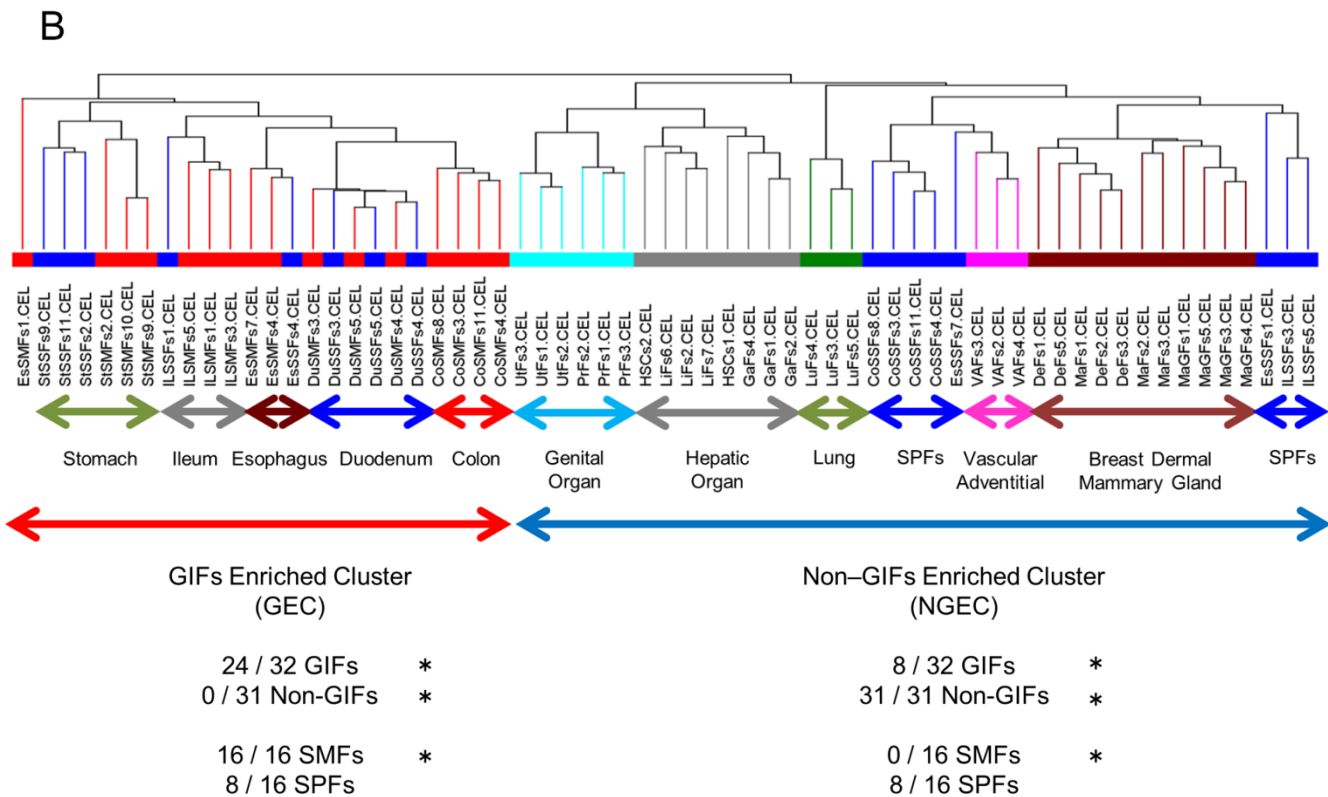
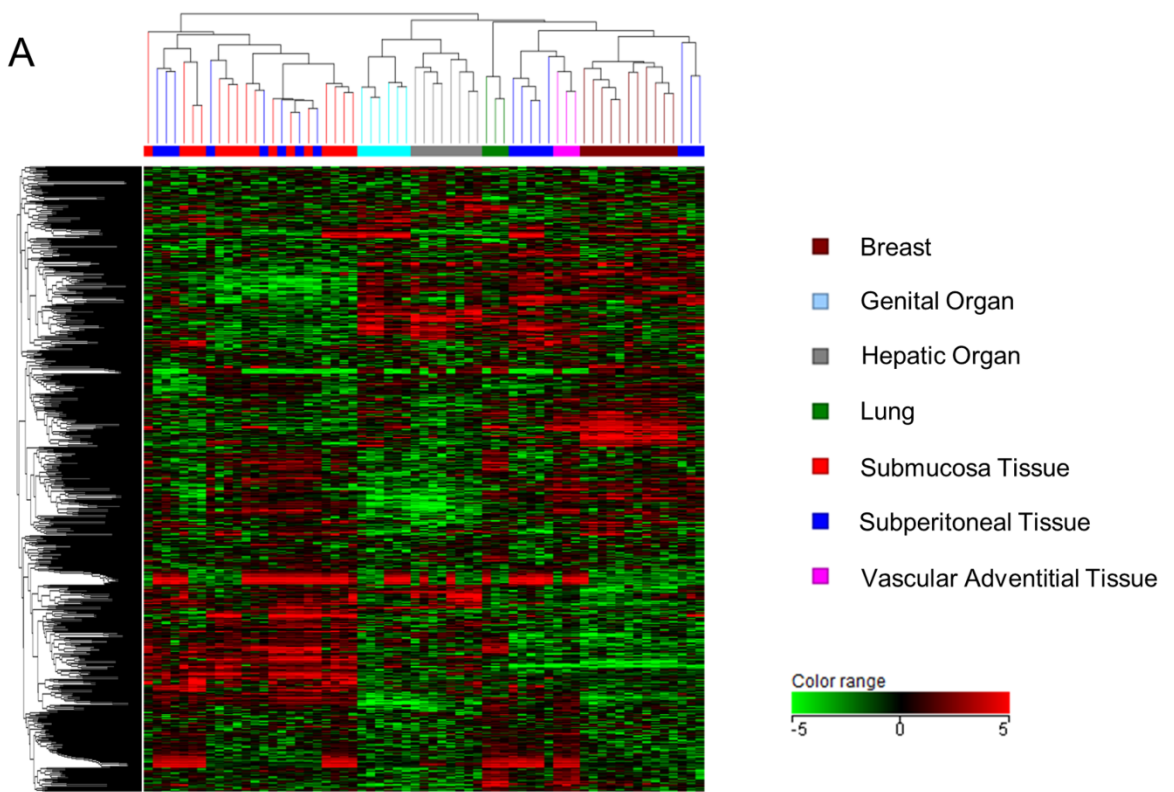
Fig 2. 免疫蛍光染色による線維芽細胞の性状解析



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S1\_Fig (Modified)  
 doi:10.1371/journal.pone.0129241.s001

Fig 3. FACSによる線維芽細胞の性状解析

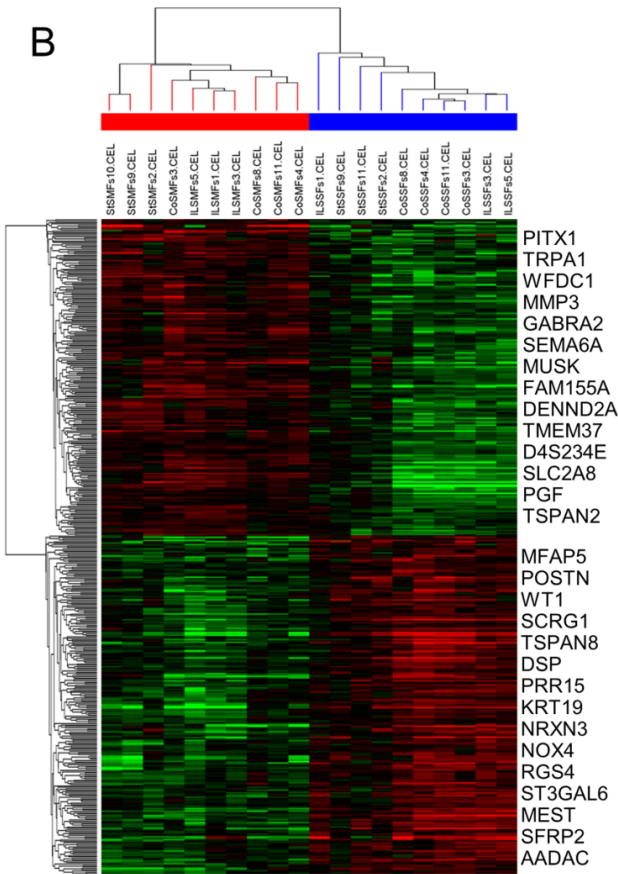
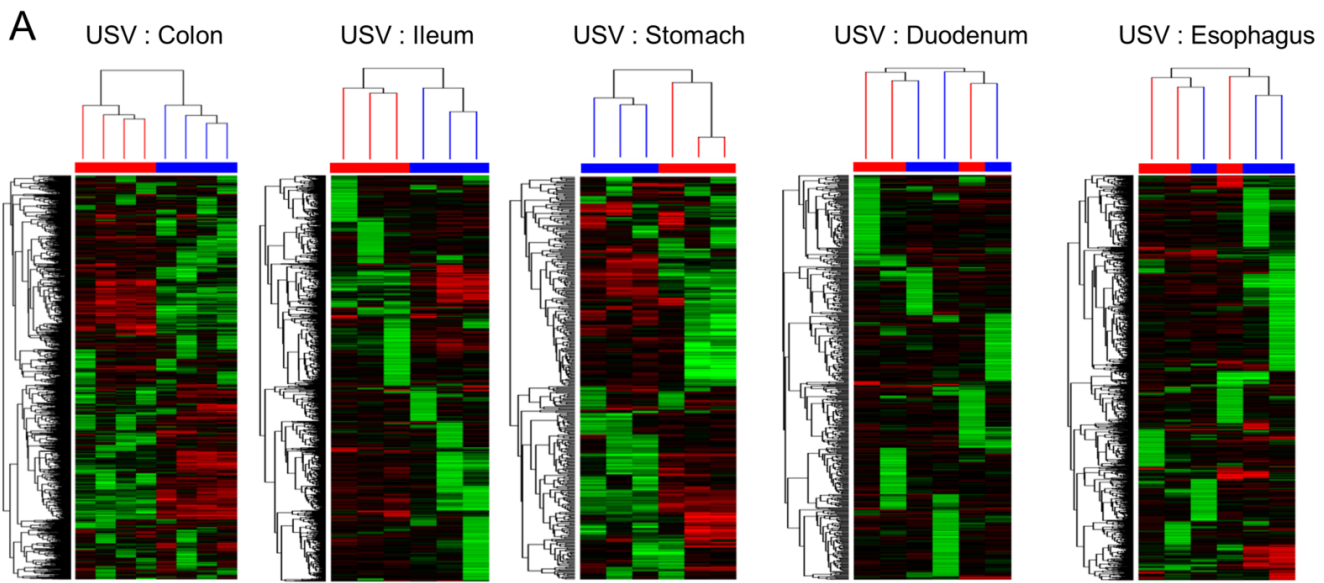




Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, Fig1 (Modified)  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.g001

Fig 4. ヒト線維芽細胞は、臓器および解剖学的部位依存的な遺伝子発現の多様性を有する



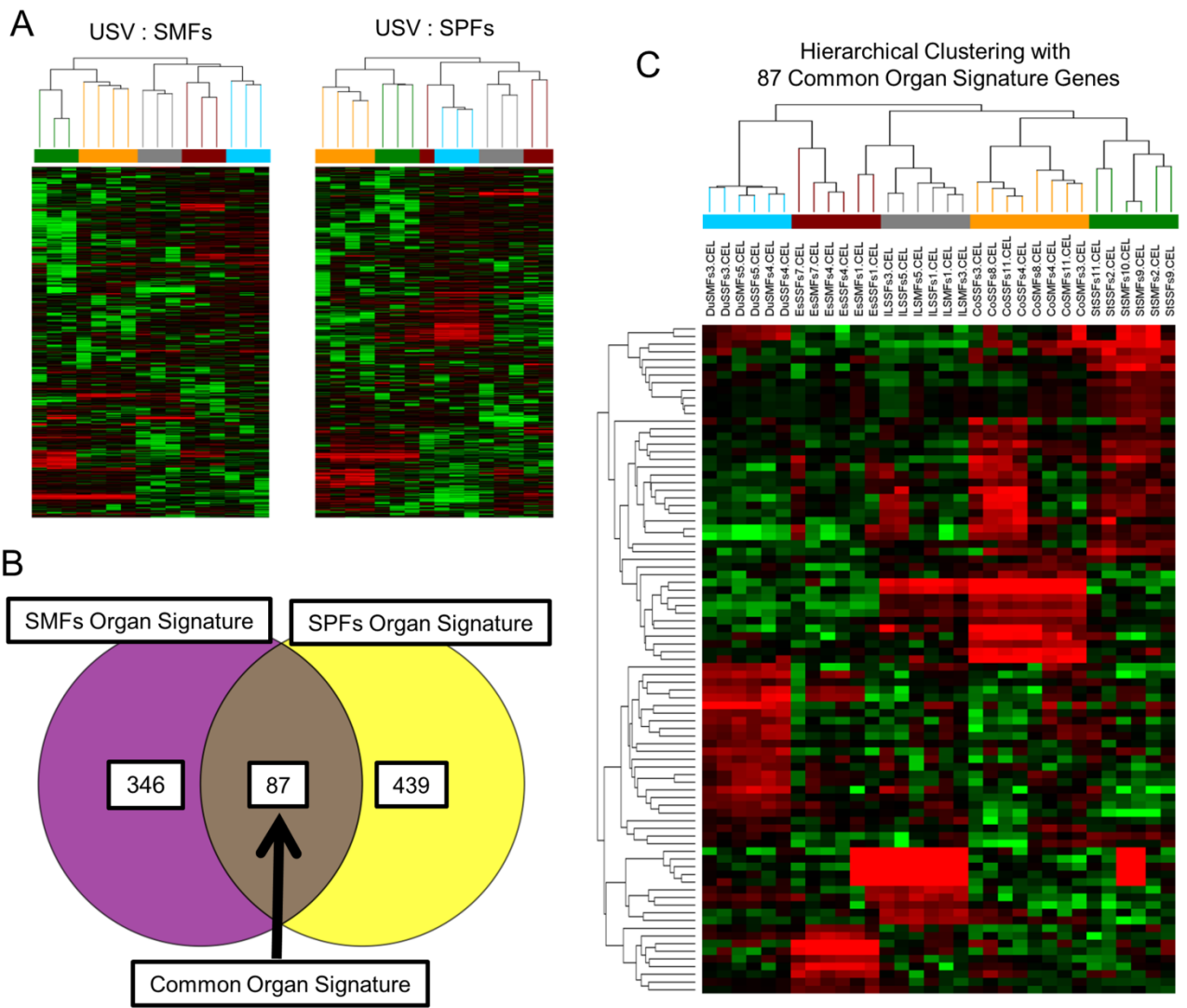


**C**

Annotation	Genes upregulated in SMFs	Genes upregulated in SPFs
Transcriptional regulation	HOPX, SMAD1, SMAD9, TBX2, ELL3, FOXF1, HIPK2, PITX1, SALL1, TCF21, ZNF81	DDIT3, GATA6, PHF17, WT1, BHLHE41, EBF2, EBF3, EZH2, FOXC1, IRX3, MSX1, NPAS2, TRIB3, MAFB, PRRX1
Signal ligands	BMP2, CSF1, PGF, WNT2B, WNT5B	BMP6, DKK1, INHBA, NGF, TGFB3, SFRP2, SFRP4
Extracellular matrix remodeling	COL27A1, LAMA3, LAMA5, ZP1, MMP3	ASPN, CCDC80, COL1A1, COL5A1, COL5A3, ECM2, HMCN1, MFAP5, MFAP2, POSTN, SPARC, VCAN

Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, Fig3  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.g003

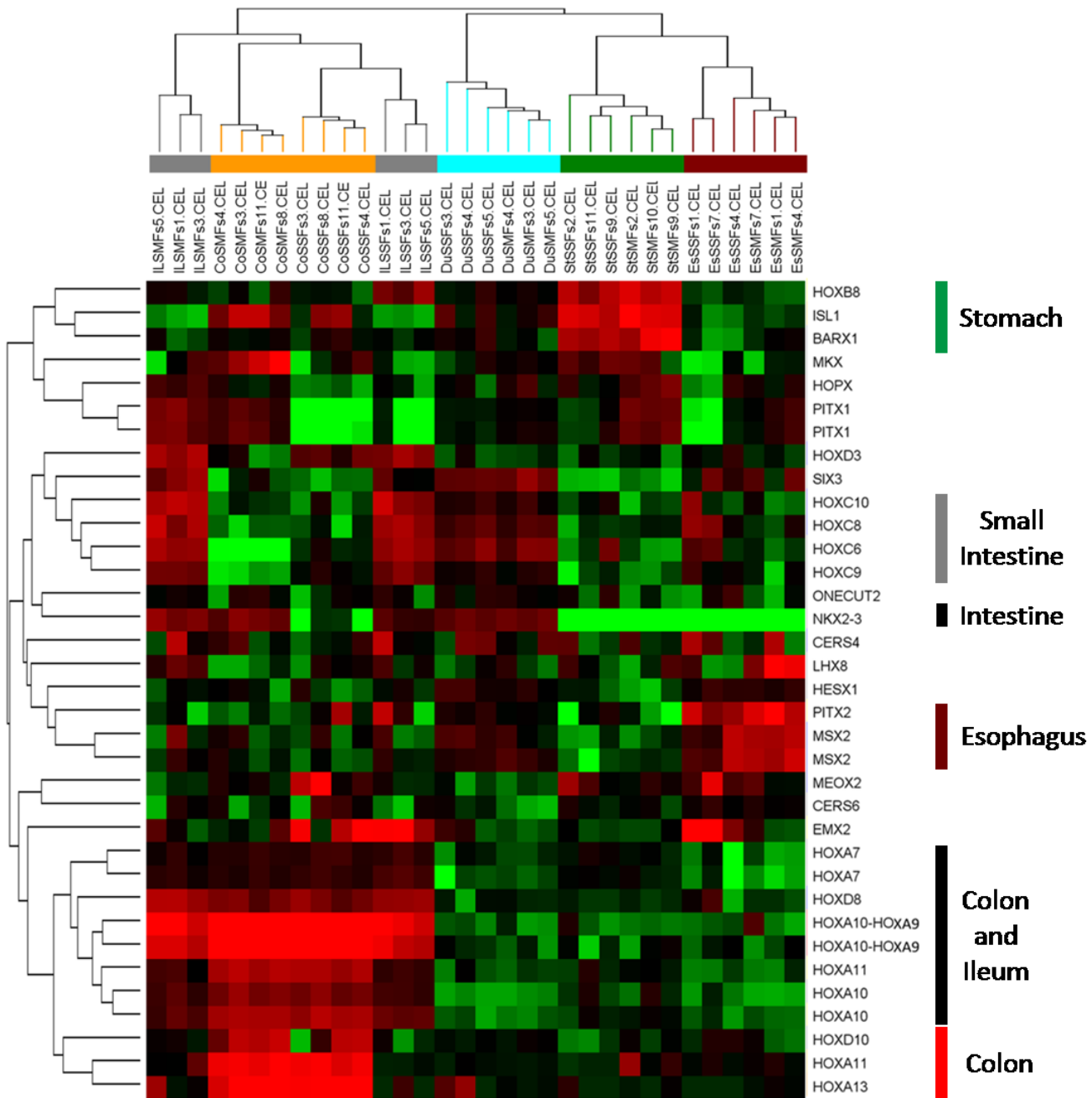
Fig 6. 消化管線維芽細胞は、解剖学的部位依存的な遺伝子発現プロファイルを有する



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, Fig4 (Modified)  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.g004

Fig 7. 消化管線維芽細胞は、臓器依存的な遺伝子発現プロファイルを有する

## Unsupervised : Homeobox Genes



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S3\_Fig (Modified)  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.s003

Fig 8. 消化管線維芽細胞における Homeotic 遺伝子の臓器依存的な階層性

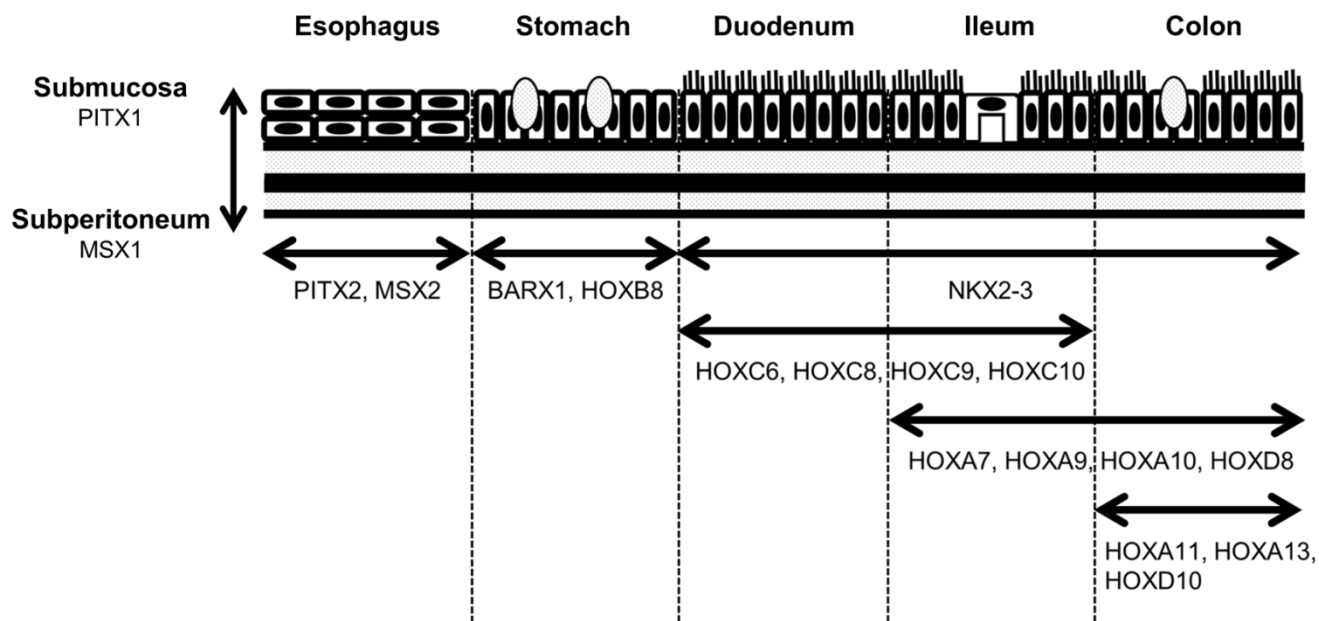
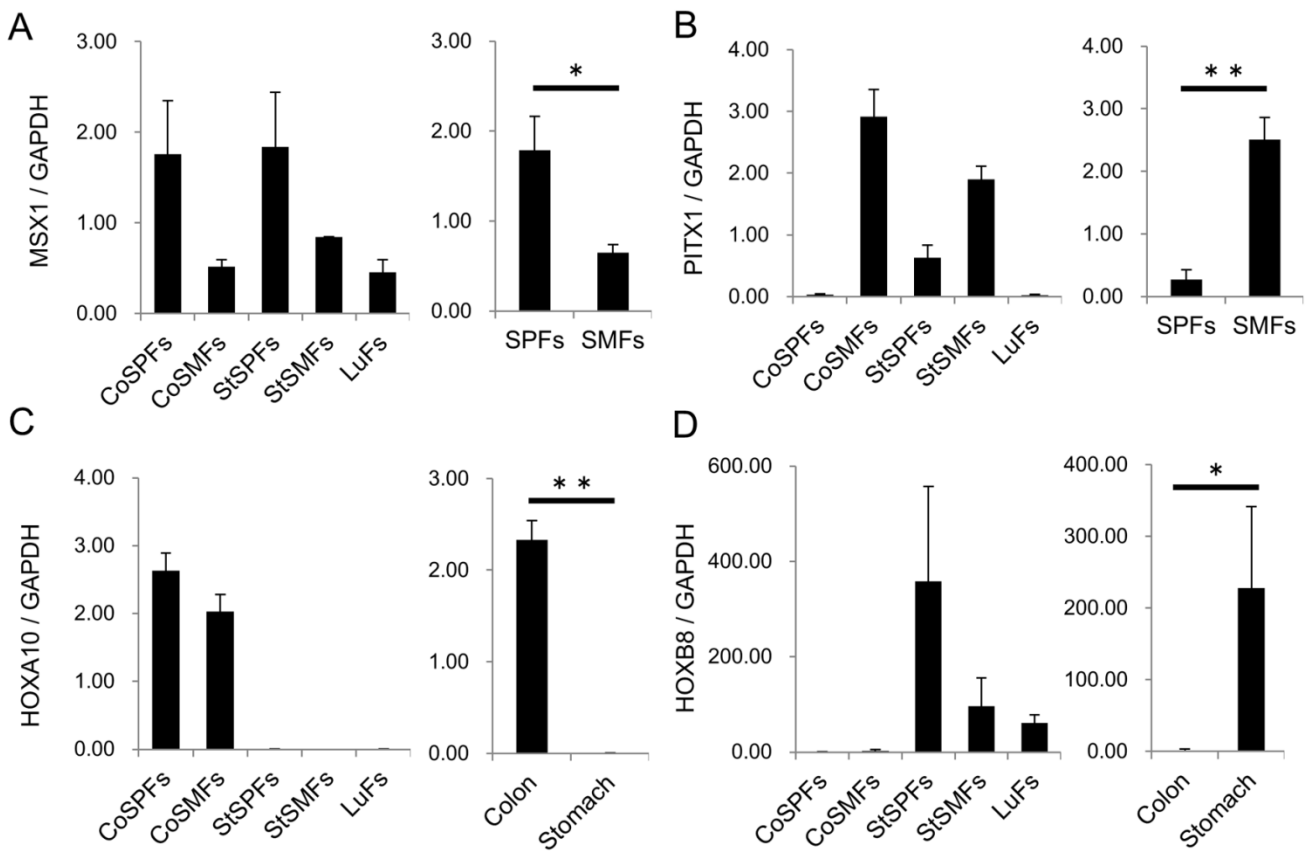
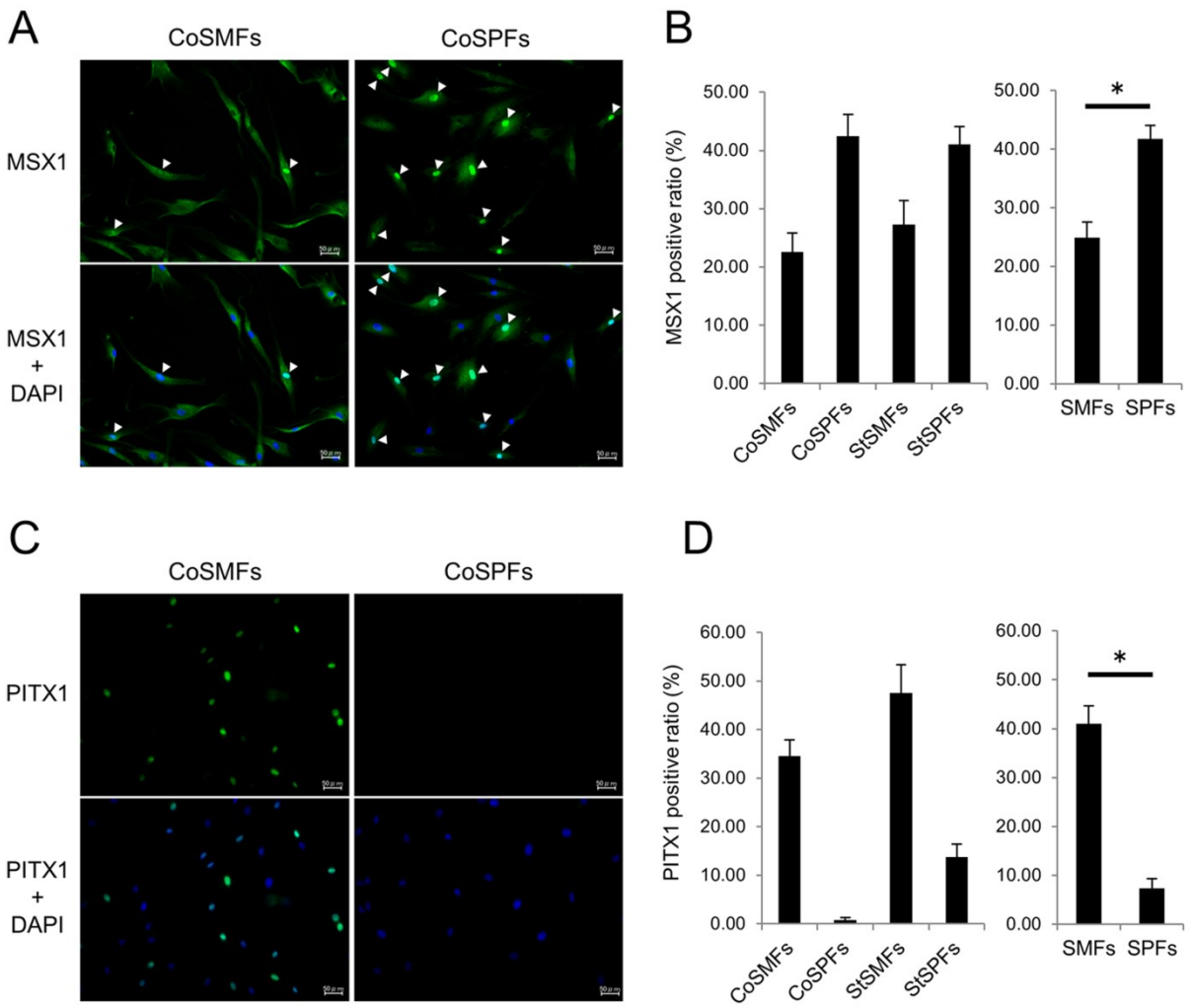


