

博士論文

腫瘍中に存在する間葉系前駆細胞の
がん進展に及ぼす機能解明

須田 義上

博士論文

腫瘍中に存在する間葉系前駆細胞の
がん進展に及ぼす機能解明

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

須田 義上

指導教官 石井源一郎

目次

I. 要旨	P.4
II. 略語表	P.8
III. 肺腫瘍由来がん関連線維芽細胞（CAFs）を構成する細胞の分化能の検討	P.11
(i) 背景	
(ii) 目的	
(iii) 実験材料および方法	
(iv) 結果	
(1) 肺腫瘍由来 CAFs の骨／脂肪分化能の検討	
(2) CAFs の単細胞由来クローンの作製	
(3) CAFs のクローンの骨分化能解析	
(v) 考察	
(vi) 結論	
IV. 肺腫瘍中の間葉系前駆細胞が有する肺がんの進展に関与する機能の検討	P.31
(i) 背景	
(ii) 目的	

(iii) 実験材料および方法

(iv) 結果

(1) CAFs の液性因子による肺がん細胞の増殖能への影響

(2) CAFs の液性因子による肺がん細胞の幹細胞性への影響

(3) CAFs の液性因子による肺がん細胞の遊走能への影響

(4) CAFs の骨分化能と臨床病理学的項目との相関の検討

(v) 考察

(vi) 結論

V. 総合考察..... P.45

.

VI. 結論..... P.53

VII. 参考文献..... P.54

VIII. 謝辞..... P.65

IX. 図表の説明..... P.66

X. 図表..... P.76

I. 要旨

論文題目 腫瘍中に存在する間葉系前駆細胞のがん進展に及ぼす機能解明

氏名 須田義上

[序論]

線維芽細胞は、組織間質を構成している生体内に広範に存在する細胞である。線維芽細胞は、紡錘状の形態を共通の特徴とする一方で、その性質および機能が同一組織内においても不均一である事が知られている。線維芽細胞の一種である間葉系幹細胞(MSCs)は、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、などへの多分化能を示す。また、MSCsの分化が進行した間葉系前駆細胞(MPCs)は、一つの細胞系列にのみ分化可能である。MSCsは、骨髄間質をはじめとした様々な組織に含有されている為、組織を構成する線維芽細胞は、MSCs、MPCs、分化能を持たない線維芽細胞が混在している事になる。MSCs/MPCsは、特異的な表面抗原マーカーが同定されていない為、細胞集団が示した分化能がどちらに由来しているかは、判断できない。よって、それらの存在の同定には、単細胞単位で分化能を解析する必要がある。

腫瘍間質において、線維芽細胞は主要な成分であり、がん関連線維芽細胞(CAFs)と呼ばれている。CAFsは、腫瘍の形成や進展に対して影響を与える事が知られており(Cirri et al. 2012)、その機能は様々である。MSCs/MPCsが腫瘍進展に寄与する細胞である事が報告されているが(Spaeth et al. 2009; Bergfeld et al. 2014)、正常の骨髄間質や脂肪組織由来の細胞を用いており、腫瘍中の環境を反映できていない。実際に卵巣や前立腺がんのCAFsには、MSCs/MPCsが含まれている事が報告されているが(Karen et al. 2011; Ding et al. 2012)、これらの報告では、単細胞単位の解析はなされていない。よって、MSCs/MPCsの存在の確証は得られておらず、CAFsがどのような分化能を有する細胞によって構成されているかは不明である。また、CAFsの有する分化能によって、腫瘍形成と進展に対する機能に違いがあるかについても不明である。

本研究では、ヒトの肺がん由来のCAFsにおけるMSCs/MPCsの存在を検証する為、クローンを作製する事により、単細胞単位での分化能の解析を行った。更に、作製された分化能が異なるクローンを用いる事で、分化能が異なるCAFsの腫瘍進展に寄与する機能を、比較し同定する事を目的とした。

[本論]

1章：肺腫瘍由来のCAFsを構成する細胞の分化能の検討

1.肺がん検体由来のCAFsの分化能

9人の肺がん患者より、CAFsの初代培養細胞株を樹立した。各細胞株は、線維芽細胞の特徴である紡錘状の形態を示していた。CAFsの有する分化能を検討する為、骨細胞、脂肪細胞への分化誘導を実施した。骨細胞への分化は、ALP染色および、von Kossa染色、脂肪細胞への分化には、Oil red O染色を用いた(Fig.1)。ALP染色、von Kossa染色においては、MSCs/MPCsのポ

ジティブコントロールとして用いたヒト肺動脈外膜線維芽細胞(hVAFs)と同様に、CAFs は陽性の染色像を示した。一方で、Oil red O 染色においては、脂肪分化の特徴である脂肪滴が見られなかった。分化能を評価する為に、画像解析を用いて陽性面積比によって定量化を実施した結果、CAFs は、hVAFs との間に有意差がみられなかった(Fig.2A-B)。一方、脂肪分化能は有していない事が分かった(Fig.2C)。これらの結果より、肺がん由来の CAFs には、MSCs、および脂肪分化能を有する MPCs が含まれていない事が示唆された。

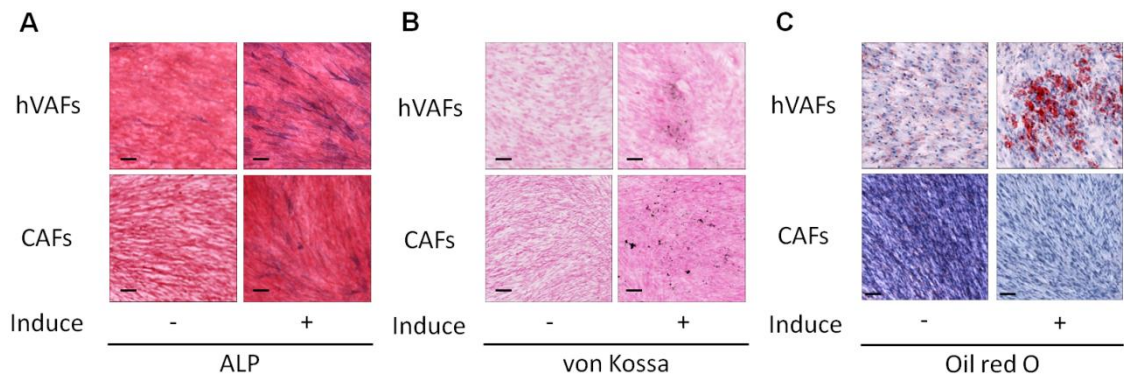


Fig.1 分化誘導を実施した線維芽細胞の染色像

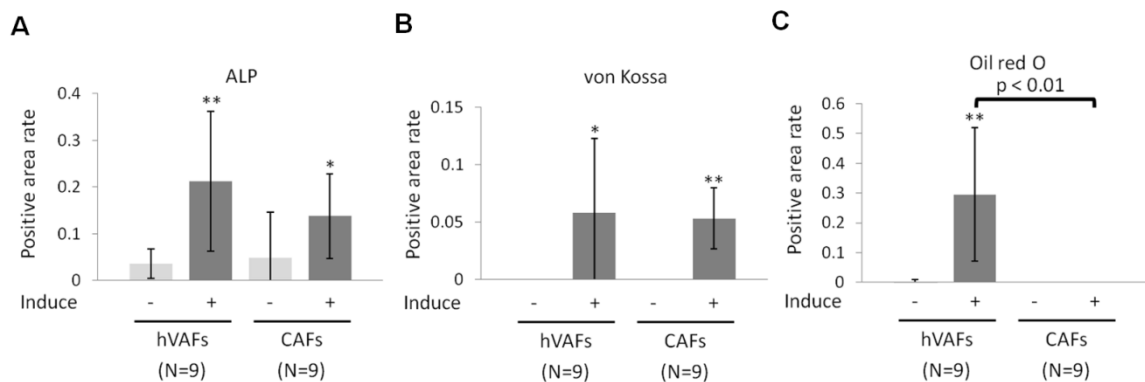


Fig.2 線維芽細胞の分化能の定量値 (非誘導群 vs. 誘導群 *:P<0.05、**: P<0.01)

2.CAFs の単細胞由来クローンの作製

脂肪への分化能を有する細胞が含まれていない事から、CAFs は、骨への分化能を有する細胞と分化能を有さない細胞による細胞集団である事が予想された。その存在を確かめる為、単細胞由来の CAFs のクローンの作製を実施した。

単細胞から培養を行うにあたり、線維芽細胞の細胞寿命は短く、クローンの作成過程で増殖が停止する恐れがあった。そこで、MSCs の細胞寿命延長が可能なヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) (Okamoto et al. 2002)を遺伝子導入することで、CAFs の細胞寿命の延長を図った。この時、遺伝子導入細胞は、コントロールとの有意差を示さず、hTERT が骨分化能に影響しない事を確認した(Fig. 3)。その後、限界希釈法を用いて、単細胞播種された CAFs を培養する事によ

り9種のクローンを作製した。代表的なクローンの形態像を Fig.4 に示す。

3.CAFs クローンの骨分化能解析

作製したクローンに対して骨分化誘導を実施し、von Kossa 染色により骨分化能を評価した (Fig.5)。定量化を実施すると、hVAFs と同等以上の値を示す骨分化能が高い4つのクローンと、全く骨分化を示さない2つのクローンが存在していた (Fig.6)。この結果により、肺腫瘍由来の CAFs には、骨分化能を有する MPCs と分化能を有さない線維芽細胞が存在している事が、実証された。

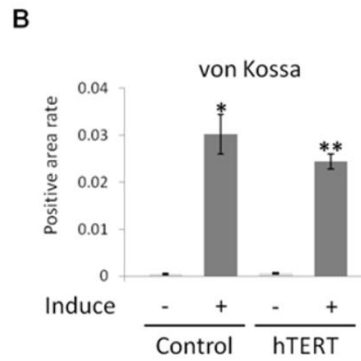
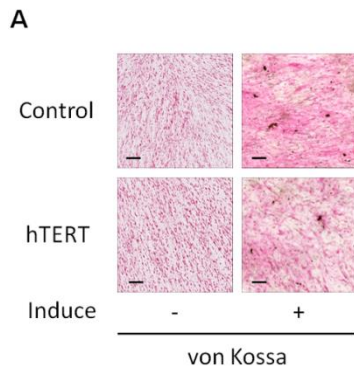


