

論文題目 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

氏名 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状の細胞である。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。生理的機能の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状の形態像を示し、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,

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

$P < 0.001$)。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。

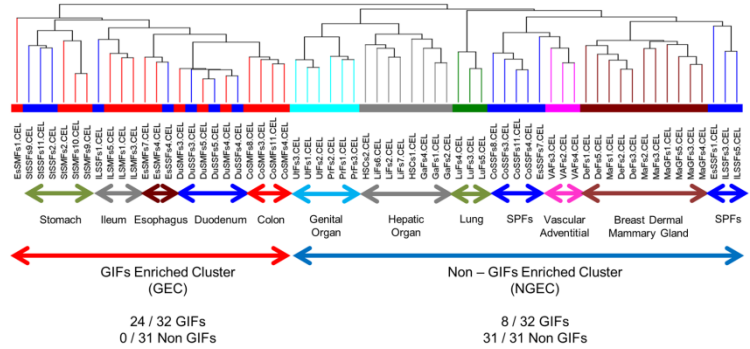


図 1. ヒト線維芽細胞における遺伝子発現プロファイルの類似性解析

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、Homeotic 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な遺伝子の中で、SMFs 特異的な遺伝子として *PITX1*、SPFs 特異的な遺伝子として *MSX1* について、マイクロアレイ解析結果の再現性を定量 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 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特徴的な遺伝子

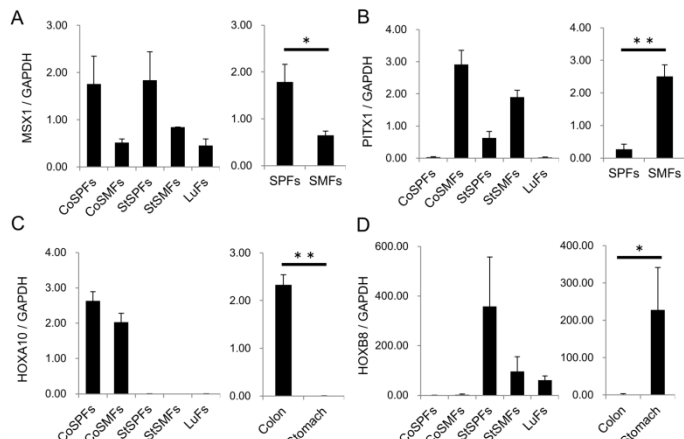


図 2. 定量 RT-PCR によるマイクロアレイ結果の再現性の検討
マイクロアレイ解析に用いたサンプルとは独立した 3 検体における遺伝子発現の平均値を示した。(※: $P < 0.05$, ※※: $P < 0.01$)

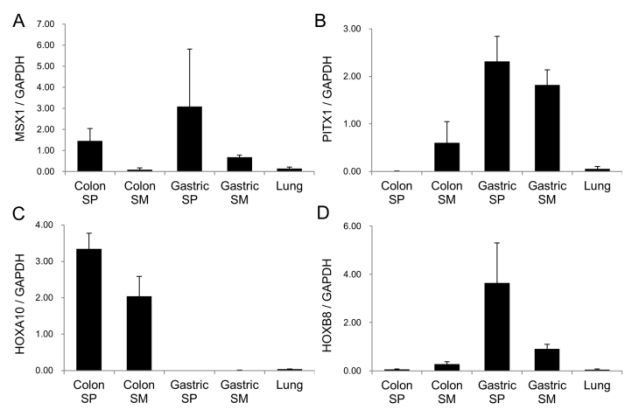


図 3. ヒト組織における部位特異的な遺伝子の発現解析 (N=3)

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 Homeotic 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 HOX 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。

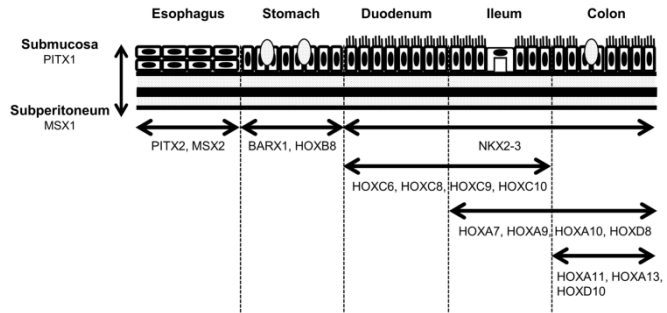


図 4. ヒト消化管を構成する線維芽細胞における HOX 遺伝子の多様性

図 4. ヒト消化管を構成する線維芽細胞における HOX 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 10 種類の GIFs (食道、胃、十二指腸、回腸、大腸の SMFs および SPFs) と共に播種し、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、38 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

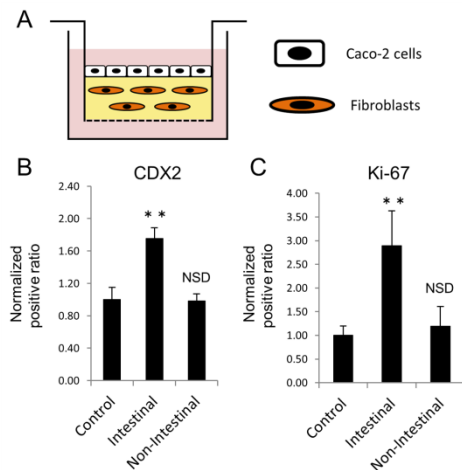


図 5. 各 GIFs と Caco-2 細胞との共培養実験

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: $P > 0.05$)

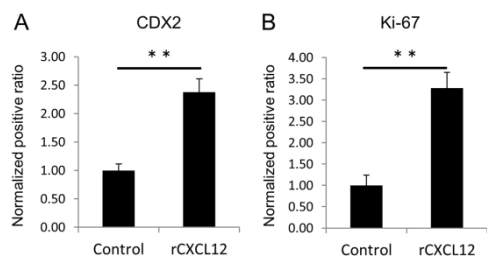


図 6. Caco-2 細胞に対する rCXCL12/SDF1 添加実験

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, **: $P < 0.01$)

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、HOX 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や維持に寄与していると考えられる。

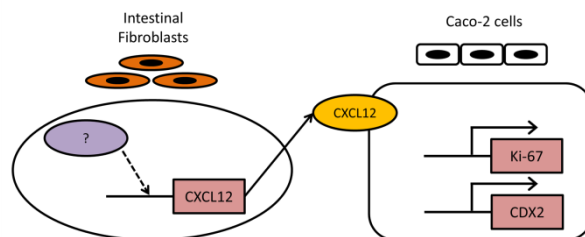


図 7. 腸管線維芽細胞による Caco-2 の分化、増殖促進機構

[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。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。従って、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に対しても応用可能であると期待される。