Fig 9. ヒト消化管組織を構成する線維芽細胞における Homeotic 遺伝子の発現の多様性



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, Fig5 (Modified)  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.g005

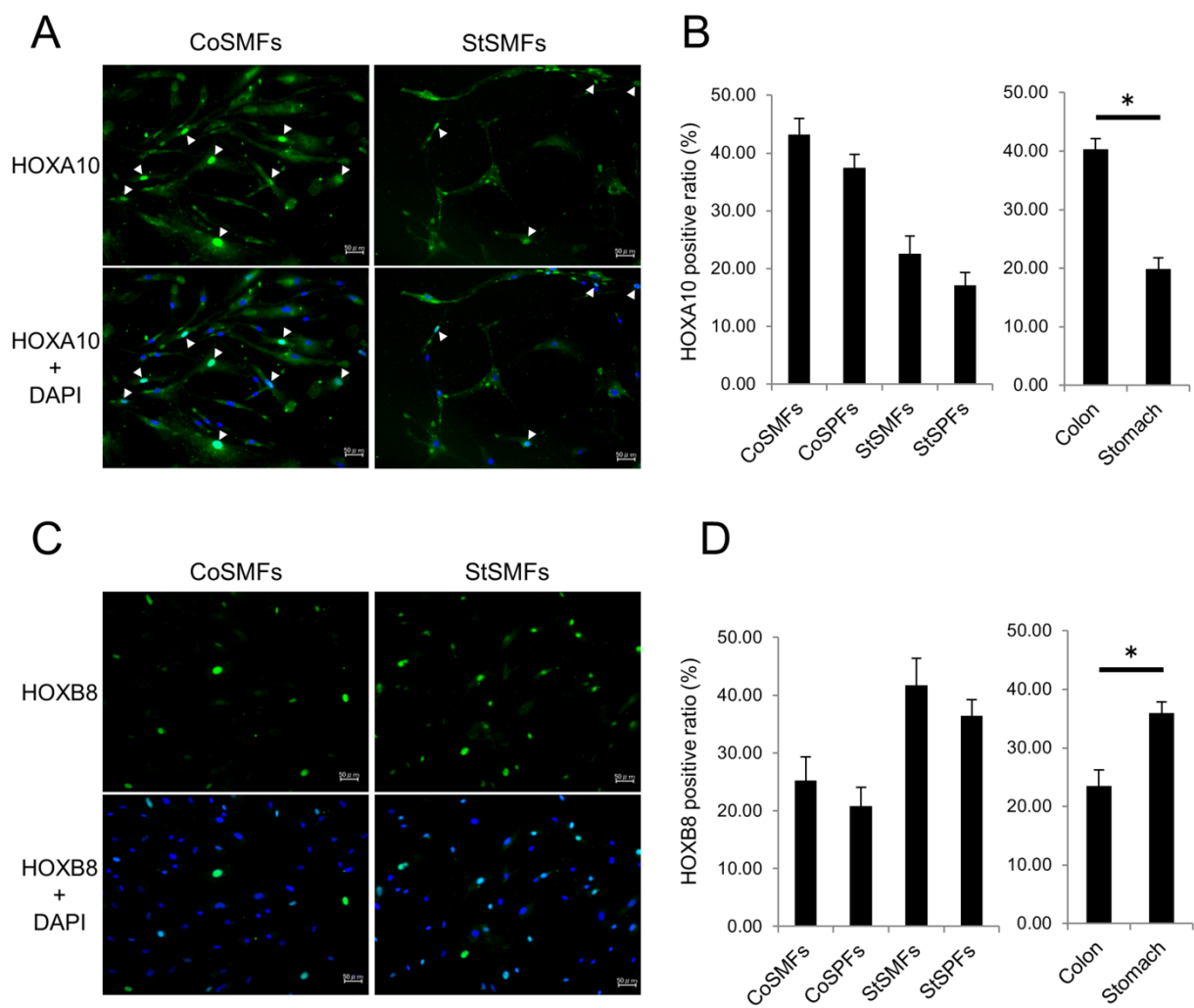
Fig 10. 定量的 RT-PCR によるマイクロアレイデータの再現性確認



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S4\_Fig  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.s004

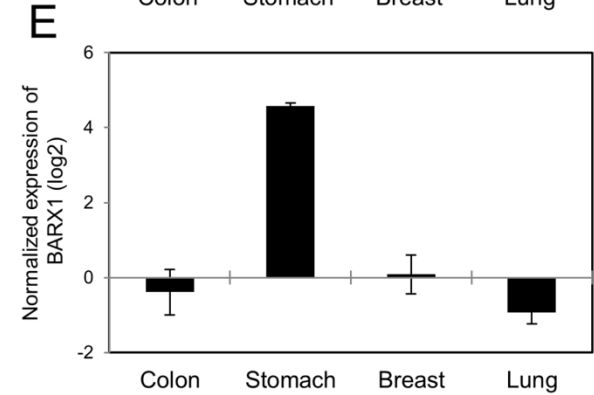
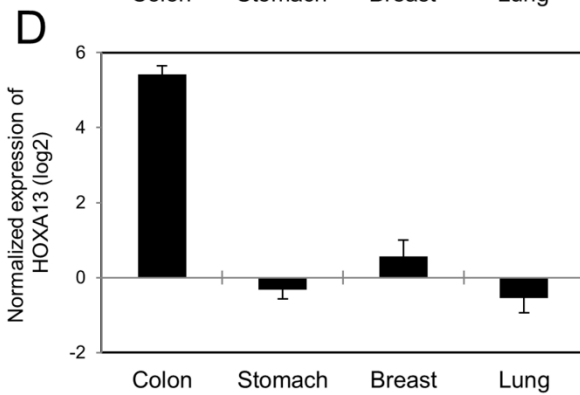
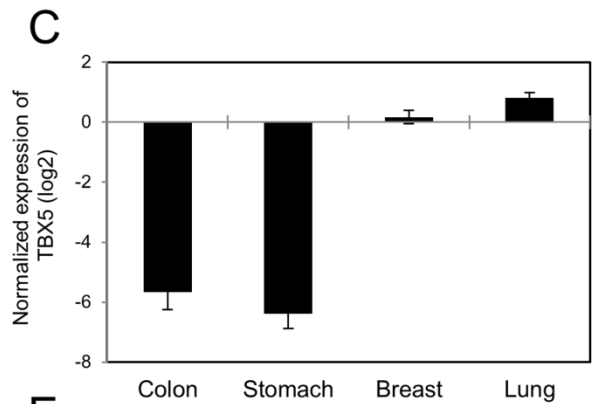
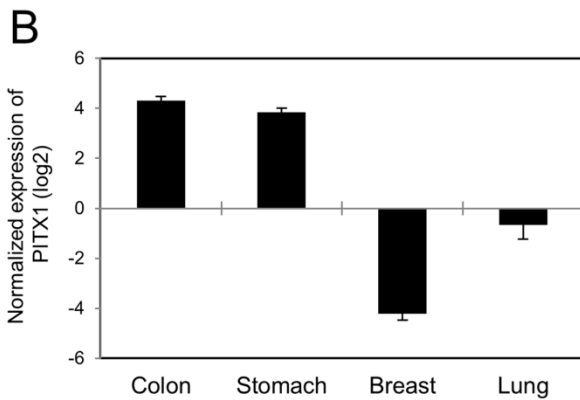
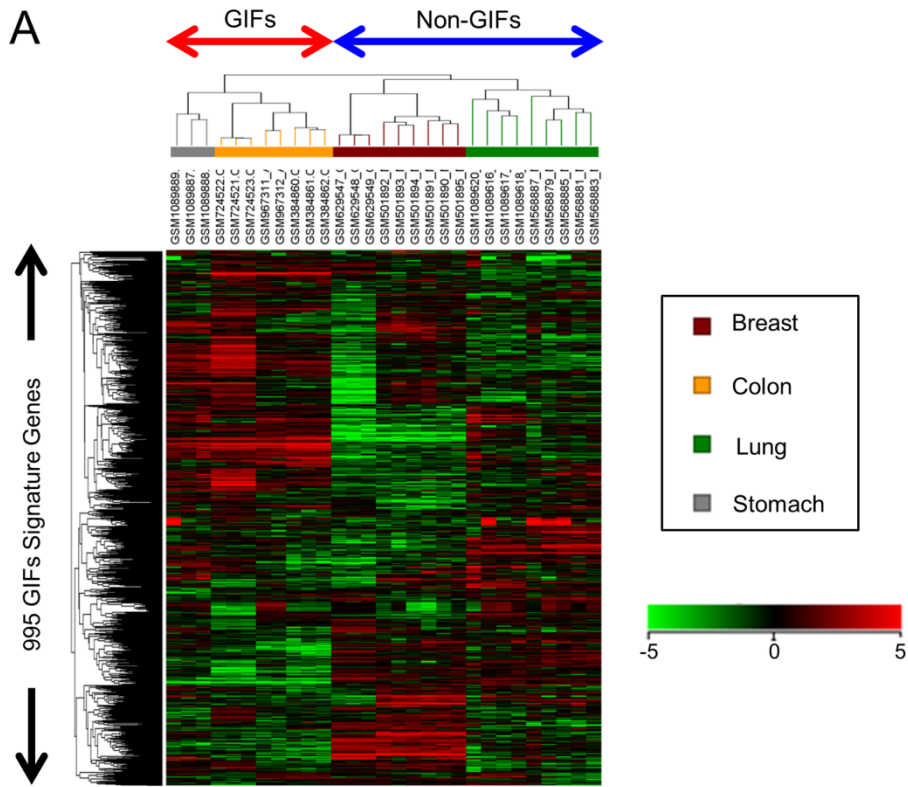
Fig 11. 免疫蛍光染色によるマイクロアレイデータの再現性確認 (*MSX1*, *PITX1*)





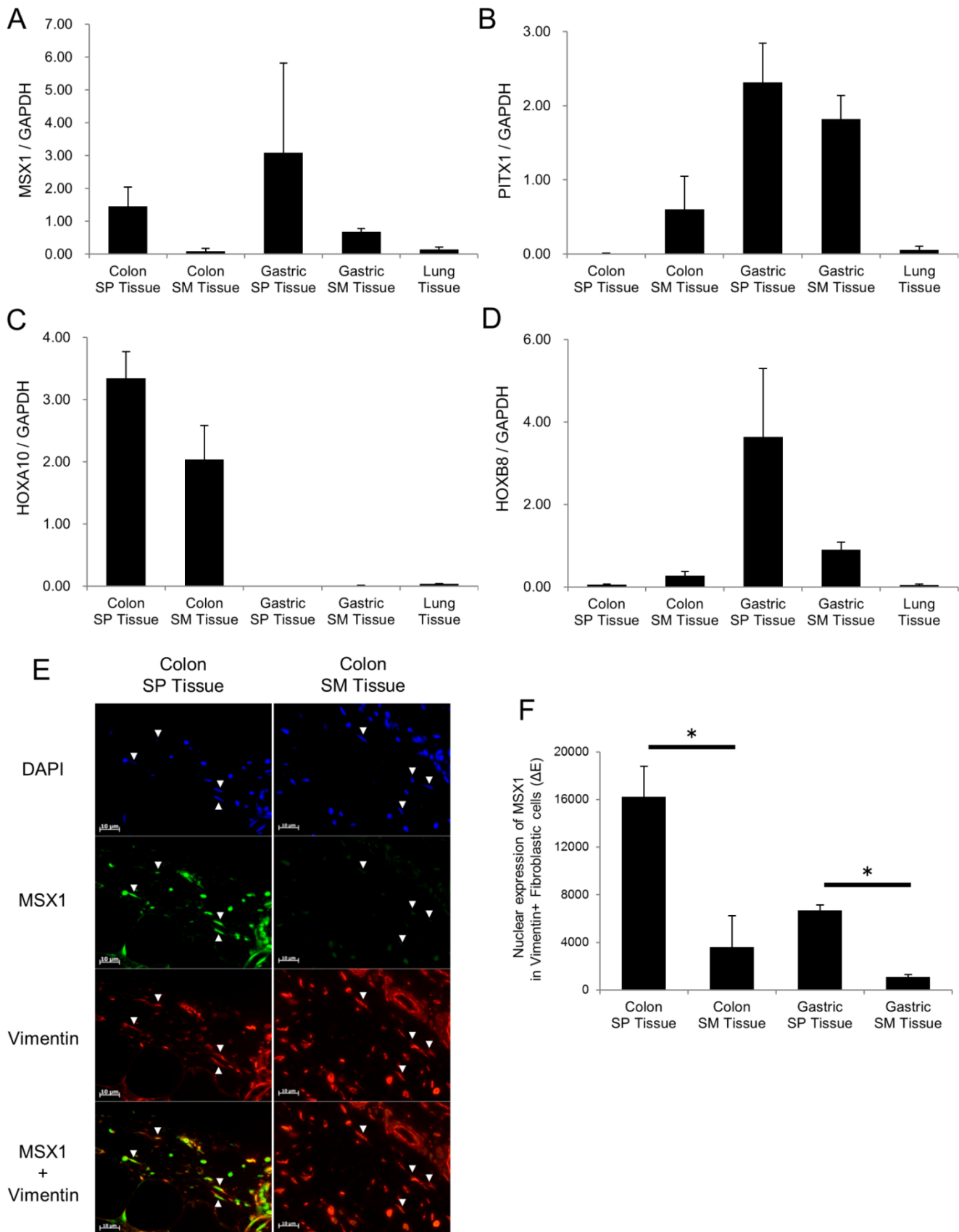
Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S5\_Fig  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.s005