Fig.3 hTERT 遺伝子導入

CAFs の骨分化能評価

A : von Kossa 染色像

B: 骨分化能の定量値

(非誘導群 vs. 誘導群

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

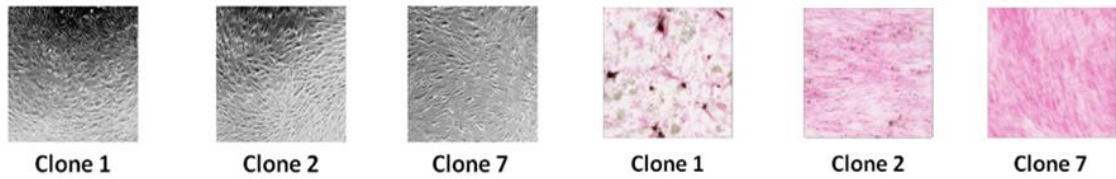


Fig.4 単細胞由来CAFsクローンの形態像

Fig.5 単細胞由来CAFsクローンの von Kossa染色像

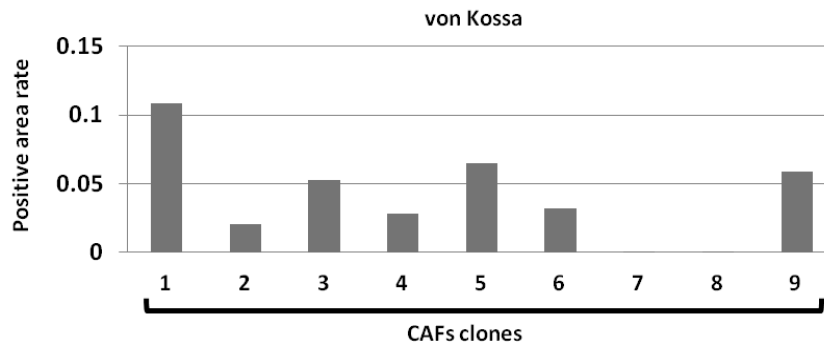


Fig.6 単細胞由来

CAFs クローンの

骨分化能の定量値

2章：肺腫瘍中の間葉系前駆細胞が有する肺がんの進展に関与する機能の検討

作製された CAFs のクローンの内、骨分化能の定量値が高いクローン (1, 3, 9) と低いクローン (2, 8, 9) を3種ずつ選出した。CAFs は、液性因子の分泌によって、がん細胞の表現型に影響を与える事が知られている。そこで、これらのクローンから採取された培養上清を用いる事で、A549 に与える影響を分化能が異なる群の間で比較検討した。

1.CAFs のクローンによる肺がん細胞の増殖能への影響

最初に、がん細胞の増殖能への影響を検討する為、クローンの培養上清を添加した A549 の生細胞数を、WST 法によって測定した。コントロールと培養上清を用いた群の間には、細胞数に有意な変化はなかった(Fig.7A)。その為、CAFs は、骨分化能の高さに関わらず、がん細胞の増殖能に影響を与えない事が分かった。

2.CAFs のクローンによる肺がん細胞の幹細胞性への影響

腫瘍を形成する細胞の供給源として、高い自己複製能を有するがん幹細胞の存在が知られている (Chen et al. 2014)。がん細胞の幹細胞性に与える影響を検討するためにスフェアの形成を培養上清中で行い、その形成数を計測した。クローンの培養上清は、コントロールと比べて A549 のスフェアの形成数を増加させたが、分化能が異なるクローン群間には有意差は見られなかった(Fig.7B)。この事から、がん細胞の幹細胞性の促進効果に、CAFs の骨分化能は関係していない事が示唆された。

3.CAFs のクローンによる肺がん細胞の遊走能への影響

がん細胞の遊走能への影響を評価する為、スクラッチによる創傷治癒法を検討した (Fig.7C)。クローンの培養上清処理により A549 は、創傷の面積を減少させていた。更には、骨分化能が高いクローン群の方が、低いクローン群よりも創傷面積は有意に低下していた。その為、骨分化能が高い CAFs は、がん細胞の遊走能をより促進する事が示された。

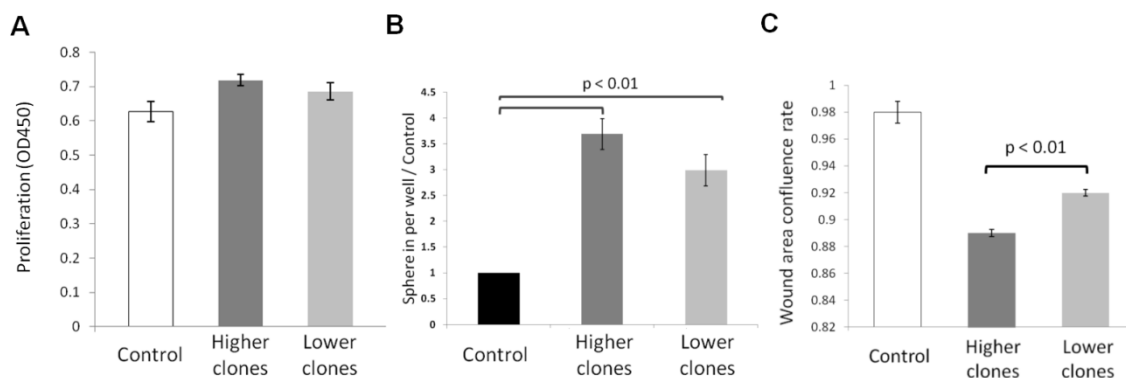


Fig.7 単細胞由来 CAFs クローンの培養上清によるがん細胞の表現型への影響の検討

A: WST 活性による増殖能評価 B: スフェア形成による幹細胞性評価

C:創傷面積減少による遊走能評価

(Higher clones: クローン 1、3、9 の平均値、Lower clones: クローン 2、7、8 の平均値)

[結論]

本研究では、クローンを用いた分化能解析によって、肺腫瘍由来の CAF は、骨分化能を有する MPCs と分化能を有さない線維芽細胞によって構成されている事を初めて示した。そして、肺腫瘍中 MPCs は、がん細胞の遊走能の亢進を介して、腫瘍進展に寄与している可能性が示唆された。クローンによる単細胞単位の解析は、腫瘍内の微小環境の実像を解明する上で有用な手法であり、更なる解析の進展が、新規治療標的発見につながる事が期待される。

II. 略語表

ALP	Alkaline phosphatase
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
Bmi-1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
CAFs	Cancer Associated Fibroblasts
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
cDNA	complementary DNA
CD13	Cluster of Differentiation 13
CD14	Cluster of Differentiation 14
CD29	Cluster of Differentiation 29
CD34	Cluster of Differentiation 34
CD45	Cluster of Differentiation 45
CD90	Cluster of Differentiation 90
CD105	Cluster of Differentiation 105
CD146	Cluster of Differentiation 146
CD166	Cluster of Differentiation 166
CSCs	Cancer Stem Cells
DDW	Deionized Distilled Water
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal Growth Factor

EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF9	Fibroblast Growth Factor 9
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
IL-6	Interleukin-6
KLF4	Kruppel-like factor 4
LCNEC	Large Cell Neuroendocrine Carcinoma
MEM	Minimum Essential Medium
MET	Mesenchymal-epithelial transition
MPCs	Mesenchymal Progenitor Cells
mRNA	messenger RNA
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
MSX2	Msh homeobox 2
Myo D	Myogenic differentiation 1
OCT3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
Osx	Osterix
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor BB

PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RUNX2	Runt related transcription factor 2
hVAFs	human Vascular Adventitial Fibroblasts
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SOX2	SRY-related HMG box2
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultra Violet
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless Type Protein

III. 肺腫瘍由来がん関連線維芽細胞（CAFs）を構成する細胞の分化能の検討

(i) 背景

線維芽細胞は、紡錘状の形態を有する間質細胞であり、上皮細胞とともに、臓器形態、機能維持に関与している。同じ組織内に存在する線維芽細胞でも、増殖能や遊走能といった性質は不均一であるとされている[1]。間葉系幹細胞(MSCs)は、線維芽細胞の一種であり、自己複製能と多分化能を持った成体にも存在する体性幹細胞として知られる。骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、心筋細胞といった中胚葉系の細胞系列へ分化能する事により、組織の自己修復を担っているとされる一方で[2]、人為的な分化転換を行えば神経細胞や肝細胞と言った他の胚葉系への可塑的な分化能も示す。MSCs は、骨髄間質に豊富に存在することが知られている他、脂肪組織、真皮、臍帯等の様々な組織の線維芽細胞集団に含有されており[3-6]、免疫抑制能を有する[7]ことから、採取が容易かつ拒絶反応の危険性が低い再生医療用の素材としても期待されている。また、骨髄間質では、相互作用によって造血幹細胞の増殖/維持機構に深く関与している[8]。多分化能を有する MSCs は、分化が進行する事により、細胞運命の決定が発生し、分化可能な細胞系列が限定されるようになる。特に骨と脂肪への分化誘導時に発現する遺伝子は、互いの分化を抑制する排他的な関係であり[9-12]、細胞の生育している環境によって非可逆的な分化が行われる。その結果、骨ならば骨芽細胞前駆体、脂肪ならば脂肪細胞

前駆体として、1つの細胞系列にのみ分化可能な間葉系前駆細胞 (MPCs) となる。その為、組織内の線維芽細胞集団には、MSCs、MPCs、その他の分化能を持たない線維芽細胞が混在し、分化能における不均一性が生じている [13]。一方で、MSCs/MPCs と他の線維芽細胞の形態は同様であり [14]、また、両細胞種を明確に判別できる表面抗原マーカーは特定されていない。現状では、MSCs/MPCs を取り扱う場合、Stro-1、CD13、CD29、CD90、CD105、CD146、CD166 等が同時に陽性であり、CD14、CD45、CD34 等の血液細胞のマーカーが陰性であることを指標とすることで、組織から細胞集団の濃縮が行われている [15]。由来とする組織によっては、同じ分化能示す細胞でも発現する表面マーカーに差異があることや [16, 17]、分化可能な細胞系列が異なることが知られる [18-21]。よって、マーカーを用いた方法は正確に MSCs/MPCs を分離できているとは言えず、分化能を検定する事によってのみ、MSCs/MPCs を判別可能である。しかし、組織中の不均一な細胞集団が多分化能を示したとしても、その分化能が MSCs と MPCs のどちらに由来しているかを判別出来ない。例えば、MSCs のみで構成された集団と、脂肪前駆細胞と骨芽前駆細胞によって構成される集団のどちらも、見掛け上は同じ脂肪細胞と骨芽細胞への多分化能を示す。MSCs、MPCs の存在を検証する為には、クローンをを用いた単細胞レベルでの解析によって、個々の細胞の分化能をみる必要がある。

がんの腫瘍間質には、線維芽細胞、マクロファージ等の免疫細胞、血管を構

成する細胞といった、がん細胞以外の細胞も存在している。これらはがん関連細胞として、がん細胞を取り巻く微小環境を構築し、その生存、増殖、遊走に影響を与える事が知られている[22-25]。これらの細胞の中でも、がん関連線維芽細胞（CAFs）は、腫瘍間質を占める主要な成分であり、腫瘍の形成や進展に寄与するとされる[26]。CAFsの起源としては、既存の組織由来線維芽細胞だけでなく[27]、血流に運ばれて骨髄細胞由来の線維芽細胞も動員されていると考えられており[28]、性質も不均一な細胞集団である[29]。骨髄間質由来のMSCsが、がん細胞が分泌するSDF-1 α やTGF- β 等の液性因子によって、腫瘍間質に動員される事がマウスモデルにおいて報告されており[30, 31]、MSCs/MPCsはヒトのCAFsの中にも含有されている事が予想される。また、MSCsによってもたらされる、がん細胞への増殖能や生存性における促進効果は、他の線維芽細胞と比較して高い事も報告されている[32, 33]。その為、MSCs/MPCsは、腫瘍進展に対して特に影響を与え得る線維芽細胞であると考えられる。ただし、これらの報告で用いられているのは、正常な骨髄間質や脂肪組織に由来する細胞であり、臓器がんの腫瘍中における生理的な環境を反映しているとは言えない。実際にヒトの腫瘍由来のCAFsが、骨や脂肪への多分化能を示す報告は、卵巣、前立腺、大腸、乳腺においてなされている[34-38]。しかし、これらの研究においては、単細胞レベルの解析は行われておらず、MSCs/MPCsがCAFs中に存在しているかは、未だに正確に検証されていない。

(ii) 目的

本研究の目的は、肺腫瘍由来の CAFs を構成している線維芽細胞の分化能の検討である。実験は以下のステップで進めた。

1. ヒト肺腫瘍から採取された CAFs の初代培養を行い、骨、脂肪分化を誘導によってその分化能を検定した。
2. 分化能解析により、CAFs は骨へのみ分化能を示す事が判明した。
そこで、単細胞由来のクローンを作製し、単細胞レベルの分化能解析によって、骨芽前駆細胞の存在を同定した。

(iii) 実験材料及び方法

(1) 線維芽細胞の単離と初代培養

ヒト肺がん関連線維芽細胞 (hCAFs)、ヒト非がん部肺組織由来線維芽細胞 (hNCAFs) およびヒト肺動脈外膜線維芽細胞 (hVAFs) は、外科的に切除された肺組織より分離培養した。具体的には、hCAFs は、肺腺がん腫瘍部を切り出し、hNCAFs は、肺組織を切り取り、hVAFs は、肺組織とともに摘出された肺動脈の外膜を慎重に剥ぎ取り、それぞれ滅菌したはさみで 2mm 以下に細かく切断したものを 6cm dish (日本 BD) に播種した。hCAFs、hNCAFs、および hVAFs は、調整した間葉系幹細胞増殖培地 (TOYOBO) を 2ml 添加し培養した。それぞれの組織片が線維芽細胞に取り囲まれるまで、1日に1回同量の間葉系幹細胞増殖培地を交換した。組織周辺部の細胞密度がコンフルエントに達した場合、組織を取り除き、細胞を 0.05% Trypsin/ EDTA (SIGMA) で剥がして回収した。この細胞を 6cm dish に播いたものを Passage 0 とした。各細胞株を保存する場合は、6 cm dish もしくは 10 cm dish 1 枚分の細胞を、1 ml のセルバンカー3 (十慈フィールド) に懸濁し、-80°C 中で凍結した。実験に使用する初代培養株は、Passage 3~7 とした。

(2) 線維芽細胞の骨芽分化誘導および脂肪分化誘導

hCAFs、hNCAFs、および hVAFs の骨芽分化誘導は、8well の細胞培養プレート（日本 BD）1well につき 2.2×10^3 個を播種し、骨芽分化誘導キット（LONZA）のプロトコールに沿って行った。具体的には、播種した翌日から骨芽分化誘導用培地（L-グルタミン、デキサメタゾン、ペニシリン、ストレプトマイシ、アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸を含む）0.3ml で培養し、3 日間に一度同量の骨芽分化誘導用培地を交換し、誘導を 2 週間行った。また、コントロールとして非誘導群は間葉系幹細胞培地で培養を行った。分化の判定には、アルカリフォスファターゼ（ALP）染色と von Kossa 染色の両方を行った。ALP 染色は ALP 染色キット（武藤科学）をキットのプロトコールに沿って行った。また、von Kossa 染色は、10%ホルマリンリン酸緩衝液によって固定し、5%の硝酸銀水溶液に細胞培養プレートを浸し、UV ランプ下に 2 時間置き、純水で洗浄後、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液に 3 分浸した後、ケルンエヒトロートを用いて細胞を染色した。

hCAFs、hNCAFs、および hVAFs の脂肪分化誘導は、8well の細胞培養プレート（日本 BD）に 1well につき 1.5×10^4 個を播種し、脂肪分化誘導キット（LONZA）のプロトコールに沿って行った。具体的には、播種した 3 日後から、脂肪分化誘導用培地（インスリン、L-グルタミン、デキサメタゾン、アンホテリシン B、インドメタシン、3-イソブ

チル-1-メチルキサンチンを含む) 0.3ml で培養した 3 日後に同量の脂肪細胞維持培地 (L-グルタミン、アンホテリシン B を含む) に交換する操作を 3 度繰り返し、脂肪細胞維持培地で 1 週間培養することで誘導を行った。また、コントロール群は間葉系幹細胞培地で培養を行った。分化の判定のため、オイルレッド O 染色を行った。具体的には、10%ホルマリンリン酸緩衝液によって固定し、オイルレッド O を溶解した 60%イソプロパノール水溶液に 37°C、15 分間浸し、マイヤーヘマトキシリン染色を実施した。

(3) 線維芽細胞の分化度の定量化

染色を実施した 8well 細胞培養プレートを、スライドスキャナー Nano Zoomer(浜松ホトニクス)を用いて画像データとして取り込み、 0.64cm^2 の四角形の範囲を各誘導群および非誘導群で無作為に 4 か所以上選び出した。この範囲にある細胞の面積と染色陽性の面積を画像解析ソフトウェア Win ROOF(三谷商事)を用いて計測し、細胞全体に対する染色陽性面積比を算出した。

(4) レンチウイルスベクターによる Human TERT 遺伝子導入

293T 細胞を 1.0×10^6 個ずつ 6cm dish (日本 BD) に播種した。翌日、レンチウイルスベクター CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus (理化学研究

所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) に LR 組換え反応を用いてヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子(hTERT)(cDNA は独立行政法人国立がん研究センター研究所、増富健吉博士より供与)をクローニングサイトへ組み込んだ CSII-CMV-IRES2-Venus-hTERT を 5 μ g 、 3 μ g の pCMV-HIV (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) 及び pCMV- VSV-G-RSV-Rev (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) と共に 500 μ l の Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) に加えて、5 分間室温でインキュベートした (A 液)。さらに、20 μ l の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 500 μ l の Opti-MEM I Reduced Serum Medium に加えて 5 分間室温でインキュベートした (B 液)。A 液と B 液を混合した後、室温で 20 分間インキュベートした。この混合液を 293T 細胞に添加して、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した後、培地を交換してさらに 24 時間培養した。培養上清を 0.45 μ m filter (Millipore) に通してから、前日 10cm dish に 1 \times 10⁶ 個播種した線維芽細胞に添加した。3 時間後に間葉系幹細胞増殖培地を加えて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で 48 時間培養した。遺伝子導入は、レンチウイルスベクターに組み込まれた蛍光タンパク質 Venus の緑色蛍光を、蛍光顕微鏡を用いて観察することで確認した。

(5) 線維芽細胞のクローン作製

hTERT を遺伝子導入した線維芽細胞を限界濃度（10 個/ml）で 96 well スフェロイドプレート（住友ベークライト）へ播種し、4 時間後に光学顕微鏡によって単一の細胞であることを確認した。その後 384 well プレート（日本 BD）へ細胞を播種した。

コンフルエントになった細胞を 0.25% Trypsin/ EDTA (SIGMA)によって剥がして 96 well plate(日本 DB)へ播種し、以後コンフルエントとなる度に、24 well plate(日本 DB)、12 well plate(日本 DB)、6 well plate(日本 DB)、6 cm dish(日本 DB)へと順に継代していき、増殖能の継続が確認されたものに対し分化誘導実験を実施した。

(6) 定量的 RT-PCR

6 cm または、10 cm Dish に播種した細胞に対し、1ml の TRIzol reagent (Invitrogen) を処理して、200 μ l のクロロホルム溶液（Wako）を加え、Vortex を用いて激しく懸濁した。遠心後、水層に溶解している RNA を新しいチューブに移し、500 μ l の 2-プロパノール（Wako）を加えて Vortex を用いて激しく懸濁後に再び遠心した。デカント後、500 μ l の 70%に DDW(Invitrogen)で調整したエタノール(Wako) を加えて遠心した。デカント後に沈殿を乾燥させ、DDW に溶解することで total RNA を抽出した。

RNA 溶液より、 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser (Takara) および PCR Thermal Cycler (Takara) を用いて ((37°C 15分, 85°C 5秒) ×1 cycles) の条件で cDNA を合成した。

その後、 PrimeScript RT reagent Kit の SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) を用いたプロトコールに沿って、 Smart Cycler (Takara) を用いて ((95°C 10秒)×1cycles 、 (95°C 15秒, 60°C 30秒)×45 cycles) の条件で定量的 PCR 反応を行った。標的遺伝子(Table 1)の mRNA の発現は、 GAPDH (Forward primer : 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' 、 Reverse primer : 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3' (Takara)) で標準化した。

(7) 統計解析

2 サンプル間の比較については、 t 検定を用いて統計解析を行い、両側検定で P value が 0.05%未満であった場合を有意差があると見なした。

(iv) 結果

(1) 肺腫瘍由来 CAFs の骨／脂肪分化能の検討

線維芽細胞の分化能を検定する為、9 検体のヒト肺腫瘍組織より CAFs を単離、培養した。また、骨・脂肪の分化能を有するポジティブコントロールとして、別の 9 検体の肺動脈血管外膜組織より、hVAFs の初代培養株を樹立した。得られた各細胞は、プラスチック製 dish 上に接着し、紡錘形の形態を示し、線維芽細胞であると確認された (Figure 1)。

採取された線維芽細胞に対し、骨、脂肪への分化誘導を、各培養条件下で実施した。その後、骨分化は、分化マーカーとして知られる ALP の活性を青色に染める ALP 染色と、骨細胞により沈着されるカルシウムに黒色に反応する von Kossa 染色を用いて可視化した (Figure 2)。また、脂肪分化には、脂肪細胞が形成する中性脂肪滴を赤色に染色する Oil red O 染色を用いた (Figure 3)。hVAFs は、9 検体全てにおいて、各染色法における陽性の染色像を示し、骨・脂肪分化が見られた。一方で、CAFs は、ALP 染色と von Kossa 染色において陽性を示したが、Oil red O 染色においては、陽性所見を示さなかった。

次に、分化能を評価する為に、画像解析を用いて定量化を実施した。定量値は、染色像の細胞全体の面積に対する、陽性の色面積の割合に

よって算出した。ALP 染色の定量値は、hVAFs が $21.2 \pm 1.7\%$ に対し、CAFs は $13.8 \pm 1.0\%$ であり、hVAFs に比べて低かったが、有意差は見られなかった。von Kossa 染色では、hVAFs と CAFs は、同等の値を示した ($5.7 \pm 0.7\%$ vs. $5.3 \pm 0.3\%$) (Figure 4)。一方、Oil red O においては、CAFs の定量値は、0 であった (Figure 5)。よって、CAFs は、骨へ分化可能な MPCs を含んでいることが判明した。一方 CAFs は、脂肪への分化能を示さない事から、MSCs や脂肪細胞の MPCs を含んでいない事が示唆された。

(2) CAFs の単細胞由来クローンの作製

CAFs を構成する線維芽細胞における骨芽前駆細胞の存在を同定する為に、単細胞由来のクローンを作製する事により、個々の細胞の分化能を検定する事とした。この際に、細胞寿命が短い線維芽細胞におけるクローン作製が困難である事が予想された為、細胞寿命延長効果が期待できるヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の遺伝子導入を実施した。導入はレンチウイルスベクターを用い、ベクター内に組み込まれた蛍光タンパク質 Venus による緑色蛍光が、操作を実施した細胞で確認された (Figure 6A)。また、hTERT の mRNA 発現を RT-PCR により確認した (Figure 6B)。