Fig 12. 免疫蛍光染色によるマイクロアレイデータの再現性確認 (HOXA10, HOXB8)



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, S2\_Fig  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.s002

Fig 13. 公共マイクロアレイデータを用いた部位特異的遺伝子の発現の再現性確認



Higuchi Y et al., PLOS ONE, 2015, Fig6  
doi:10.1371/journal.pone.0129241.g006

Fig 14. ヒト消化管組織における臓器、解剖学的部位特異的遺伝子の発現

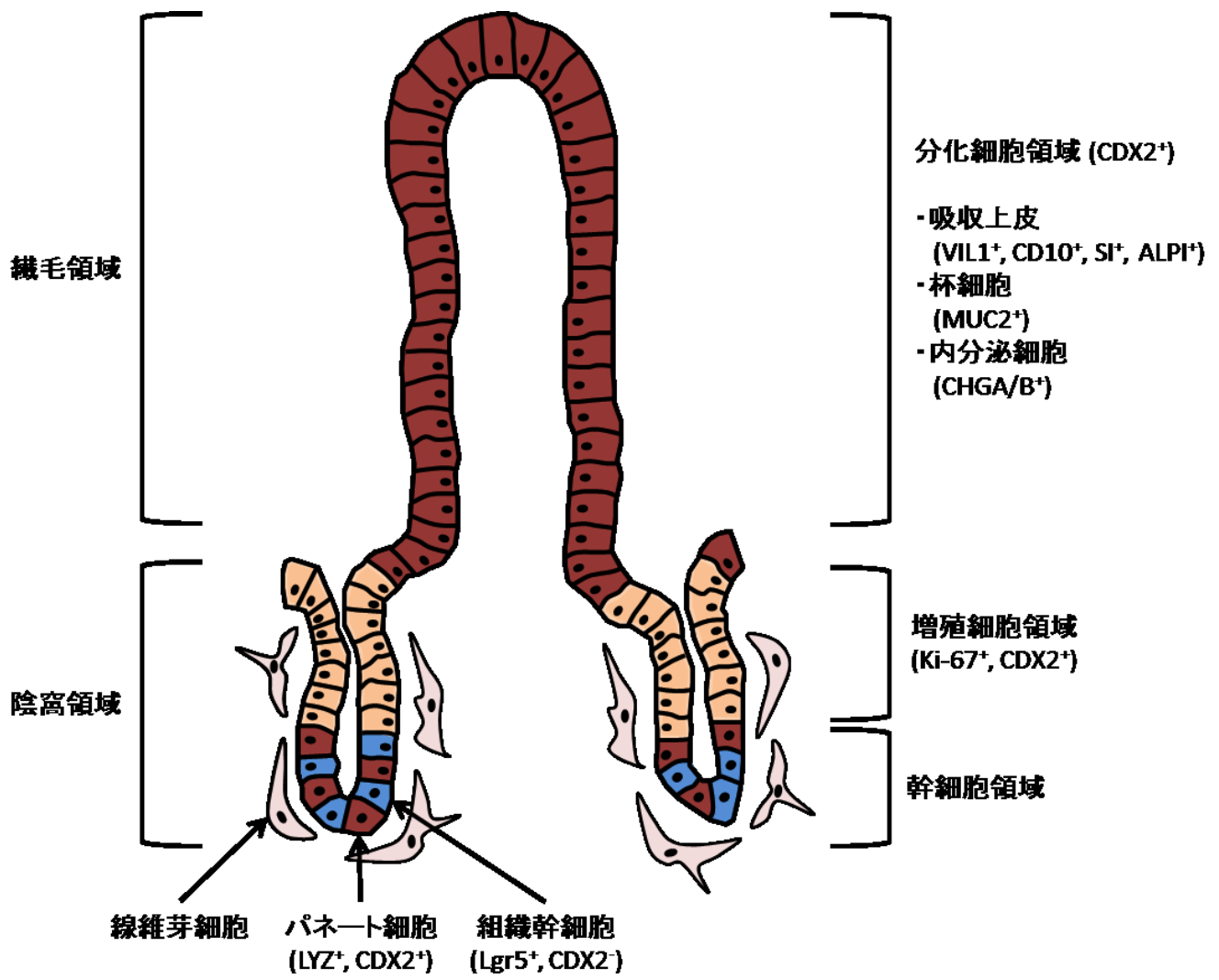


Fig 15. 腸管粘膜における腸上皮細胞の分化系譜と局在

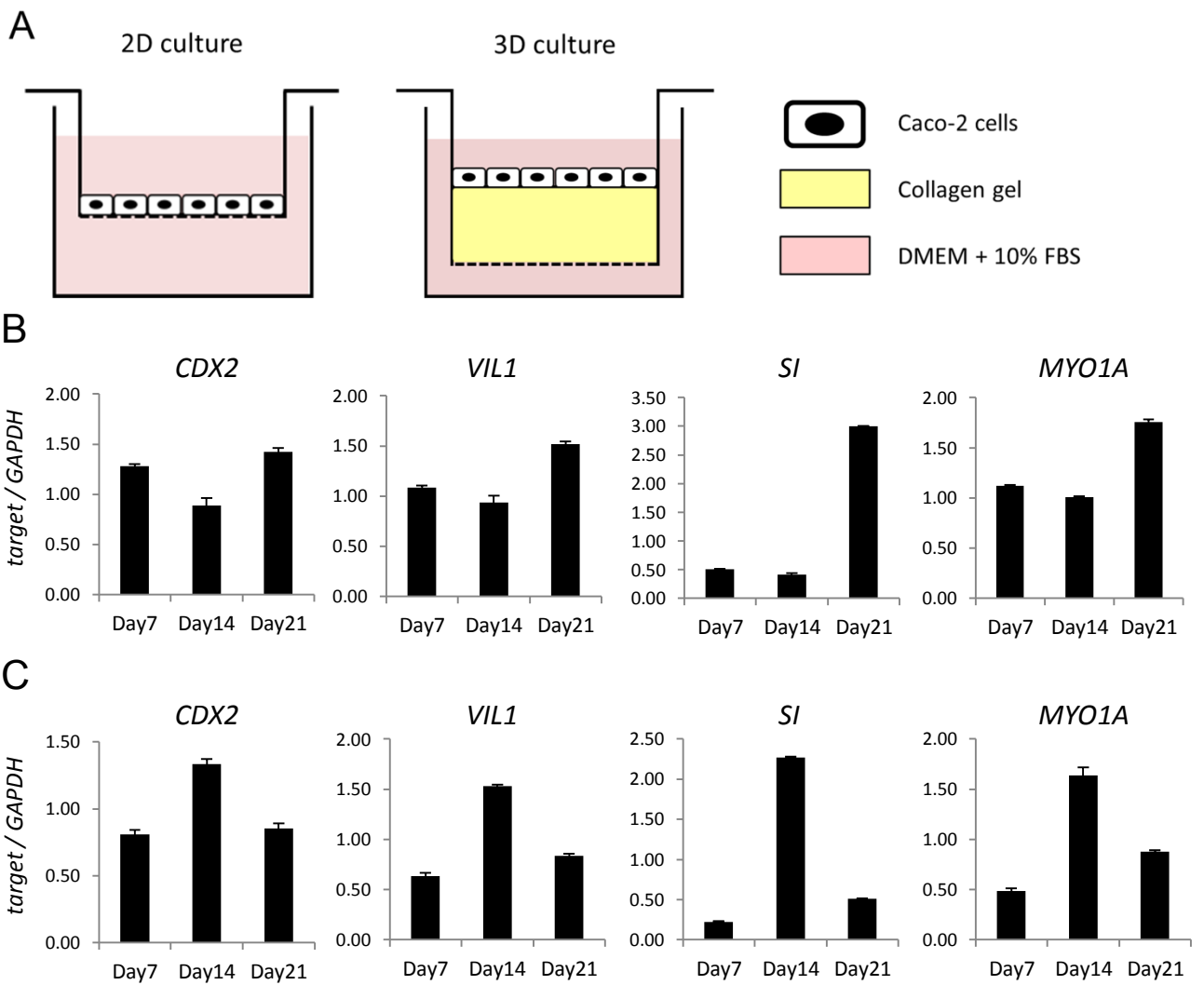


Fig 16. Caco-2 細胞の長期培養に伴う、腸上皮分化関連遺伝子の発現変化 (定量的 RT-PCR)

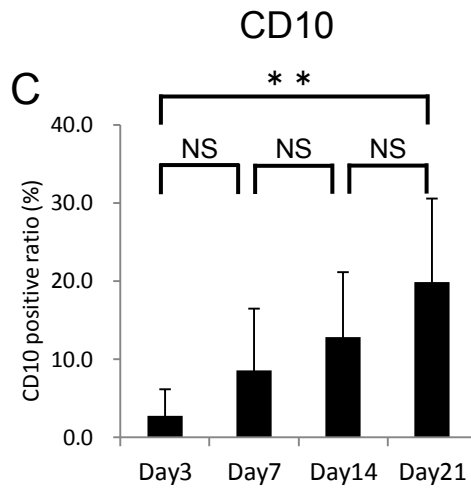
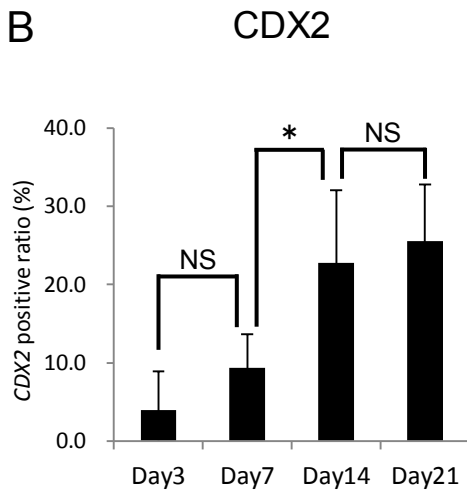
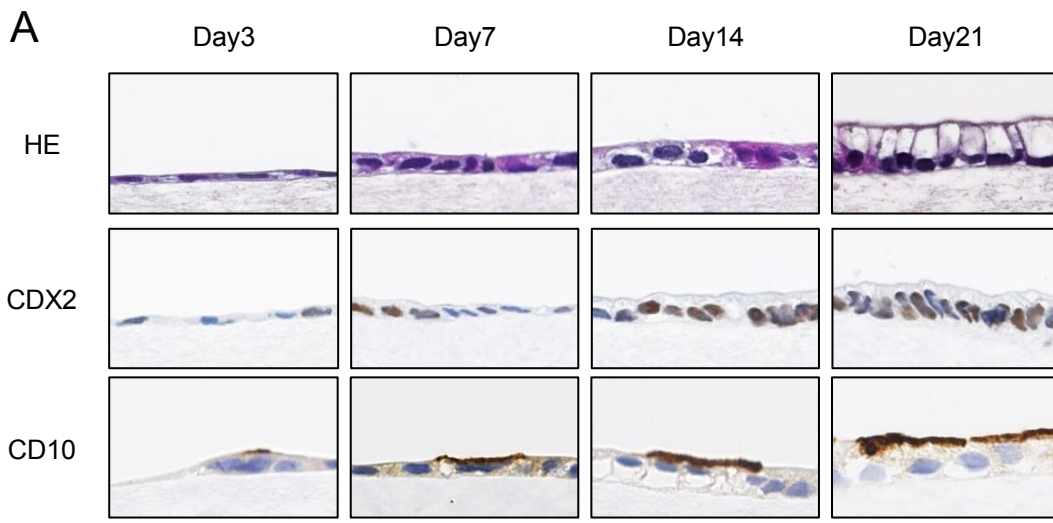


Fig 17. Caco-2 細胞の長期培養に伴う、腸上皮分化関連因子のタンパク質発現変化(免疫染色)

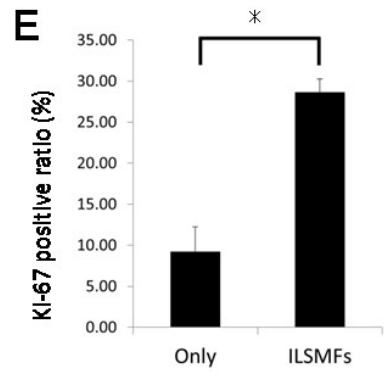
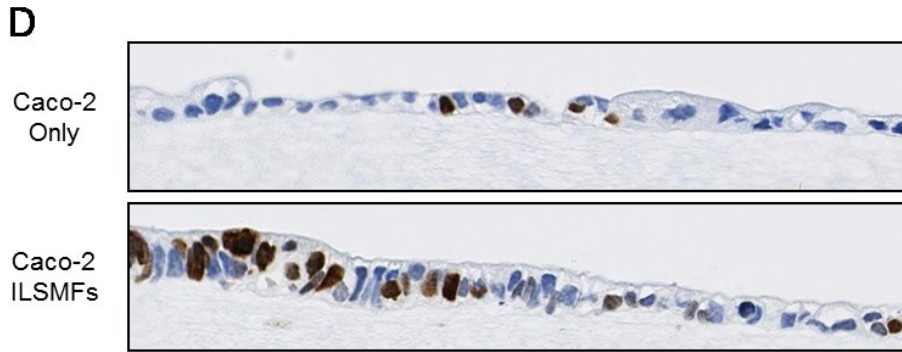
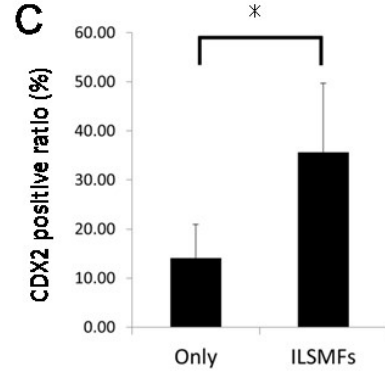
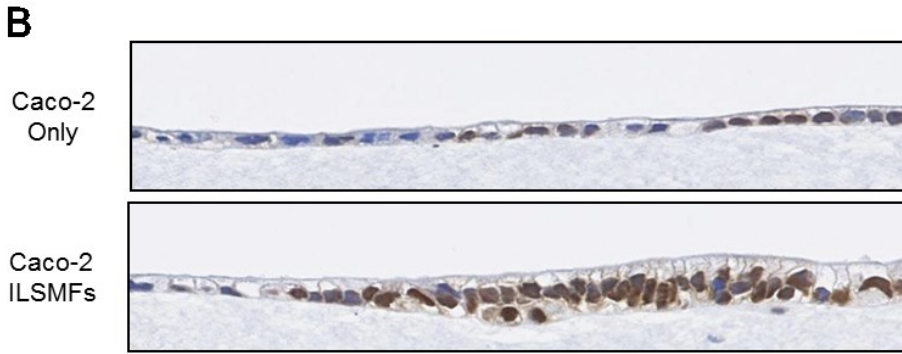
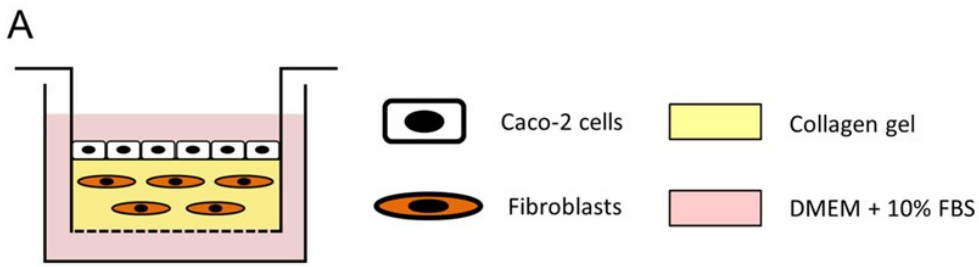