次に、hTERT 遺伝子によって骨分化能が変化しないかどうかを検討

する為、hTERT 遺伝子導入を行った CAFs に骨分化誘導を実施し、ALP 染色および von Kossa 染色によって骨分化能を検定した (Figure 7A)。hTERT を導入した CAFs の染色像は、コントロールベクターを導入した CAFs と同様に陽性の染色像を示した。分化能の定量値は、ALP 染色については、hTERT を導入した CAFs の方が有意に低かったが ($9.3 \pm 0.9\%$ vs. $1.7 \pm 0.2\%$, $p < 0.05$)、von Kossa 染色においては、有意な変化は見られなかった ($3.0 \pm 0.4\%$ vs. $2.4 \pm 0.2\%$) (Figure 7B)。von Kossa 染色は、骨分化の指標の中でも分化の最終段階において行われる骨基質の沈着を表すものであり、骨分化能を示す証拠としては十分であると考えられた。よって、hTERT の遺伝子導入後も、CAFs の中には骨分化能を有する細胞が残存している事が示された為、この細胞はクローン作製に使用可能であると判断した。

クローンの作製は、限界濃度に希釈した hTERT 遺伝子導入 CAFs を、低吸着プレートに播種し、光学顕微鏡による目視で単一であることを確認した細胞を、384 well plate から始め、10 cm dish にコンフルエントになるまで継代培養を実施した (Figure 8)。16 度の施行により、2387 個の CAFs を播種した結果、9 種のクローンが作製された (Figure 9)。各クローンの形態および増殖速度には若干の違いが見られたが、紡錘状の形態を示し、線維芽細胞の形質を維持していた。

(3) CAFs のクローンの骨分化能解析

作製された CAFs のクローンに対し、骨分化誘導を実施し、von Kossa 染色によって骨分化能を検定した (Figure 10)。各クローンの染色像は、陽性を示すものと示さないものが存在した他、誘導条件下の増殖頻度も異なっていた。更に骨分化能の定量化を実施した所 (Figure 11)、ポジティブコントロールである hVAFs と同等の、5%以上の値を示したクローンは、4種存在し (クローン 1、3、5、9)、ほぼ 0%のクローンも 2種認めた (クローン 7、8)。よって、骨分化能を有する MPCs と分化能を有さない線維芽細胞が、共に CAFs に存在している事が証明された。

(v) 考察

本研究では、単細胞由来クローンの作製によって、ヒト肺腫瘍由来の CAFs が、いかなる分化能を有する線維芽細胞によって構成されているかを検証した。まず我々は、CAFs の有する分化能を組織レベルで解析し、脂肪分化能を有する細胞が含まれていない事を見出した。続いて、クローンの作製を行い、単細胞レベルで分化能を解析する事で、骨の MPCs が、CAFs 内に存在する事を証明した。この研究は、肺腫瘍の CAFs が、様々な骨分化能を有する細胞によって構成されている事を示した最初の報告である。

線維芽細胞は、組織間質を充填する細胞として、組織の恒常性を維持する役目を果たしている。創傷により組織が損壊した場合には、速やかに創傷部へ動員され、細胞外基質の分泌や、喪失した細胞への分化によって、間質成分の補填を行う[39, 40]。MSCs や MPCs と云った分化能を有する線維芽細胞は、組織修復において必要な細胞集団であり、生体中の様々な部位に存在する[41]。本研究室では、hVAFs をモデルとした実験を行い[42]、分化誘導を行うことで、hVAFs が骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を示すことを報告してきた[43]。また、末梢血中に存在する CD105 陽性血球細胞が、多分化能を有する線維芽細胞へ転換する事を明らかにしてきている[44]。腫瘍組織では、慢性的な組織の改築が引き起こされている為、MSCs/MPCs が動員されている可能性が高いと考えられた。Gottschling らは、肺においても、肺癌組織より採取した線維芽細胞は、骨および

脂肪分化を示すことを報告している[45]。しかし、本研究において、実際の肺腫瘍の CAFs には MSCs は存在しない事が示唆された。同一検体より採取された非がん部組織の線維芽細胞(NCAFs)は、CAFs と同様に骨分化能のみを示していた (Supplemental figure 2、3)。正常組織との分化能の差異が見られない事から、1つの可能性としては、実際の CAFs には MSCs が動員されていなかった事が考えられる。一方で、がん細胞は、腫瘍組織内の細胞に対し、液性因子を分泌する事により、それらの形質を変化させる事が知られている [46]。実際に、肺がん細胞が分泌する液性因子が、MSCs/MPCs の分化能に影響を与えるかどうかを検証する為、hVAFs に対して肺腺がん細胞株 A549 の培養上清を 3 日間処理し、その後、骨と脂肪への分化誘導を実施した。ALP 染色、von Kossa 染色においては、A549 の培養上清処理は、コントロールとの染色像の違いは見受けられず (Supplemental figure 4A-B)、定量値も有意な変化を示さなかった (ALP: $31.3 \pm 4.7\%$ vs. $32.1 \pm 10.4\%$ 、von Kossa: $2.8 \pm 2.7\%$ vs. $1.5 \pm 0.1\%$) (Supplemental figure 5A-B)。一方で、Oil red O 染色では、培養上清処理群の脂肪滴の形成が減退している事が観察され (Supplemental figure 4C)、定量値も有意に低下していた ($31.9 \pm 5.3\%$ vs. $17.7 \pm 3.3\%$ 、 $p < 0.01$) (Supplemental figure 5C)。肺腺がん細胞株 A549 の培養上清処理によって、hVAFs の脂肪分化能は低下しており、がん細胞の分泌する液性因子によって、組織中の MSCs を含む脂肪分化能を有する細胞が減少する事も示唆された。TNF- α 、IL-6 といった炎症性サイト

カインは、MSCs の骨分化を促進させる事が報告されており、腫瘍内の線維芽細胞の分化の方向性が骨分化に傾いている可能性がある。更に、煙草に含まれる化学物質は、脂肪分化を阻害する事が知られている[47]。本研究で用いた CAFs を採取した検体間の喫煙歴の有無を比較した場合、喫煙者の方が、有意に骨分化能が高かった (Figure 18B)。また、ROS による酸化ストレスは、骨分化抑制かつ脂肪分化促進に作用し[48]、検体の高齢化は分化能そのものを低下させることが知られている[49]。よって、生体中の線維芽細胞は、形成されている微小環境によって異なる分化能を有すると考えられる。真皮の線維芽細胞の単細胞由来クローンを作製した研究では、細胞外基質を構築する増殖型と分解するリモデリング型にクローンを分類可能であり、検体が高齢であるほど増殖型の存在頻度が減少していた[50]。この報告は、線維芽細胞が有する性質の不均一性が、検体の臨床病理学的な背景によって変化する事を示している。CAFs だけでなく hVAFs においても、分化能には検体間差が存在しており (Supplemental figure 6)、分化能を有する線維芽細胞の存在頻度も、検体の臨床像に左右されている可能性がある。

組織中の細胞が有する性質の不均一性を解析する場合、単細胞レベルの解析は有効な手段である。しかし、線維芽細胞の細胞寿命は短いことが知られており、単細胞より培養を実施した場合、作製段階において細胞老化による増殖停止が発生し、クローン樹立が困難となる可能性がある。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) は、細胞の分裂回数を規定するテロメ

アを伸長させる活性を持った酵素であり、遺伝子導入を実施することで細胞の寿命延長を行うことが可能である。骨髄間質由来の MSCs の場合、30 回程度であった分裂回数が 2 倍以上に延長されたことも報告されている [51]。ただし、hTERT のみの遺伝子導入によって線維芽細胞の不死化が可能かどうかは組織によっても異なり [52]、Bmi-1 や E7、E6 および C-MYC 等の遺伝子を併用する必要がある報告が挙げられている [53]。しかし、Bmi-1 は、造血幹細胞や神経幹細胞の自己複製能の維持や分化の制御を行うことが知られており、線維芽細胞の分化能にも干渉する可能性が考えられた。また、E6 はがん抑制遺伝子産物である p53 を、E7 は Rb タンパク質を阻害し、C-MYC 共々がん関連因子として知られる。これらによって遺伝子に変異する確率は低いという報告もあるが [54]、線維芽細胞の性質を変えてしまう危険性を考慮すると、MSCs において分化能が損なわれない報告がなされている [19, 55] hTERT 単体の導入が、細胞の性質を維持した状態で単細胞クローンを作製する上で適切であると考えられた。実際に、骨分化能については、hTERT による変化は見られなかった。しかしながら、クローンの樹立成功率は、0.4%程度と低く、作製可能であった検体も 1 つのみであった。また、組織レベルでの分化能の値である 5% に比べて、骨分化能を示したクローンは、9 種中 7 種と割合が高かった。幹細胞マーカーとして知られる SOX2 の発現は、MSCs の分化能の維持に作用し [56]、増殖能を促進する報告がなされている [57]。逆に細胞老化を制御する p53 は、分化能

を低下させる[58]。その為、分化能を有している細胞の方がより細胞寿命と増殖性に優れ、クローンとして樹立しやすい可能性も考えられた。単細胞レベルの解析を、組織全体の表現型や細胞種の普遍的な性質と結び付ける為には、偏りの少ない多くのサンプルが必要である。CDK4は、細胞の増殖のサイクルを、チェックポイント制御する Rb タンパク質のリン酸化を行う事で動かし、細胞老化マーカーとして知られる遺伝子である[59]。現在我々は、阻害分子である p16 との結合能を持たない事で、細胞増殖が停止されにくくする機能を持つ、CDK4 の R24C 変異体を[60]、hTERT と同時に導入する事による細胞寿命延長の検討を行っている。この様な線維芽細胞のより長期の寿命延長法の開発が成功すれば、詳細な解析が可能となる事が期待される。

(vi) 結論

肺腫瘍由来の CAFs は、肺由来 MSCs/MPCs と同等の骨分化能を有するが、MSCs および脂肪の MPCs を含まない細胞集団である事が示された。CAFs を構成している細胞は、分化能を有さない線維芽細胞と骨の MPCs であり、その分化能も不均一であった。また、肺がん細胞の液性因子は、この様な細胞集団を形成する原因である可能性がある。本研究は、腫瘍組織に構築された線維芽細胞の分化能の不均一性を解析した最初の報告である。

IV. 肺腫瘍中の間葉系前駆細胞が有する肺がんの進展に関与する機能の検討

(i) 背景

細胞は組織中に他の細胞種間と相互作用する微小環境を構築する。がんの腫瘍組織中に形成されるがん微小環境もまた、がん細胞と非がん細胞との相互作用によって成り立っており、腫瘍の形成・進展の過程に寄与する[61-63]。CAFsは、間質の主要な構成成分として存在し、細胞外基質の分泌によって腫瘍構造を支持しているだけでなく、分泌する種々の液性因子による相互作用が、がん細胞の悪性像を変化させる[64-67]。CAFsは、がん細胞が分泌する TGF- β 等の作用によって、エピジェネティックな変異を含む、正常とは異なる表現型を示す事が知られており[68, 69]、その機能にも違いがあると考えられる。例えば、CAFs中では、 α -SMA の発現が上昇した筋線維芽細胞様に分化した細胞の頻度が増加し、これらの細胞は正常組織の線維芽細胞よりも遊走能が高いことが知られている[70]。