Fig 18. 3D 共培養下において回腸粘膜下層由来線維芽細胞は、Caco-2 細胞における *CDX2* および *Ki-67* の発現を亢進する

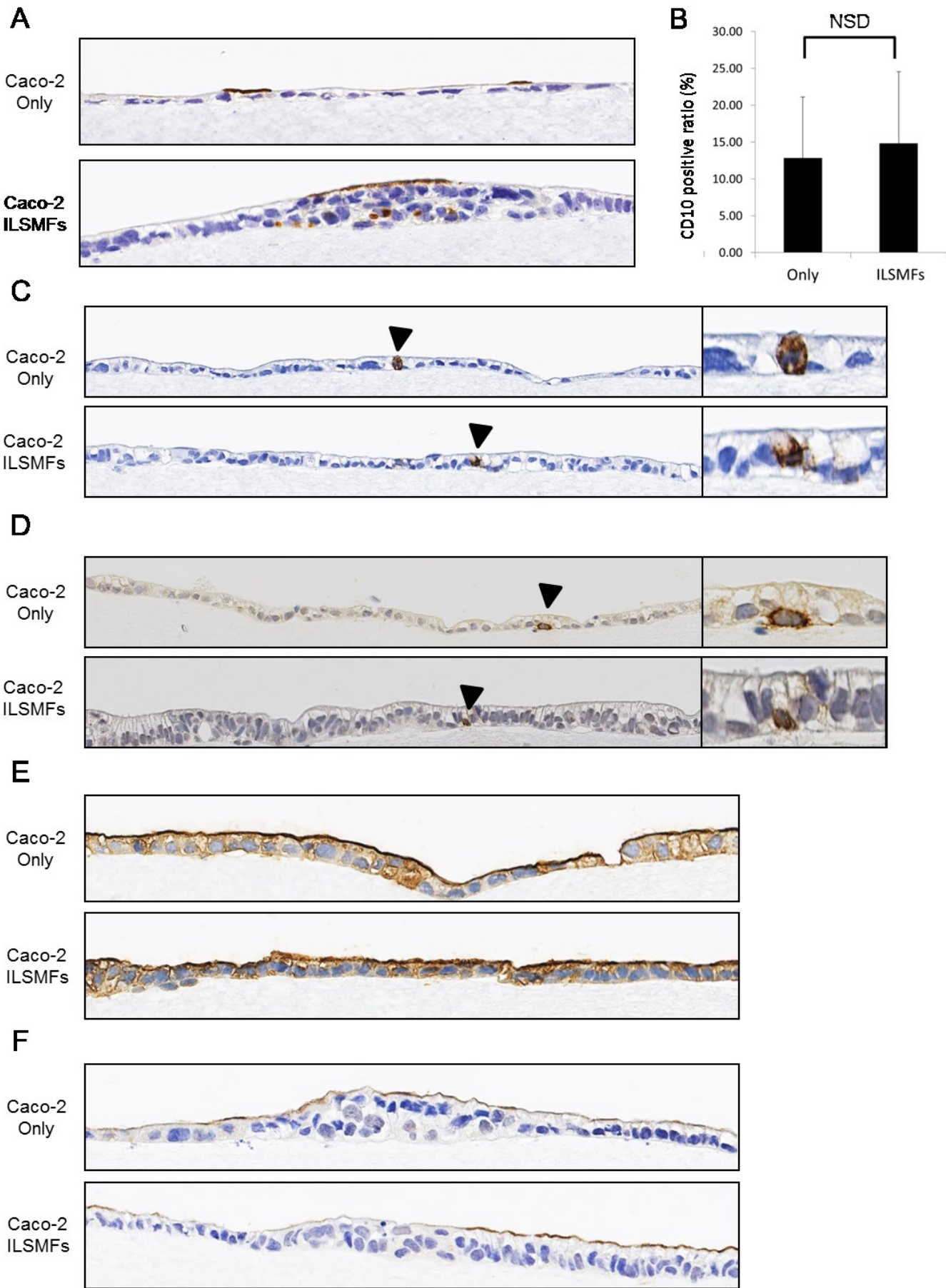


Fig 19. 回腸粘膜下層由来線維芽細胞は、Caco-2 細胞の成熟・機能性の獲得に寄与しない



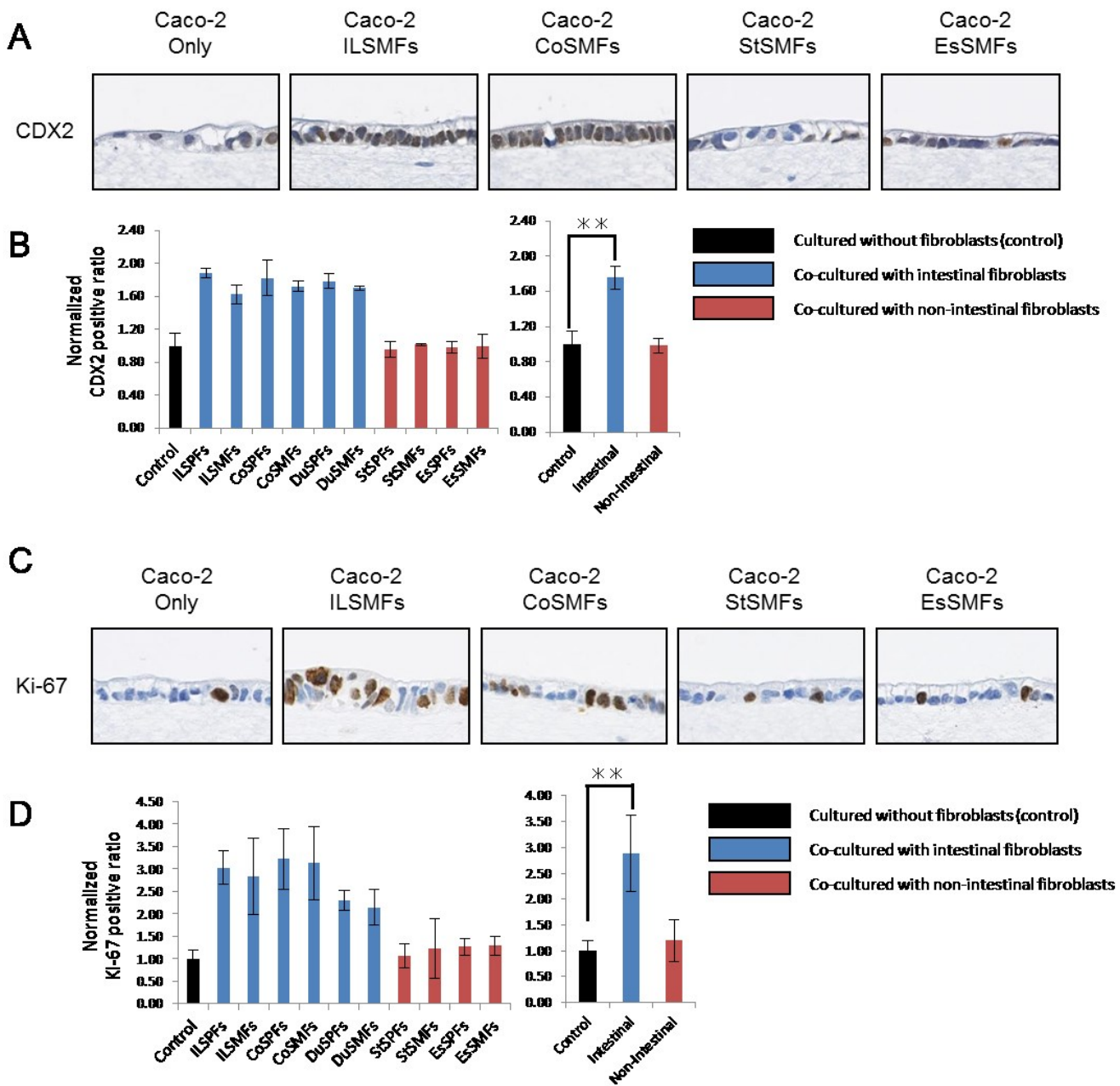


Fig 20. Caco-2 細胞に対する *CDX2* および *Ki-67* の発現亢進は、腸管線維芽細胞に特有である

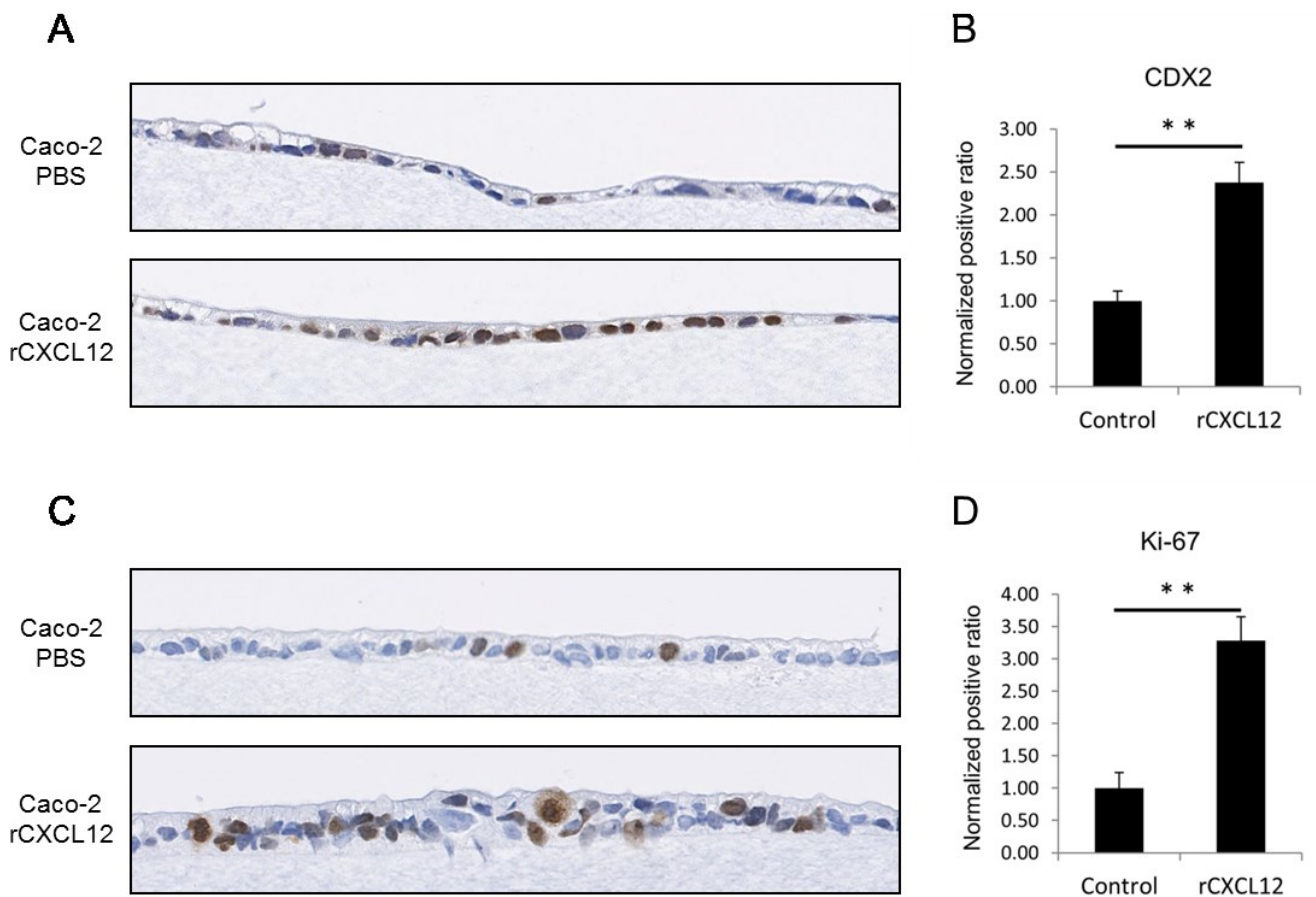


Fig 21. Recombinant *CXCL12/SDF1* は、Caco-2 細胞における *CDX2* および *Ki-67* の発現を亢進する

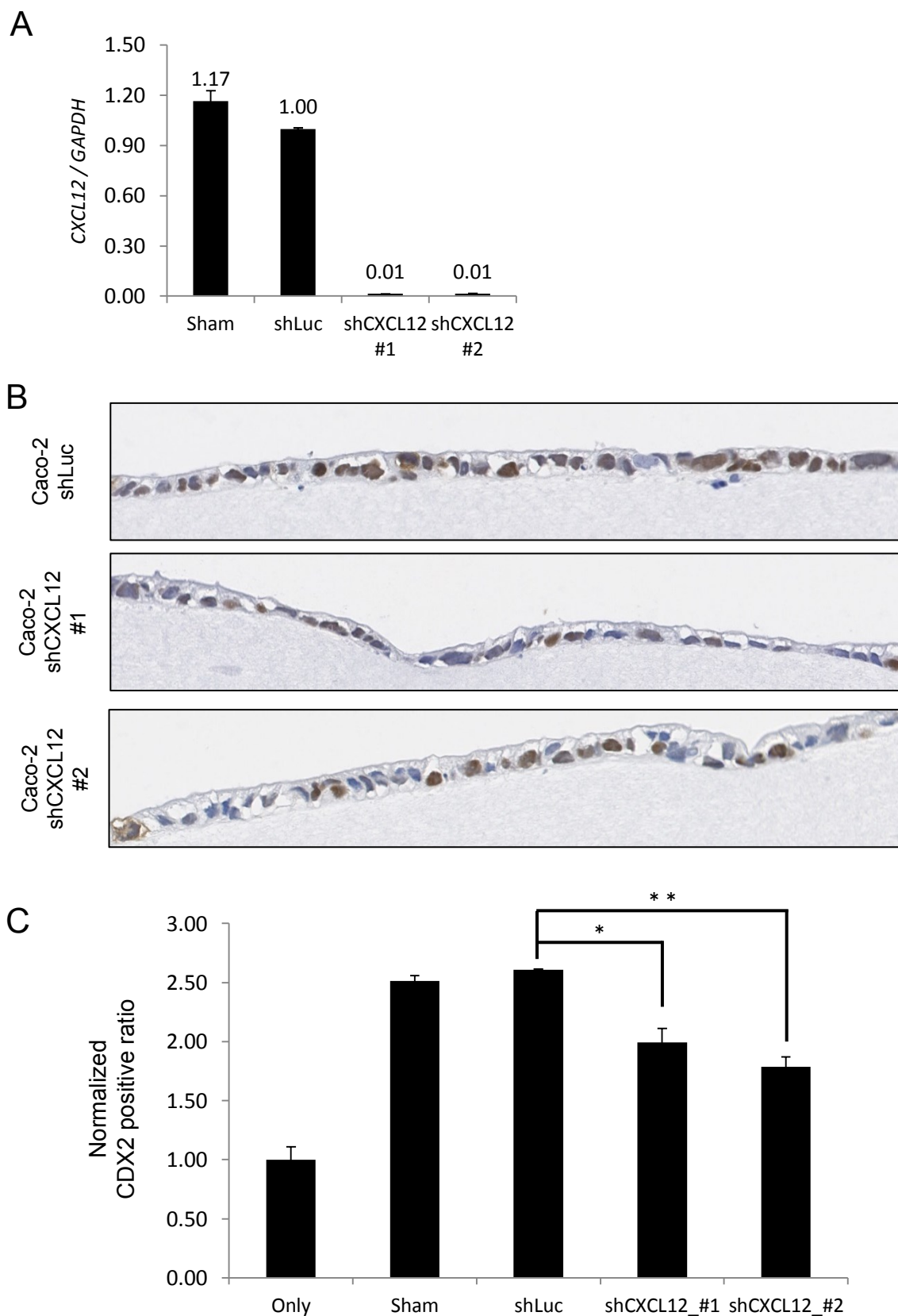


Fig 22. 腸管線維芽細胞における *CXCL12/SDF1* のノックダウンにより、Caco-2 細胞に対する *CDX2* の発現亢進が阻害される

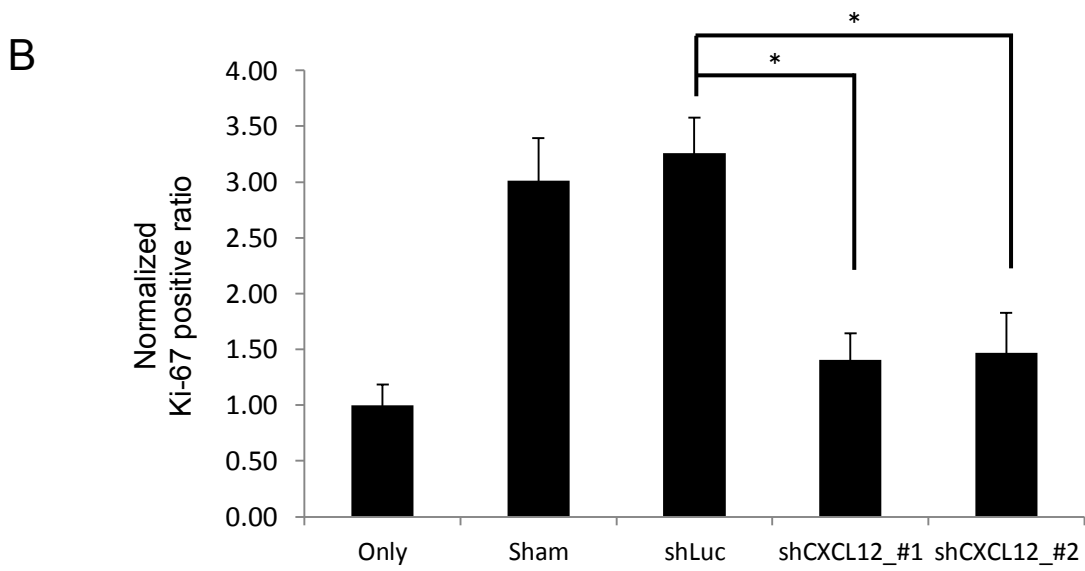
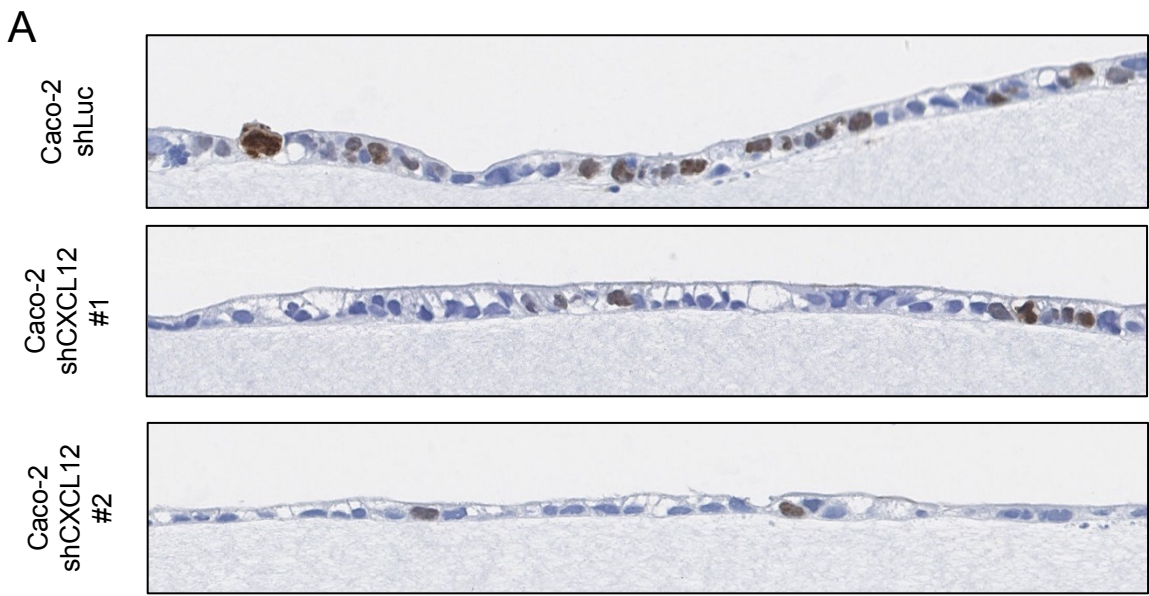


Fig 23. 腸管線維芽細胞における *CXCL12/SDF1* のノックダウンにより、Caco-2 細胞に対する *Ki-67* の発現亢進が阻害される

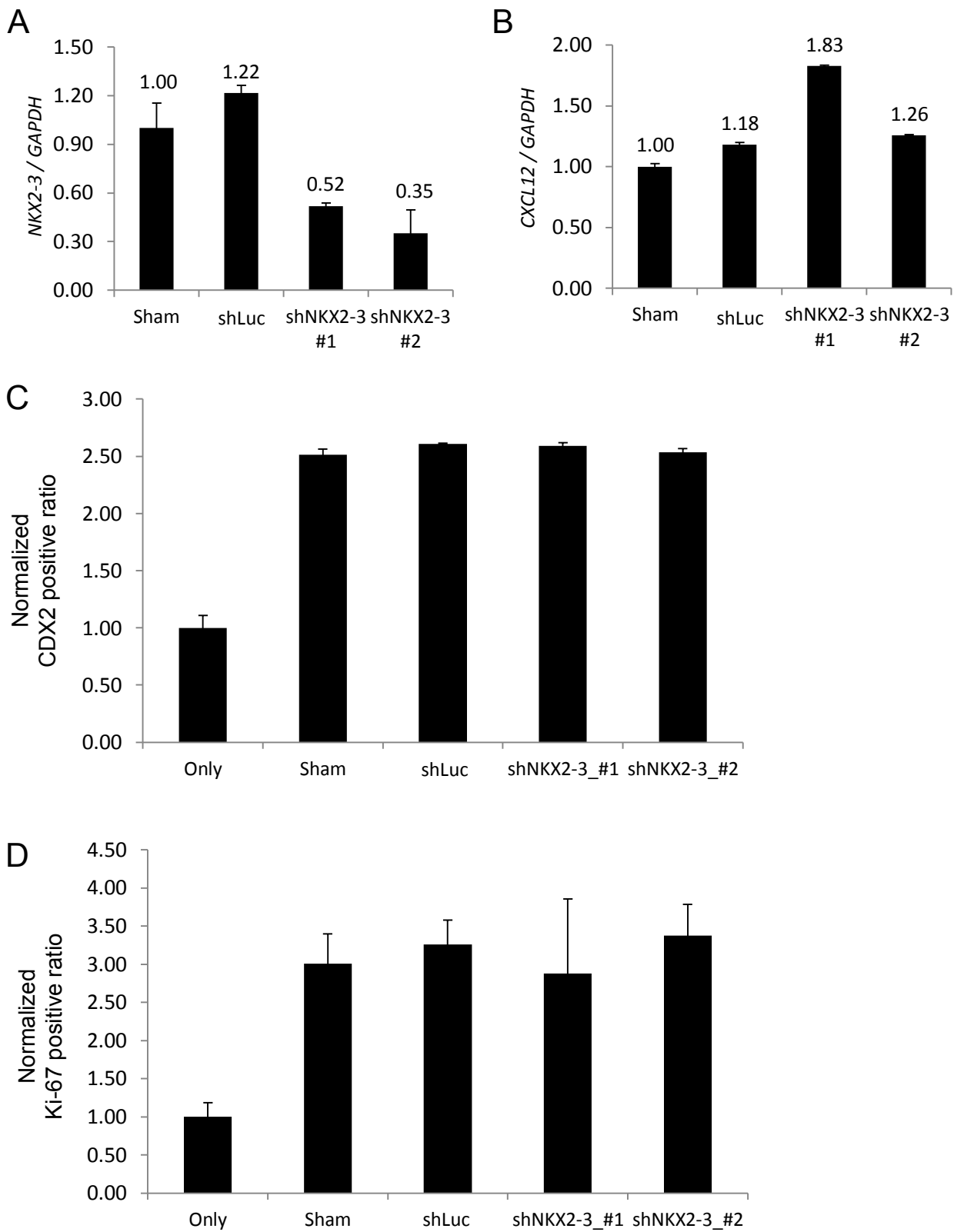


Fig 24. *NKX2-3* は腸管線維芽細胞における *CXCL12/SDF1* の発現制御、および Caco-2 細胞に対する *CDX2* や *Ki-67* の発現亢進に関与しない

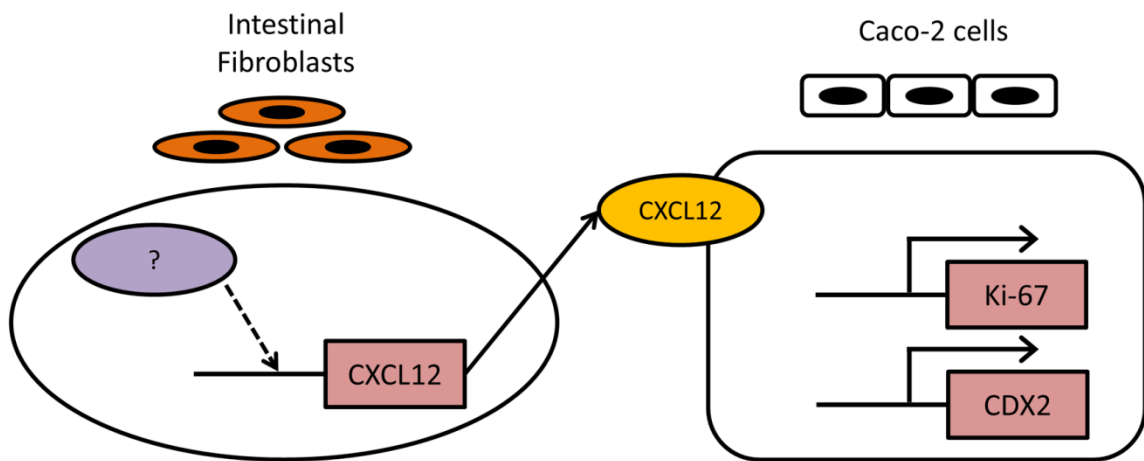


Fig 25. 腸管線維芽細胞による Caco-2 細胞の分化および増殖促進機構

A

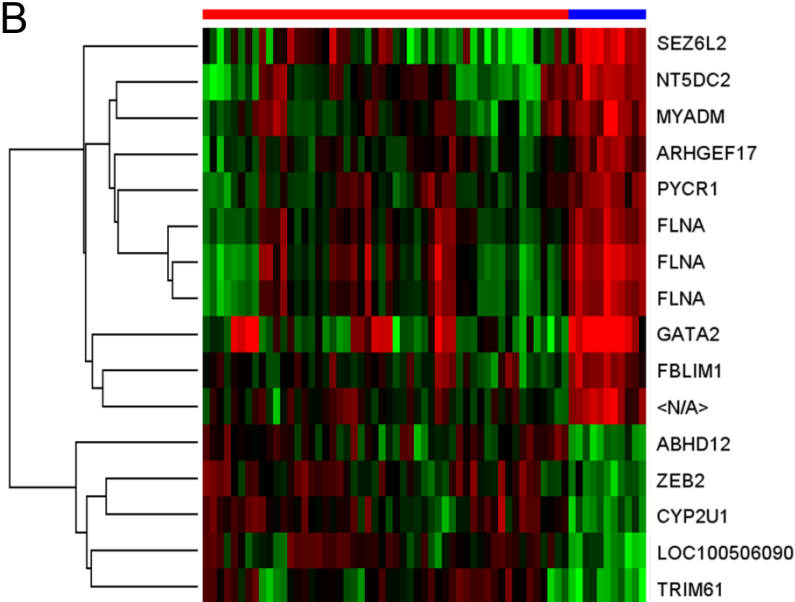
## 白人種で高発現の遺伝子群

Probe Set ID	Similarity	Japanese	Caucasian	Fold change	Gene Symbol
238951_at	0.71	-0.03	1.23	2.41	No Symbol
203756_at	0.65	-0.14	0.89	2.05	ARHGEF17
213746_s_at	0.65	-0.19	1.22	2.66	FLNA
214752_x_at	0.65	-0.05	1.05	2.14	FLNA
200859_x_at	0.62	-0.14	1.40	2.90	FLNA
225258_at	0.61	-0.08	0.98	2.09	FBLIM1
209710_at	0.61	-0.09	2.19	4.84	GATA2
218051_s_at	0.61	-0.29	1.29	2.99	NT5DC2
224920_x_at	0.61	-0.09	1.24	2.51	MYADM
202148_s_at	0.61	-0.10	0.95	2.08	PYCR1
233337_s_at	0.60	-0.47	1.56	4.07	SEZ6L2

## 日本人種で高発現の遺伝子群

Probe Set ID	Similarity	Japanese	Caucasian	Fold change	Gene Symbol
238069_at	-0.69	0.12	-1.11	2.36	LOC100506090
226402_at	-0.64	0.16	-0.94	2.13	CYP2U1
228124_at	-0.62	0.04	-1.02	2.07	ABHD12
238990_x_at	-0.62	0.00	-1.26	2.39	TRIM61
203603_s_at	-0.60	0.16	-0.84	2.00	ZEB2

B



C

Probe Set ID	Similarity	Gene Symbol
202992_at	0.61	C7
1554547_at	0.60	FAM13C

Supp Fig 1. ヒト線維芽細胞における個体間差に依存した遺伝子発現の解析  
(人種および年齢依存的遺伝子の探索)

A

GIFs – Non-GIFs 間で発現の異なる 995 probe sets に対する GO 解析 (Fig 5 と関連)

GO Term	P-value
regulation of developmental process	5.52E-16
negative regulation of megakaryocyte differentiation	1.21E-15
extracellular region	2.49E-15
system development	5.22E-14
negative regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation	5.22E-14
regulation of multicellular organismal development	5.22E-14
multicellular organismal process	5.99E-14
regulation of multicellular organismal process	1.12E-13
single-multicellular organism process	2.40E-12
multicellular organismal development	3.39E-12
extracellular region part	3.39E-12
regulation of megakaryocyte differentiation	3.67E-12
regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation	3.49E-11
anatomical structure development	1.01E-10
single-organism developmental process	1.53E-10
regulation of cell differentiation	1.78E-10
nucleosome	2.36E-10
signaling	2.36E-10
single organism signaling	2.36E-10
DNA bending complex	2.36E-10

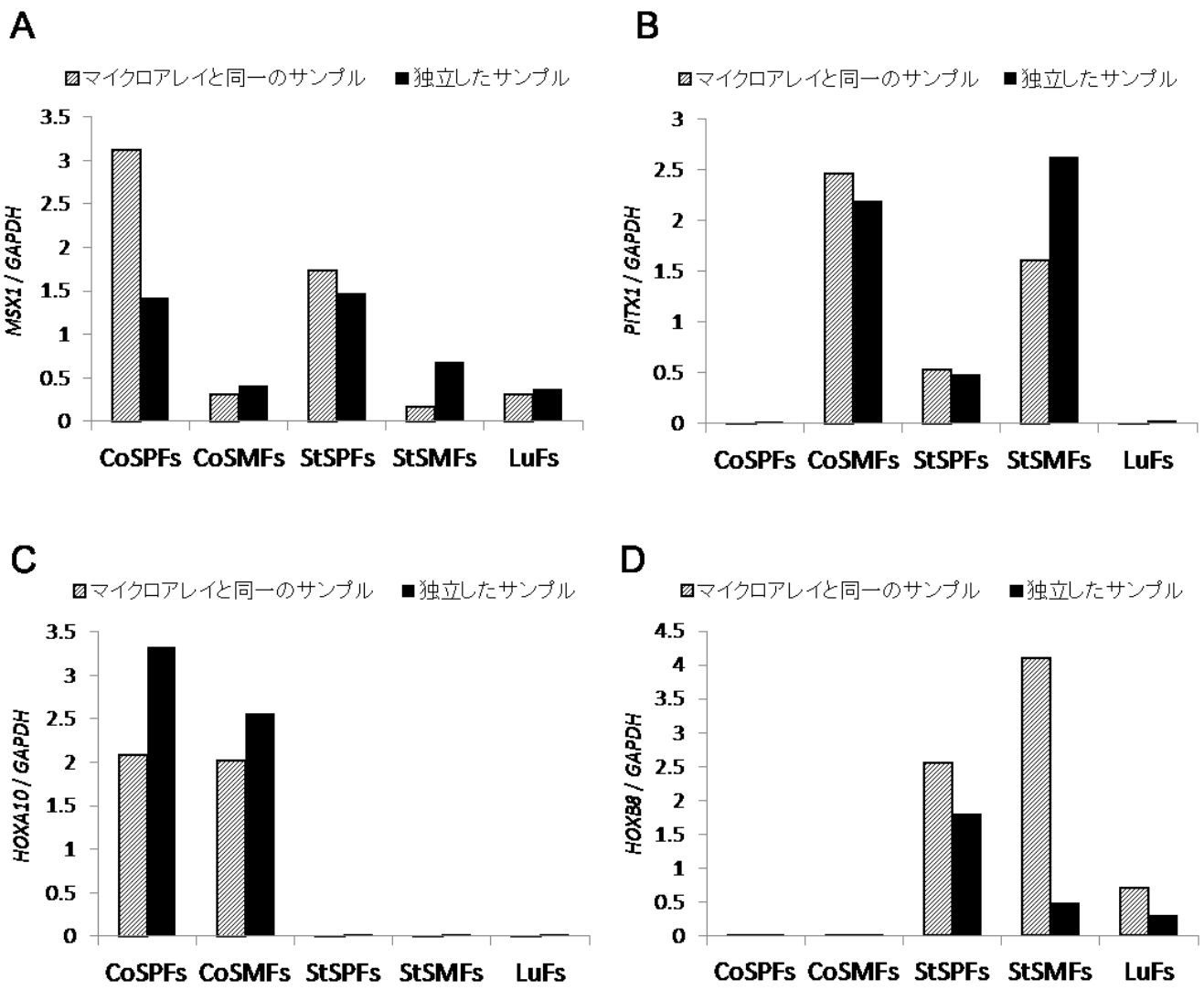
B

SMFs – SPFs 間で発現の異なる 498 probe sets に対する GO 解析 (Fig 6 と関連)

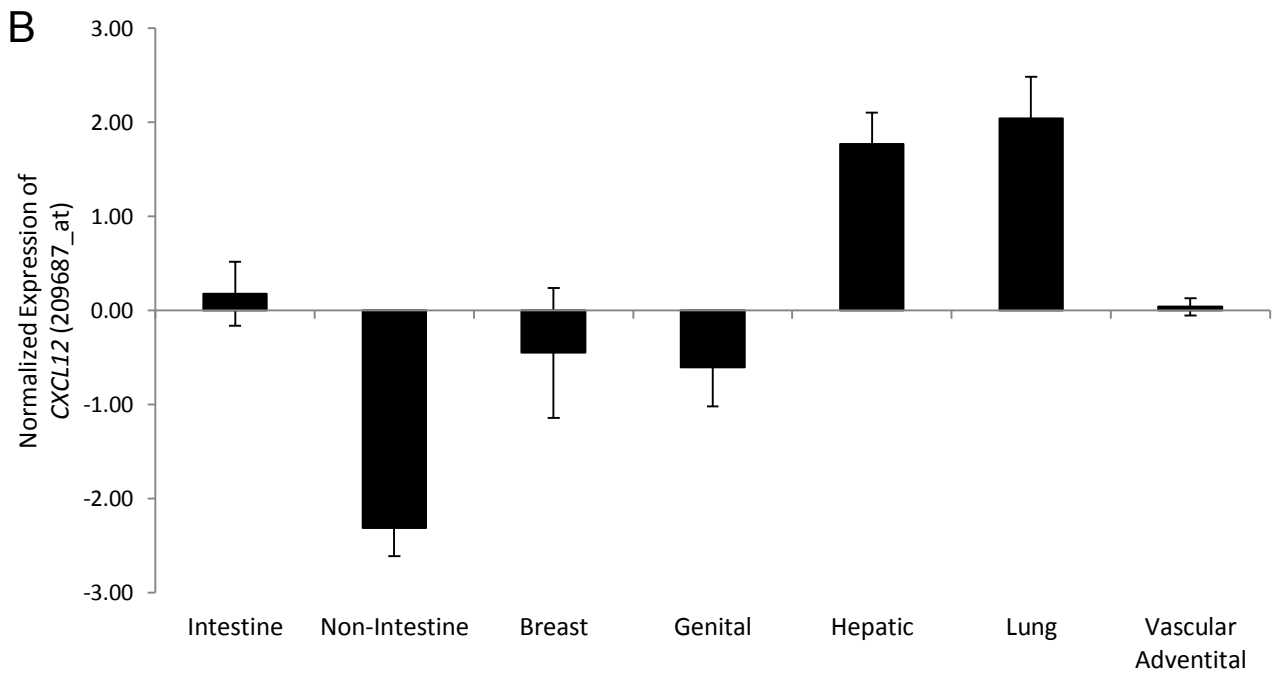
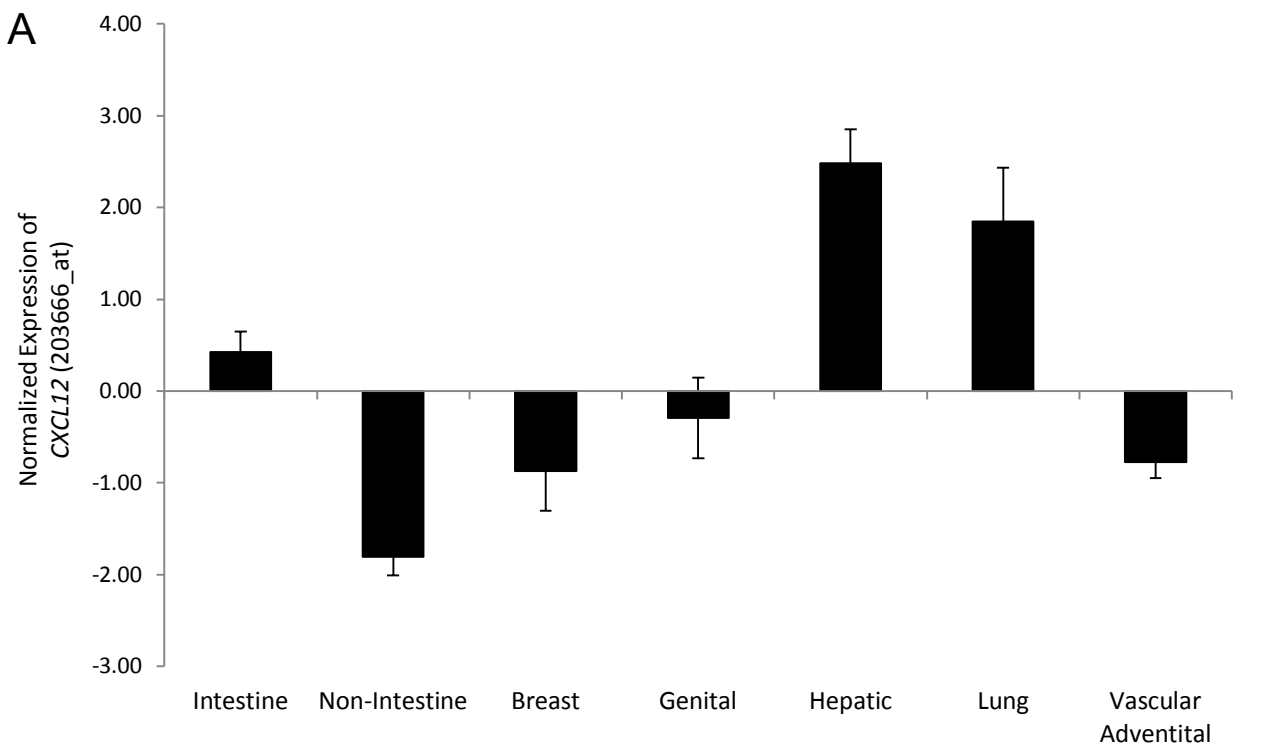
GO Term	P-value
multicellular organismal development	1.92E-10
Developmental process	1.92E-10
anatomical structure development	1.92E-10
system development	1.94E-10
extracellular region part	1.96E-10
regulation of developmental process	1.96E-10
tissue development	1.00E-09
extracellular matrix	1.37E-08
regulation of cell differentiation	1.53E-08
positive regulation of developmental process	1.53E-08
positive regulation of cell differentiation	3.70E-08
regulation of multicellular organismal process	3.70E-08
anatomical structure morphogenesis	3.96E-08
cell differentiation	5.63E-08
proteinaceous extracellular matrix	6.16E-08
regulation of multicellular organismal development	6.49E-08
multicellular organismal process	7.33E-08
regulation of cell proliferation	1.19E-07
cellular developmental process	1.54E-07
negative regulation of biological process	3.12E-07