がん細胞の悪性像の一部は、腫瘍を形成し増大し続ける増殖能、周囲の組織や脈管へ浸潤し腫瘍の転移を引き起こす為の遊走能によって規定され得る。また、がん細胞の中でも未分化な幹細胞性が高い細胞集団は、がん幹細胞 (CSCs) と呼ばれる[71, 72]。CSCs は、自己複製能と高い生存性を有する為、転移先で新たな腫瘍を形成する始原細胞として機能する。これらの性質は、主に液性因子

によって直接的に惹起し得る為、がん微小環境中の非がん細胞が腫瘍進展に寄与する機構にもなりえる。CAFsに含まれる線維芽細胞の性質は不均一であり、がん細胞に作用する液性因子の分泌能力についても同様に不均一であると予想される。MSCsは、体性幹細胞として、他の幹細胞と特殊な微小環境であるニッチを形成する事が知られている。例えば、骨髄間質中の造血幹細胞に対するMSCsは、その未分化状態を維持し、増殖/分化を制御している[8]。がん細胞に対しても、増殖能の促進や幹細胞性を亢進する報告があがっている[73]。卵巣がん腫瘍においては、MSCsは、正常組織由来の細胞に比べてBMP2をより多く分泌し、幹細胞性を亢進するとされる[34]。一方で、分化した骨芽細胞も、乳がんや卵巣がんの骨転移が生じた際に、RANKLの分泌による破骨細胞の活性化を介して、腫瘍形成を促進するとされている[74]。この様に、がん微小環境中のCAFsは、分化の段階によって分泌する液性因子が変化し、異なる機序によってがんの悪性化に寄与していると考えられている。しかしながら、分化の途上に位置する骨のMPCsが、がんの悪性度にいかなる影響を与えるかは、分かっていない。MPCsの分離は、分化能を単細胞レベルで検定しなければ、現状では不可能である。更には、実際の腫瘍中に存在する細胞を採取しなければ、CAFs特有の表現型を反映できない。我々は、肺腫瘍から採取されたCAFsの単細胞由来クローンの作製によって、骨のMPCsを分離した。そこで、このクローンを用いる事で、腫瘍中の骨のMPCsが有する機能を解析できると考えた。

(ii) 目的

本研究の目的は、肺腫瘍に存在する骨の MPCs が有する、がん進展に寄与する機能の解明である。実験は以下のステップで進めた。

1. 肺腫瘍の CAFs の単細胞クローンから、骨分化能が高いものと低いものをそれぞれ選出し、培養上清を採取した。
2. 肺腺がん細胞 A549 のがん進展に関わる機能の解析実験に対し、CAFs クローンの培養上清を用い、その影響を検討した。

(iii) 実験材料および方法

(1) 肺腺がん細胞の培養

肺腺がん細胞株 A549（理研）は、10%の FBS（Life technology）を添加した DMEM F12 HAM 培地（Sigma-Aldrich）を用いて、37℃、5% CO₂ の条件下で培養し、実験に使用する 2 日前に 10cm dish に 1.0×10^6 個播種した。

(2) 線維芽細胞クローンの培養上清の採取

樹立後 3 継代以内の線維芽細胞クローンを、37℃、5% CO₂ の条件下で、10 cm dish 上で培養を行い、セミコンフルエントになった段階で、無血清の DMEM F12 HAM 培地に交換した。その 24 時間後に培養上清を回収し、0.45μm 低吸着 filter (Millipore) に通してから回収した。即時使用しない場合は、液体窒素中に浸して凍結した後、-20℃ 中で保存した。

(3) WST 法

A549 を 96 well plate(日本 DB)に 5.0×10^3 /well 個播種し、37℃、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した後、培地を無血清の DMEM F12 HAM 培地、もしくは線維芽細胞の培養上清と交換した。その後更に 2 日間培養を行い、Cell counting kit-8（同仁科学研究所）を 10 μl / well を添加。

37°Cで 1 時間インキュベートし、プレートリーダー Spectra MAX 190 (Molecular Devices) を用いて 450 nm の波長の吸光度を測定した。

(4) スフェア形成法

DMEM F12 HAM 培地に対し、EGF (PROSPEC)、bFGF (PROSPEC)、HGF (PROSPEC) を 20 ng /ml 添加したものを、コントロールのスフェア形成培地とした。A549 を 6 well low-attachment plate(Corning)に、スフェア形成培地、もしくは線維芽細胞の培養上清を用いて 1.0×10^4 /well 個播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 10 日間培養した。その後、光学顕微鏡システム Keyence(KEYENCE)により、1 well 中から 5 つの視野を、4 倍率で撮影した。

画像中の直径 100 μm 相当の細胞塊を画像解析ソフトウェア Image J を用いて計測し、コントロールに対する割合を算出した。

(5) 創傷治癒法

A549 を 96 well plate(ESSEN)に 5.0×10^3 /well 個播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 2 日間培養した後、コンフルエントになった事を確認した。Wound maker (ESSEN) により培養器中央にスクラッチを行い、PBS による洗浄を行った後、無血清の DMEM F12 HAM 培地もしくは、線維芽細胞の培養上清を添加した。更に Incucyte (ESSEN) で 37°C、

5% CO₂ の条件下で 24 時間インキュベーションし、その開始時および 6 時間毎に容器内の撮影を行った。その後、画像解析ソフトウェア Win ROOF(三谷商事)を用いて、撮影された画像中の創傷面積を計測し、開始時間に対する比を算出した。

(6) 定量的 RT-PCR

Total RNA の抽出、cDNA の合成、PCR 反応の方法については、p にて記述した。使用した標的遺伝子および、発現標準化に使用した GAPDH のプライマー配列については Table 1 に記載した。

(7) 統計解析

2 サンプル間の比較については、t 検定を用いて統計解析を行い、両側検定で P value が 0.05%未満であった場合を有意差があると見なした。

(iv) 結果

腫瘍中の骨の MPCs の機能を解析する為、単細胞由来クローン 9 種の中で、実験に使用するクローンの選出を行った。定量化された骨分化能 (Figure 11) が、hVAFs と同等である 5% 以上を示したもののの中で、増殖性を示さなかったクローン (5) を除いた 3 つ (1、3、9) を骨分化能が高いクローンとして選び出した。また、比較対象として、分化能を有さない線維芽細胞に相当するクローンを、最も値が低い 3 つ (2、7、8) を骨分化能が低いクローンとして選び出した。その後、培養上清を採取し、以後の実験に用いた。

(1) CAFs の液性因子による肺がん細胞 A549 の増殖能への影響

肺がん細胞の増殖能に対して、CAFs の液性因子が与える影響を調べる為、生細胞数を測定する WST 法を用いて、クローンの培養上清下で培養した際の A549 の細胞数を検討した (Figure 12A)。各クローンの値は、Clone-1: 0.69 ± 0.08 、Clone-3: 0.71 ± 0.02 、Clone-9: 0.76 ± 0.05 、Clone-2: 0.67 ± 0.07 、Clone-7: 0.67 ± 0.14 、Clone-8: 0.69 ± 0.7 であった。更に骨分化能が高いクローン群と低いクローン群の平均値を算出すると、コントロールの値に比べ、それぞれ高い値を示したが (0.67 ± 0.3 vs. 0.72 ± 0.02 vs. 0.69 ± 0.03)、有意差は見られなかった (Figure 12B)。よって、CAFs の培養上清は、どちらの群も増殖能へ影響しない事が示された。

(2) CAFs の液性因子による肺がん細胞の幹細胞性への影響

幹細胞は、自己複製能と高い生存性を有する為、低密度の浮遊状態でも増殖し、細胞塊スフェアを形成する事が知られている。そこで、肺がん細胞の幹細胞性に対して、CAFs の液性因子が与える影響を調べる為、スフェアの形成能力を評価した。CAFs クローンの培養上清中で A459 のスフェア形成を実施した所 (Figure 13)、リコンビナントの成長因子で調整されたコントロール培地に対する比を算出すると、各クローンの値は、Clone-1: 3.25 ± 0.51 、Clone-3: 4.25 ± 0.51 、Clone-9: 2.25 ± 0.51 、Clone-2: 1.25 ± 0.38 、Clone-7: 2.00 ± 0.51 、Clone-8: 3.75 ± 0.33 となり、増加していた (Figure 14A)。クローンの骨分化能の高い群と低い群の平均を算出した場合も、コントロールよりも有意に増加していた ($p < 0.01$) が、一方で、骨分化能の高い群と低い群の間には、有意な違いは見られなかった (3.7 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.3) (Figure 14B)。この為、CAFs の液性因子はがん細胞のスフェア形成を促進するが、その効果に骨分化能は相関しない事が示唆された。

(3) CAFs の液性因子による肺がん細胞の遊走能への影響

CAFs の液性因子が与える肺がん細胞の遊走能に対する影響を調べる為、創傷部への細胞の移動を評価する創傷治癒法を実施した (Figure 15)。18 時間後の A549 は、コントロールである無血清培地下では殆ど遊走を示さなかった ($98.3 \pm$

0.8%)。クローンの培養上清下で遊走を行わせた場合、創傷部への移動が見られ、各クローンの創傷面積は、Clone-1: $89.6 \pm 0.2\%$ 、Clone-3: $87.7 \pm 1.0\%$ 、Clone-9: $89.2 \pm 1.2\%$ 、Clone-2: $91.8 \pm 1.4\%$ 、Clone-7: $92.8 \pm 0.2\%$ 、Clone-8: $91.5 \pm 0\%$ に減少していた (Figure 16A)。更にクローンの骨分化能の高い群と低い群の平均値を算出し、比較すると、有意に骨分化能が高い群が、創傷面積を減少させた ($88.7 \pm 0.3\%$ vs. $92.0 \pm 0.2\%$ 、 $p < 0.01$) (Figure 16B)。この結果により、骨分化能の高い CAFs は、肺がんの遊走能を亢進させる作用が強い事が示唆された。

そこで、遊走促進に関わる液性因子を同定する為、実験に使用した 6 種のクローンに対し、がん細胞の遊走を促進させる液性因子として、TGF- β 1、SDF-1、HGF、EGF、PDGF-BB、VEGF-A の発現を、PCR によって測定した。EGF と PDGF-BB については、検出限度以下の発現であった (データ非表示)。また、残りの 4 遺伝子については発現が検出されたが、骨分化能が高いクローン群に特異的に発現が高い遺伝子は、認められなかった (Figure 17)。

(4) CAFs の骨分化能と臨床病理学的項目との相関の検討

CAFs を採取した 9 検体において、骨分化能(von Kossa 染色の定量値)と臨床病理学的因子 (Table 2) の相関を検討した (Figure 18)。性別と骨分化能に関しては、von Kossa 染色の定量値は男性: $7.4 \pm 0.6\%$ に対して女性: $4.1 \pm 0.3\%$ であり、男性の方が高い値を示したが、有意な差ではなかった。喫煙歴との関係では、有意な差を持って喫煙歴を有する方が高い von Kossa 染色の定量値を示した

($3.8 \pm 0.2\%$ vs. $7.0 \pm 0.5\%$, $p < 0.05$)。更に、がんの進行度（リンパ節転移の有無）によって、早期がん（リンパ節転移なし）5検体、進行がん（リンパ節転移あり）4検体を比較すると、 $6.6 \pm 0.7\%$ vs. $5.0 \pm 0.4\%$ であり、有意な差を認めなかった。肺がんの組織学的種類によっても分類を行い、腺癌7検体と大細胞神経内分泌癌（LCNEC）2検体を比較した結果、 $4.7 \pm 0.2\%$ vs. $10.1 \pm 0.8\%$ となり、LCNECの方が高い値を示したが、有意差は示さなかった。最後に脈管浸潤なし3検体と有り6検体を比較した。両群の間には有意差は検出されなかったが、浸潤を呈していた方が高い値が示された（ $4.3 \pm 0.2\%$ vs. $6.7 \pm 0.5\%$ ）。

(v) 考察

本研究では、Ⅲ章で作製されたヒト肺腫瘍由来の CAFs から分離された骨の MPCs クローンを用い、その液性因子が A549 の幹細胞性と遊走能を亢進する事を示した。更に、遊走能の促進効果は、CAFs の有する骨分化能が高い方がより強く、骨の MPCs が、がん細胞の遊走亢進を介して腫瘍進展に寄与する機能を有する可能性を初めて示した。

線維芽細胞は、様々な機構でがんの進展に関与している。MSCs は、VEGF や PDGF によって内皮細胞の血管新生を引き起こし[2]、腫瘍の栄養状態を改善したり、がん細胞を殺傷する免疫細胞に対し、TGF- β による免疫抑制を惹起したりすることで、その生存を補助しているとされる[75]。このような間接的な作用を起こす液性因子は、がん細胞にも直接的な作用をもたらす。がん細胞に対して、VEGF は遊走能、PDGF は増殖能をそれぞれ亢進する[76, 77]。また、SDF-1 は、MSCs が腫瘍間質中において発現が上昇する因子の 1 つであり、がん細胞の遊走能の促進に作用する[78]。TGF- β もまた、上皮間葉転換 (EMT) と呼ばれる形質転換を引き起こす事により、がん細胞の幹細胞性や遊走能向上に寄与するとされる[79]。他にも HGF および EGF は、増殖能と遊走能の促進に寄与する[80]。

骨分化能がより高いクローンの方が肺がん細胞の遊走能を亢進した結果により、我々は、分化能を有さない CAFs よりも、より未分化で MSCs に性状に近い MPCs は、MSCs と同様に、これら遊走能を促進するサイトカインの発現が高いと予想した。しかしながら、検索した 6 つの遺伝子、VEGF-A、PDGF-BB、TGF- β 1、

SDF-1、HGF、EGFの中で、分化能が低いクローンよりも骨のMPCsのクローン群で発現の高いものは無かった。少なくとも、PDGFとEGFは、増殖能の亢進にも作用するサイトカインである為、発現がほぼ見られなかった事は、CAFsの培養上清が増殖能に影響しなかった結果 (Figure 12) と、合致している。一方で、SDF-1やTGF- β 、HGFについては、MSCs以外のCAFsにおいても分泌される液性因子として知られている[81]。ただし、スフェアの形成数に差が見られなかった為、分化能を有さないCAFsと同等の幹細胞性亢進作用がある事が示された。こちらの作用に差が無いにも関わらず、遊走能への作用が異なった現象については、1つの因子が強く発現しているのではなく、複数の遊走促進因子の微細な発現量の違いが複合した可能性と、サイトカイン以外の機構を有している可能性が考えられる。例えば、細胞から放出される輸送小胞は、分泌に適したタンパク質以外の分子を細胞間で伝達する事が可能である。中でも40~100 nm程度のエクソソームは、miRNAの様な機能性の核酸を内包しており[82]、MSCsやがん細胞もこのシステムを利用して他の細胞への情報伝達を行っている事が知られている[83-85]。MSCsからの分化の過渡期として、MPCsが共通の機能を残しているとすれば、エクソソームを利用している可能性は考えられる。その場合、遺伝子の発現量のみでは、MPCsとMSCsや分化能を有さない線維芽細胞との性質の違いを検出する事が困難である事が予想される。MPCs特異的な機能を詳細に同定する為には、サイトカイン以外の機序を視野に入れて検討を行う必要もあると考える。

臨床病理学的な検討を行い、性別、喫煙歴、がんの進行度および分類、脈管浸潤の所見に基づいて検体間の骨分化能を比較したが、喫煙歴以外に明確な有意差を示した項目は無かった。Ⅲ章にて述べた通り、喫煙は MSCs/MPCs の脂肪分化を阻害する他、骨分化促進に作用する TNF- α に起因する炎症反応を惹起する為[86]、骨の MPCs の存在頻度を CAFs 中で増加させる可能性がある。また、肺腺癌患者において、重度の喫煙者には、有意に血管浸潤所見が多い事が報告されている[87]。脈管浸潤所見による CAFs の骨分化能の高さには、有意性はなく、傾向に留まったが、この報告は、がん細胞の遊走能を促進させる骨の MPCs の増加によって、血管浸潤が誘発される可能性を示唆している。性ホルモンは、MSCs の分化能に影響を与える事が知られる。しかし、男性ホルモンであるテストステロンは、脂肪分化を抑制し[88, 89]、女性ホルモンであるエストロゲンは骨分化を促進に作用する為[89]、結果的に骨分化促進的になる事には変わりなく、性別による有意差が生じなかったと考えられる。LCNEC は、悪性度が高く、全肺がん中の約 3% を占める、比較的希少な組織型であり[90]、その生物像はあまり明らかではない。リンパ節転移や脈管浸潤の頻度が多く、男性の喫煙者に多い事が知られており[91]、骨分化能が対照群よりも高い値を示した 3 つの因子と関連している。実際に、検討した 2 検体についても男性の喫煙者かつ脈管浸潤所見を示していた。LCNEC 自体もまた、骨分化能と有意に相関を示した因子ではないが、その悪性の病態の機序に、骨の MPCs が寄与している可能性も考えられる。

(vi) 結論

肺腫瘍由来の CAFs は、液性因子の分泌によって、A549 細胞の幹細胞性の亢進と遊走能促進を行う機能を有する事を示した。更に骨分化能が高い CAFs は、分化能を有さない CAFs よりも、遊走能の促進効果が高く、骨の MPCs は、遊走能亢進を介した腫瘍進展機能を有する事が示された。本研究の成果は、有する分化能によって、がん細胞の悪性化に対する機能が異なるという、新たな知見を提供し、単細胞レベルの解析によって、がん微小環境の実像を明らかに出来る事を提案するものである。

V. 総合考察

(i) CAFs を構成する線維芽細胞が有する分化能の不均一性

線維芽細胞は、広範な臓器に存在する細胞であり、解剖学的部位による性質に違いがある事が分かっている[92, 93]。これらの差異は、器官発生時の転写調節や、臓器機能の特異性に根差したものである事が示唆されている。一方で、同一組織中の不均一性は、細胞外基質生産や分化能といった細胞機能を有するかどうかに起因する[94]。これらの機能は、組織の恒常性維持に関与しており、創傷に応じて、肝臓の星細胞は活性化型に形態変化し、心臓の線維芽細胞の一部は内皮細胞へ転換する等、細胞応答の違いとして表れる。しかしながら、腫瘍組織に存在する線維芽細胞には、個々の細胞機能の違いだけでなく、骨髄間質組織由来の線維芽細胞が動員される事による臓器の違いに加え、ファイブロサイトや血球細胞等の細胞種から転換する事による、起源となる細胞種の違いも存在し得る。更には、CAFs に特有な表現型を与えるがん細胞は、遺伝子の不安定性によって不均一なゲノタイプを有している。幹細胞性が高い CSCs の様な特殊なポピュレーションの存在、EMT およびその逆の現象である間葉上皮転換 (MET) 等の形質変化を含めれば、がん細胞の性質も多様性に富んでいる。よって、CAFs の不均一性の形成には、正常組織よりも非常に多様な因子が関与している。一定のマーカー発現に基づいた判別や濃縮は、CAFs が内包する複雑な背景を排除し、本来の生物像から逸脱してしまう恐れがある。本研究では、我々

は、クローンの作製による単細胞レベルの機能解析を、この問題を解決可能な手法として用い、肺腫瘍由来の CAFs を構成している線維芽細胞の分化能を明らかにした。更にその中でも、骨分化能を有する MPCs は、がん細胞の遊走能亢進によって腫瘍進展に寄与する可能性を示した。

個々の細胞の表現型を解析できる単細胞由来のクローンは、組織の生物像を明らかにする上で有用なツールである。ただし本研究においては、この手法を活用する上で、いくつかの課題が示された。

まず1つは、クローンを作製する際に、ポピュレーションの偏りが生じる可能性である。単一の細胞から長期培養を行うにあたり、線維芽細胞の細胞寿命は短く、延長措置を行わなければクローン作製は困難であり、その操作によって分化能に影響が及んではならない。hTERT は、細胞寿命の延長作用を持つ遺伝子の中では、過剰発現によるがん化の危険が低い為に用いられたが、CAFs の不死化には至らなかった。MSCs は、体細胞の中では未分化な細胞であり、生存性が高い事が知られている。よってより終末分化の段階にある細胞の方が、クローン作製中に死滅しやすく、分化能を有する CAFs がクローン内に濃縮されてしまう事が考えられる。その場合、得られたクローンにおける特定の表現型の存在頻度は、生体中の状態を反映できていない。CAFs のクローン9種の内、骨分化能を示したものは7種であり、hVAFs において同様にクローンの作製を行った際にも、48種中と25種と、骨分化を示す細胞頻度は高くなっていた。また、遺伝子導入操作を実施した時点で、クローン作製に使用した検体は脂肪分化能

を示さなくなっていた。その為、hTERT の遺伝子導入による寿命延長では、骨の MPCs 以外の線維芽細胞のクローン化が十分に出来ていないと考えられる。存在頻度を含めた生物像を解明する為には、分化能に影響を与えず、より長期の寿命延長が可能な手法の開発が必要となる。

2つ目の問題は、分化能の評価方法である。本研究では、骨分化能の指標として、ALP 染色と von Kossa 染色の 2 つを用いたが、ALP 染色を指標とした場合の定量値は、hTERT を遺伝子導入した際に、von Kossa の値に変化が見られなかったのに対して、低下していた。ALP は、分化初期段階における発現が見られる他に[95]、胚性幹細胞等が発現する多能性マーカーとして用いられる事もあり[96]、骨分化マーカーとしての特異性は高くない。一方で、von Kossa 染色が可視化するカルシウム等の骨基質沈着は、分化の後期段階に獲得する骨細胞に特異な機能である為[97-99]、指標としては確実である。この理由から、クローンの骨分化能の評価には、von Kossa 染色を用いた。一方で興味深い事に CAFs クローンでは、von Kossa 染色と、ALP 染色の値が共に高いクローンは見られなかった

(Supplemental figure 7A)。また、hVAFs においても 48 種のクローン作製を行ったが、こちらも同様に、クローンが高い値を示すのは、ALP 染色と von Kossa 染色のどちらか一方であった (Supplemental figure 7B)。よって、CAFs 特有の現象ではないと判断できる。ALP 陽性と骨基質沈着が、骨分化の初期と後期を示す事から、各染色法で高い値を示した