Supp Fig 2. GIFs – Non-GIFs 間、および SMFs – SPFs 間で発現の異なる遺伝子群に対する Gene Ontology 解析 (Fig 5, 6 と関連)





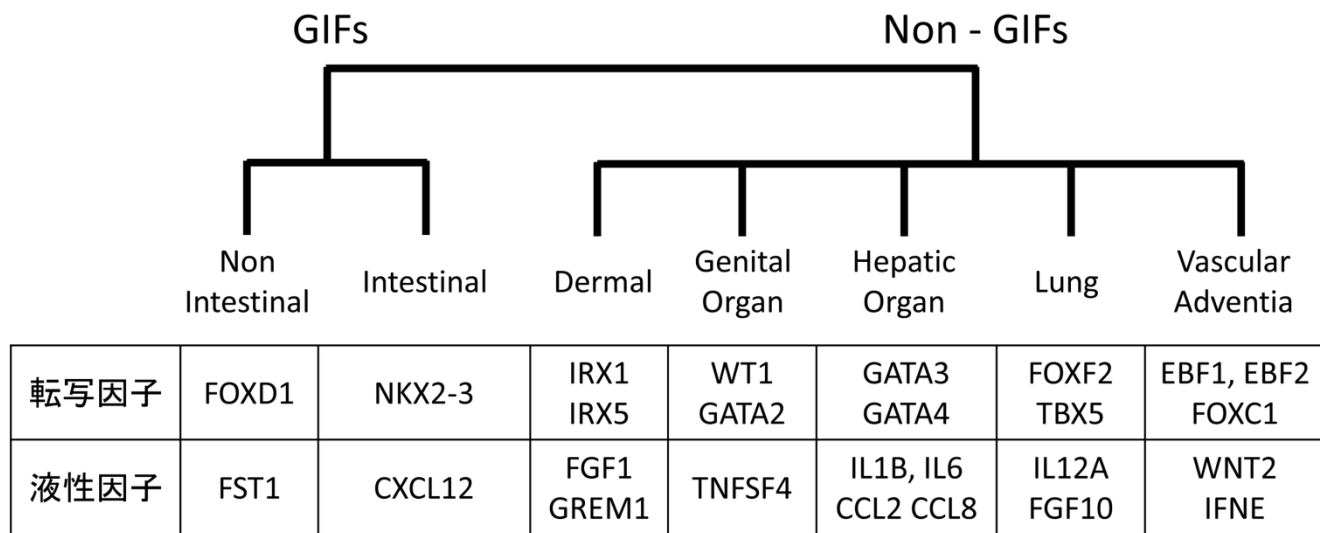
Supp Fig 3. マイクロアレイに用いたのと同じの total RNA サンプルを用いた再現性解析 (qRT-PCR; Fig 10 と関連)



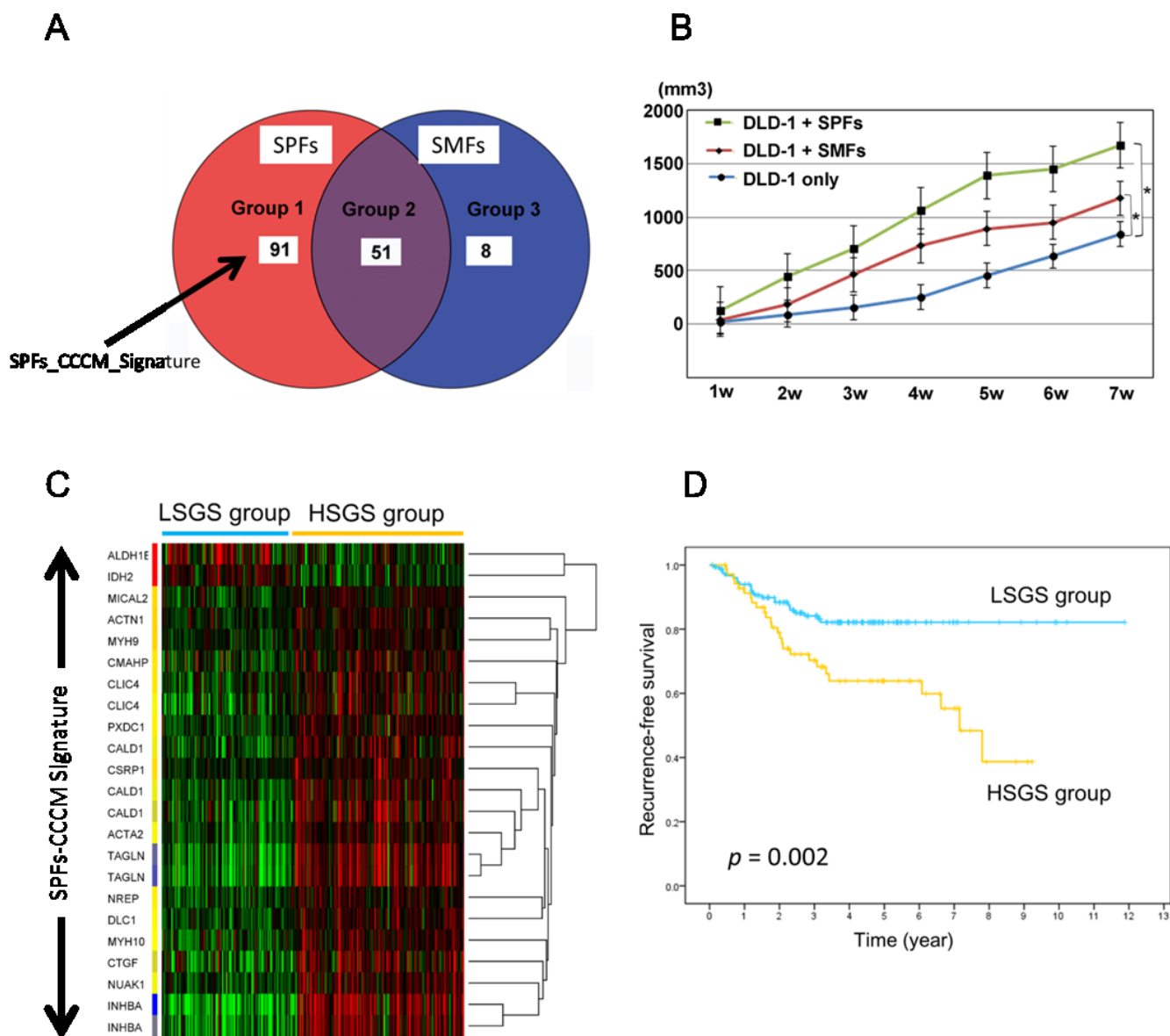
**C**

probe sets ID	Number of $R^2 > 0.6$	Number of $R^2 < 0.6$
203666_at	0	1
209687_at	0	1

Supp Fig 4. ヒト線維芽細胞において *CXCL12/SDF1* と発現が相関する転写因子は存在しない



Supp Fig 5. ヒト線維芽細胞における臓器特異的な転写因子および液性因子の発現



(A, B)

Kojima M, Higuchi Y, et al., PLOS ONE, 2014, Fig4 and Fig 5 (Modified)

doi:10.1371/journal.pone.0088018.g004

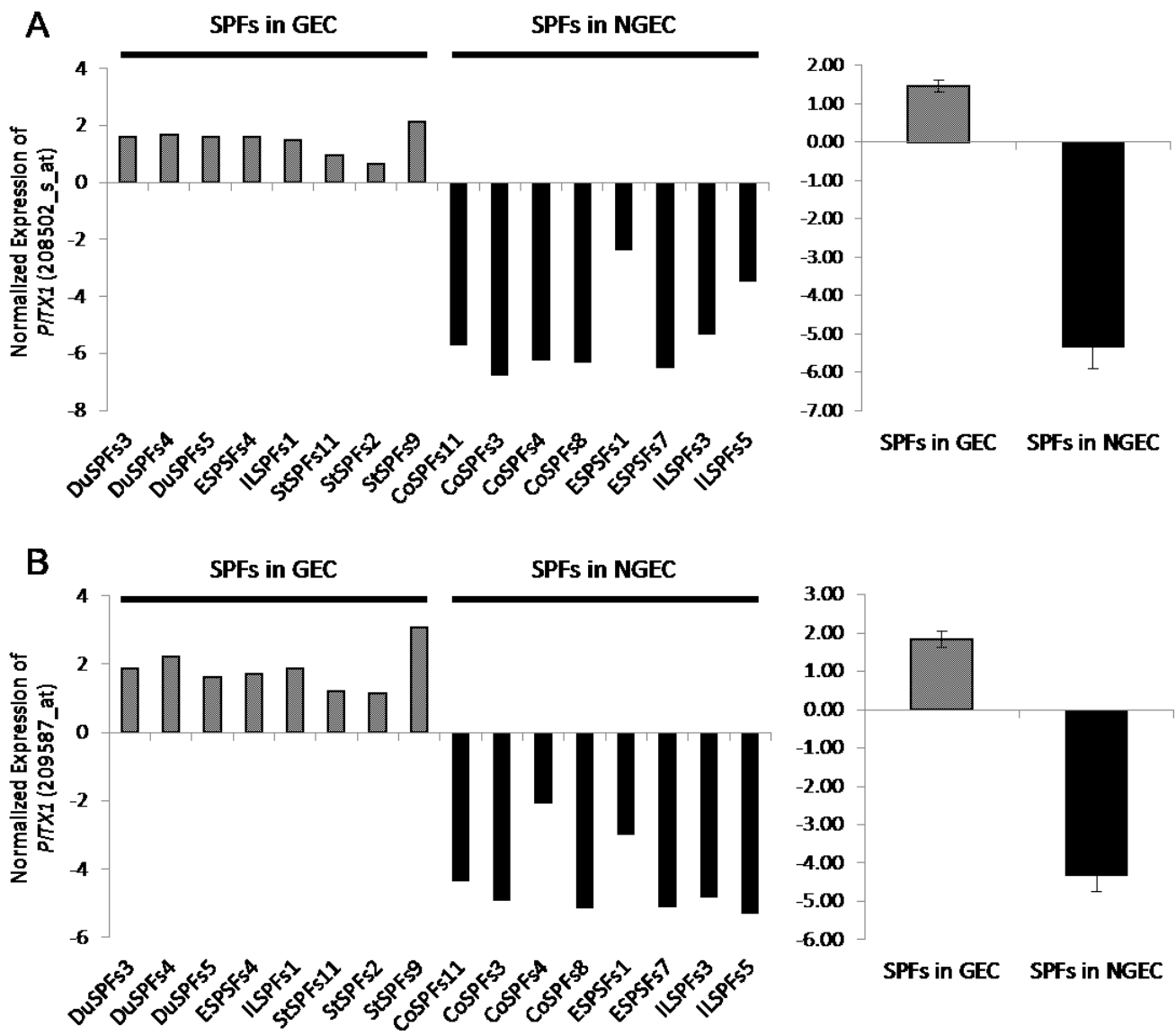
doi:10.1371/journal.pone.0088018.g005

(C, D)

Yokota M, Kojima M, Higuchi Y, et al., International Journal of Cancer, 2015, Fig 2 (Modified)

DOI: 10.1002/ijc.29851

Supp Fig 6. SPFs のがん細胞に対する反応性と大腸がん患者の予後との関連



Supp Fig 7. SPFs における *PITX1* 発現の多様性