クローンは、進行可能な分化段階が異なっていた可能性が考えられる。骨分化は、転写因子 **RUNX2** がマスターレギュレーターとして作用して分化が開始される[100]。培養上清を実験に使用した 6 種の CAFs クローンにおいて、**RUNX2** の発現を検討した結果 (Supplemental figure 8A)、ALP 染色と von Kossa 染色の定量値とは相関が見られなかった。また、幹細胞マーカーとして知られる *SOX2*、*OCT3/4*、*C-MYC*、*KLF4*[101, 102] の発現も同様であった (Supplemental figure 8B-E)。よって、クローンが、骨分化における初期、後期段階のどちらの指標を示すかには、定常時の **RUNX2** 発現や、細胞の未分化性は関与していない事になる。考えられる要因としては、**RUNX2** の発現亢進に関わるシグナル経路には、**BMP/Smads** や **Wnt/ β カテニン** による複数の機序が知られており[103]、それらの上流経路の発現による違いが挙げられる。また、骨分化が後期段階に移行する為には、**RUNX2** の発現低下に伴う **Osx** 遺伝子の発現上昇が必要であり[104-106]、ALP 染色のみ陽性のクローンは、この機構が働いていない可能性がある。ALP を骨分化マーカーとして見た場合に、どのような意義を示しているかどうかを明らかにする為には、分化機構の経路や段階に着目した解析が必要になる。

最後に挙げられる課題は、**MSCs/MPCs** の判定基準として用いる分化系列である。**RUNX2** は、軟骨分化の初期段階においても必要とされる因子である[107]。脂肪分化の機構において、マスターレギュレーター

である PPAR γ は[108]、骨分化を抑制する。逆に骨分化促進に作用する ERK シグナルは、PPAR γ のリン酸化によって脂肪分化を抑制する [109]。同様に骨分化を促進し、脂肪分化を抑制する *Msx2* 遺伝子は[110, 111]、軟骨分化の成熟に作用し[112]、骨格筋への分化に抑制的に作用する [113]。更には、筋分化の制御因子である MyoD は、PPAR γ との間に拮抗的な作用を有し、互いの分化を抑制する [114]。この様に、骨、脂肪、筋肉、軟骨の分化機構は、それぞれの分化系列との共通性や排他性を有しており、分化進行によってどの系列への分化能が喪失されていくかは、ある程度の傾向があると予想される。CAFs という細胞集団がいかにして形成されているかを詳細に解明する為には、骨と脂肪以外の細胞系列への分化能についても、検討が必要になると考えられる。

(ii) がん進展における分化能を有する CAFs の機能

腫瘍の微小環境および、それを構築する細胞の相互作用は、がんの進展や治療に対する応答性に影響を与える。よって、悪性化したがんは、がん進展へ促進的な細胞によって構成された微小環境を有している可能性が高い。乳がんにおいては、がん細胞の生存促進につながる Akt シグナルの基質である Girdin が、CAFs においても発現・活性化し、腫瘍進展を補助している事が知られている [115]。また、肺がんにおいても、CSCs のマーカーとしての報告がなされている Podoplanin の発現が、CAFs でも見受けられ、そのポピュレーションが、より腫

瘍進展に促進的である事を、当研究室では報告してきた[116-118]。この様に、がん細胞は、CAFs に対してある種の教育や同調を行い、がん進展促進的なポピュレーションを選別している事が考えられる。本研究では、肺腫瘍由来の CAFs には脂肪分化能を示す細胞が含まれておらず、分化能を有さない CAFs よりも遊走能亢進に働く骨の MPCs が存在する事を明らかにした。更に、A549 の培養上清を処理した hVAFs は、脂肪への分化が減退する事を示した。これは、肺がん細胞が液性因子を介して、脂肪分化能を有する細胞の頻度を減少させる事で、骨の MPCs を選択的に CAFs 内に残している可能性を示している。

A549 に対して、hVAFs の培養上清を用いて、WST 法、スフェア形成法、創傷治癒法を実施した場合、増殖能に関してはコントロールに比べて有意に増加させた (Supplemental figure 9A)。一方で hVAFs の培養上清のスフェア形成促進作用は骨分化能が低いクローン群と同等であるが (Supplemental figure 9B)、遊走能には影響を与えなかった (Supplemental figure 9C)。hVAFs と CAFs の骨分化能は同等である為、同様の遊走能促進効果が期待できる筈である。この結果に対しては、hVAFs に含まれる骨の MPCs 以外のポピュレーションには、増殖能を促進させる細胞、遊走能に影響しない、もしくは抑制する細胞も存在している事も考えられた。一方、クローンの作製に用いた CAFs の検体の初代培養株の培養上清を用いてスフェア形成と創傷治癒を行わせた場合、スフェア形成はクローン 6 種より若干強く促進され (Supplemental figure 9B)、遊走能促進は低分化能群と同等であった (Supplemental figure 9C)。CAFs の初代培養株中では、骨

分化能を有さない線維芽細胞が支配的であるとすれば、スフェア形成や、遊走能促進の効果が、それらのクローンと同等である事は矛盾せず、hVAFsと比較して、既に遊走能促進的でないポピュレーションが含有されていない事も予想できる。但し、hVAFsがA549の培養上清によって影響を受けた事により、遊走能促進的な細胞集団となるかどうかについては、培養上清処理されたhVAFsや、脂肪のMPCsを含むhVAFsクローンによる検討を行い、確かめる必要がある。

肺がんは骨転移を引き起こしやすい事で知られる。Pagetが唱えた「種と土壌説」に従えば[119]、転移先の微小環境は、腫瘍の形成と進展にとって優位性を持ち、骨に存在する細胞は、がん進展に促進的な表現型を有する事になる。骨転移性の前立腺がん細胞は、FGF9の分泌を介して、MSCsの骨分化を促進する事が報告されている[120]。更に、肺がんにおいては、実際に異所性骨化を引き起こす事例が報告され、骨分化を誘導するBMP2の発現が、がん細胞において高い事が知られる[121]。よって、骨形成環境は、それを好むがん細胞によって腫瘍中に誘導され、がん進展を促進していると考えられる。特にBMP2はがん細胞の遊走能と幹細胞性を亢進する液性因子としても知られ[122, 123]、骨分化促進的な微小環境と、我々が示したがん進展作用は関連していると思われる。

現状では、肺がん細胞による脂肪分化能の低下、および骨のMPCsが有する遊走能促進作用が、どのような液性因子に因るかは、不明である。BMP2は、MSCs自身も産生する分子であり[124]、このような、骨形成環境を促進させる因子を相互に分泌している可能性は十分に考えられる。今後、がん細胞側についても、

骨形成環境を好むかどうかに着目して検討を行うことが、解明の糸口になるか
もしれず、その分子は、骨転移性がんの治療標的となる事が期待される。

VI. 結論

ヒト肺腫瘍由来の CAFs は、MSCs を含有せず、様々な骨分化能を有する MPCs と分化能を有さない線維芽細胞で構成される細胞集団である事を示した。この中で、骨の MPCs は、肺がん細胞の遊走能促進を介して、がん進展に寄与する可能性を示した。本研究で得られた成果は、単細胞レベルの解析によって、がん微小環境を構成する分化能の異なる線維芽細胞は、それぞれにがん進展に対する機能が異なる事を示す知見である。

VII. 參考論文

1. Nombela-Arrieta, C., J. Ritz, and L.E. Silberstein, The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews molecular cell biology*, 2011. **12**(2): p. 126-131.
2. Maxson, S., et al., Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells translational medicine*, 2012. **1**(2): p. 142-149.
3. Sudo, K., et al., Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem cells*, 2007. **25**: p. 1610–1617.
4. Bieback, K., et al., Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells*, 2004. **22**(4): p. 625-34.
5. Campagnoli, C., et al., Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 2001. **98**(8): p. 2396-402.
6. Toma, J.G., et al., Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology*, 2001. **3**(9): p. 778-84.
7. Cappellesso-Fleury, S., et al., Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of clinical immunology*, 2010. **30**(4): p. 607-19.
8. Mendez-Ferrer, S., et al., Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-U59.
9. Ozaki, N., et al., Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by ROR α and their roles in adipogenesis. *Genes to Cells*, 2012. **17**: p. 109–121.
10. Lee, K., et al., Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Molecular and cellular biology*, 2000. **20**(23): p. 8783–8792.
11. Taipaleenmäki, H., et al., Wnt signalling mediates the cross-talk between bone marrow derived pre-adipocytic and pre-osteoblastic cell populations. *Experimental cell research*, 2011. **317** p. 745 - 756.
12. Backesjo, C.M., et al., Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral research*, 2006. **21**(7): p. 993-1002.
13. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal*

- of cell science*, 2000. **113** (7): p. 1161-6.
14. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
 15. Lv, F.J., et al., Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 2014. **32**(6): p. 1408-19.
 16. Angela, D.L., et al., Comparative analysis of mesenchymal stromal cells biological properties. *International scholarly research notices stem cells*, 2013 **2013** (674671).
 17. Riekstina, U., et al., Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem cell reviews and reports*, 2009. **5**(4): p. 378-86.
 18. Bourin, P., et al., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013. **15**(6): p. 641-8.
 19. Al-Nbaheen, M., et al., Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2013. **9**: p. 32 – 43.
 20. Yannarelli, G., et al., Brief report: the potential role of epigenetics on multipotent cell differentiation capacity of mesenchymal stromal cells. *Stem cells*, 2013. **31**(1): p. 215-220.
 21. Hass, R., et al., Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling*, 2011. **9**: p. 12.
 22. Ostuni, R., et al., Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in immunology*, 2015. **36**(4): p. 229-239.
 23. Condamine, T., et al., Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annual review of medicine*, 2015. **66**: p. 97-110.
 24. Yu, H., M. Kortylewski, and D. Pardoll, Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews immunology*, 2007. **7**(1): p. 41-51.
 25. Kitamura, T., B.Z. Qian, and J.W. Pollard, Immune cell promotion of metastasis. *Nature reviews immunology*, 2015. **15**(2): p. 73-86.
 26. Kalluri, R., The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature reviews cancer*, 2016. **16**(9): p. 582-598.
 27. Arina, A., et al., Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and

- not circulating precursors. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 2016. **113**(27): p. 7551-7556.
28. Bergfeld, S.A. and Y.A. DeClerck, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer and metastasis reviews*, 2010. **29**(2): p. 249-261.
 29. Ishii, G., A. Ochiai, and S. Neri, Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Advanced drug delivery reviews*, 2015.
 30. Quante, M., et al., Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell*, 2011. **19**(2): p. 257-72.
 31. Uchibori, R., et al., NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer research*, 2013. **73**(1): p. 364-372.
 32. Spaeth, E.L., et al., Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS one*, 2009. **4**(4).
 33. Bergfeld, S.A., L. Blavier, and Y.A. DeClerck, Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote survival and drug resistance in tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*, 2014. **13**(4): p. 962-975.
 34. McLean, K., et al., Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *Journal of clinical investigation*, 2011. **121**(8): p. 3206-19.
 35. Ding, G.X., et al., Comparison of the characteristics of mesenchymal stem cells obtained from prostate tumors and from bone marrow cultured in conditioned medium. *Experimental and therapeutic medicine*, 2012. **4**(4): p. 711-715.
 36. Lin, J.T., et al., Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6. *Experimental cell research*, 2013. **319**(14): p. 2216-29.
 37. Yan, X.L., et al., Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. *Breast cancer research and treatment*, 2012. **132**(1): p. 153-64.
 38. Liotta, F., et al., Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T-cell proliferation. *British journal of cancer*, 2015. **112**(4): p. 745-54.
 39. Trial, J., M.L. Entman, and K.A. Cieslik, Mesenchymal stem cell-derived

- inflammatory fibroblasts mediate interstitial fibrosis in the aging heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2016. **91**: p. 28-34.
40. Hinz, B., Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of investigative dermatology*, 2007. **127**(3): p. 526-537.
 41. Wu, Y.J., R.C.H. Zhao, and E.E. Tredget, Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem cells*, 2010. **28**(5): p. 905-915.
 42. Hoshino, A., et al., Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma tumor formation: podoplanin in fibroblast functions for tumor progression. *Cancer research*, 2011. **71**(14): p. 4769-79.
 43. Hoshino, A., et al., Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008. **368**(2): p. 305-310.
 44. Chiba, H., et al., CD105-positive cells in pulmonary arterial blood of adult human lung cancer patients include mesenchymal progenitors. *Stem cells*, 2008. **26**(10): p. 2523-30.
 45. Gottschling, S., 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): p. 19-29.
 46. Xiao, L., et al., Tumor endothelial cells with distinct patterns of TGF beta-driven endothelial-to-mesenchymal transition. *Cancer research*, 2015. **75**(7): p. 1244-1254.
 47. Podechard, N., et al., Inhibition of human mesenchymal stem cell-derived adipogenesis by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro*, 2009. **23**(6): p. 1139-44.
 48. Atashi, F., A. Modarressi, and M.S. Pepper, The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem cells and development*, 2015. **24**(10): p. 1150-1163.
 49. Stolzing, A. and A. Scutt, Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging cell*, 2006. **5**(3): p. 213-24.
 50. Hiraoka, C., et al., Two clonal types of human skin fibroblasts with different potentials for proliferation and tissue remodeling ability. *Journal of dermatological science*, 2016. **82**(2): p. 84-94.
 51. Piper, S.L., et al., Inducible immortality in hTERT-human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 2012. **12**: p. 1879-85.
 52. Liang, X.J., et al., Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells

- into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro. *Cell biology international*, 2012. **36**(2): p. 215-221.
53. Tatrai, P., et al., Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012. **422**(1): p. 28-35.
 54. Okamoto, T., et al., Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. **295**(2): p. 354-61.
 55. Wang, L., et al., hTERT gene immortalized human adipose-derived stem cells and its multiple differentiations: a preliminary investigation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2013. **169**(5): p. 1546-56.
 56. Seo, E., et al., SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell reports*, 2013. **3**(6): p. 2075-2087.
 57. Yoon, D.S., et al., Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell proliferation*, 2011. **44**(5): p. 428-440.
 58. Armesilla-Diaz, A., G. Elvira, and A. Silva, p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Experimental cell research*, 2009. **315**(20): p. 3598-3610.
 59. Roig, A.I., et al., Immortalized epithelial cells derived from human colon biopsies express stem cell markers and differentiate in vitro. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 1012-U272.
 60. Coleman, K.G., et al., Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. *Journal of biological chemistry*, 1997. **272**(30): p. 18869-18874.
 61. Fiaschi, T. and P. Chiarugi, Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *International journal of cell biology*, 2012. **2012**: p. 762825.
 62. Kabashima-Niibe, A., et al., Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer science*, 2013. **104**(2): p. 157-64.
 63. Huang, W.H., et al., Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene*, 2013. **32**(37): p. 4343-54.
 64. Scherzad, A., et al., Human mesenchymal stem cells enhance cancer cell proliferation via IL-6 secretion and activation of ERK1/2. *International journal of oncology*, 2015. **47**(1): p. 391-7.
 65. Karnoub, A.E., et al., Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast

- cancer metastasis. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 557-U4.
66. Martin, F.T., et al., Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast cancer research and treatment*, 2010. **124**(2): p. 317-26.
 67. Liu, Y., et al., Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(28): p. 25007-25015.
 68. Garayoa, M., et al., Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. *Leukemia*, 2009. **23**(8): p. 1515-1527.
 69. Cirri, P. and P. Chiarugi, Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and metastasis reviews*, 2012. **31**(1-2): p. 195-208.
 70. Togo, S., et al., Altered functions of cancer associated fibroblasts in non small cell lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2010. **181**.
 71. Huang, C.P., et al., ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer letters*, 2013. **328**(1): p. 144-151.
 72. Silva, I.A., et al., Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer research*, 2011. **71**(11): p. 3991-4001.
 73. Kuhn, N.Z. and R.S. Tuan, Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of cellular physiology*, 2010. **222**(2): p. 268-277.
 74. Turner, C.J. and C.M. Edwards, The role of the microenvironment in prostate cancer-associated bone disease. *Current osteoporosis reports*, 2016. **14**(5): p. 170-177.
 75. Kudo-Saito, C., Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2015. **3**(April): p. 23.
 76. Kono, S.A., et al., Adding to the mix: fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor receptor pathways as targets in non-small cell lung cancer. *Current cancer drug targets*, 2012. **12**(2): p. 107-123.
 77. De Luca, A., et al., Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *Journal of cellular biochemistry*, 2012. **113**(11): p. 3363-3370.
 78. Orimo, A., et al., Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas

- promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 335-348.
79. Mani, S.A., et al., The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-715.
 80. Johnson, H., et al., Phosphotyrosine profiling of NSCLC cells in response to EGF and HGF reveals network specific mediators of invasion. *Journal of proteome research*, 2013. **12**(4): p. 1856-1867.
 81. Kojima, Y., et al., Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 2010. **107**(46): p. 20009-20014.
 82. Schneider, A. and M. Simons, Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell and tissue research*, 2013. **352**(1): p. 33-47.
 83. Lai, R.C., et al., Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*, 2010. **4**(3): p. 214-222.
 84. Cho, J.A., et al., Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecologic oncology*, 2011. **123**(2): p. 379-386.
 85. Li, X.X., et al., Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NF κ B-TLR signaling pathway. *Journal of hematology & oncology*, 2016. **9**.
 86. Churg, A., et al., Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2002. **166**(6): p. 849-854.
 87. Maeda, R., et al., Influence of cigarette smoking on survival and tumor invasiveness in clinical stage IA lung adenocarcinoma. *The Annals of thoracic surgery*, 2012. **93**(5): p. 1626-32.
 88. Gupta, V., et al., Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*, 2008. **296**(1): p. 32-40.
 89. Huang, C.K., et al., Loss of androgen receptor promotes adipogenesis but suppresses osteogenesis in bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*, 2013. **11**(2): p. 938-950.
 90. Rekhtman, N., Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2010. **134**(11): p. 1628-1638.

91. Takei, H., et al., Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: A clinicopathologic study of eighty-seven cases. *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2002. **124**(2): p. 285-292.
92. Higuchi, Y., et al., Gastrointestinal fibroblasts have specialized, diverse transcriptional phenotypes: A comprehensive gene expression analysis of human fibroblasts. *PLoS one*, 2015. **10**(6).
93. Janson, D.G., et al., Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts. *Journal of investigative dermatology*, 2012. **132**(11): p. 2565-2572.
94. Driskell, R.R. and F.M. Watt, Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*, 2015. **25**(2): p. 92-99.
95. Luo, X.J., et al., Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects. *Laboratory Investigation*, 2008. **88**(12): p. 1264-1277.
96. Li, H., et al., The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, 2009. **460**(7259): p. 1136-U101.
97. Bonewald, L.F., The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research*, 2011. **26**(2): p. 229-38.
98. Zouani, O.F., et al., Insights into the osteoblast precursor differentiation towards mature osteoblasts induced by continuous BMP-2 signaling. *Biology open*, 2013. **2**: p. 872-881.
99. Komori, T., Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and tissue research*, 2010. **339**(1): p. 189-95.
100. Komori, T., Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Osteoimmunology*, 2010. **658**: p. 43-9.
101. Orciani, M., et al., Isolation and characterization of progenitor mesenchymal cells in human pituitary tumors. *Cancer gene therapy*, 2015. **22**(1): p. 9-16.
102. Tancos, Z., et al., Cloning and characterization of rabbit POU5F1, SOX2, KLF4, C-MYC and NANOG pluripotency-associated genes. *Gene*, 2015. **566**(2): p. 148-157.
103. Lin, G.L. and K.D. Hankenson, Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, 2011. **112**(12): p. 3491-3501.
104. Sinha, K.M. and X. Zhou, Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry*, 2013. **114**(5): p. 975-984.
105. Zhou, X., et al., Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proceedings of the national academy of sciences*,

2010. **107**(29): p. 12919-12924.
106. Kanatani, N., et al., Cbf beta regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *Developmental biology*, 2006. **296**(1): p. 48-61.
107. Enomoto, H., et al., Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *Journal of cell science*, 2004. **117**(3): p. 417-425.
108. Lefterova, M.I., et al., PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2014. **25**(6): p. 293-302.
109. Ge, C.X., et al., Reciprocal Control of Osteogenic and Adipogenic Differentiation by ERK/MAP Kinase Phosphorylation of Runx2 and PPAR Transcription Factors. *Journal of Cellular Physiology*, 2016. **231**(3): p. 587-596.
110. Matsubara, T., et al., BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of biological chemistry*, 2008. **283**(43): p. 29119-29125.
111. Ichida, F., et al., Reciprocal roles of Msx2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(32): p. 34015-34022.
112. Amano, K., et al., Msx2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression. *Journal of biological chemistry*, 2008. **283**(43): p. 29513-29521.
113. Kodaka, Y., et al., LIM homeobox transcription factor Lhx2 inhibits skeletal muscle differentiation in part via transcriptional activation of Msx1 and Msx2. *Experimental cell research*, 2015. **331**(2): p. 309-319.
114. Sunadome, K., et al., Antagonism between the master regulators of differentiation ensures the discreteness and robustness of cell fates. *Molecular cell*, 2014. **54**(3): p. 526-535.
115. Yamamura, Y., et al., Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer research*, 2015. **75**(5): p. 813-823.
116. Ito, S., et al., Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012. **422**(1): p. 194-199.
117. Yoshida, T., et al., Podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment induce primary resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. *Clinical cancer research*, 2015. **21**(3): p. 642-651.
118. Neri, S., et al., Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts lead and enhance the local invasion of cancer cells in lung adenocarcinoma. *International journal of cancer*, 2015. **137**(4): p. 784-796.
119. Paget, S., The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The lancet*,

1889. **133**(3421): p. 571-573.
120. Fritz, V., et al., Bone - metastatic prostate carcinoma favors mesenchymal stem cell differentiation toward osteoblasts and reduces their osteoclastogenic potential. *Journal of cellular biochemistry*, 2011. **112**(11): p. 3234-3245.
121. Imai, N., et al., Expression of bone morphogenetic proteins in colon carcinoma with heterotopic ossification. *Pathology international*, 2001. **51**(8): p. 643-648.
122. Hsu, Y.L., et al., Lung tumor-associated osteoblast-derived bone morphogenetic protein-2 increased epithelial-to-mesenchymal transition of cancer by Runx2/Snail signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(43): p. 37335-46.
123. Kang, M.H., et al., BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. *Experimental cell research*, 2010. **316**(1): p. 24-37.
124. Yoshikawa, H., et al., Stimulation of ectopic bone formation in response to BMP-2 by Rho kinase Inhibitor: A pilot study. *Clinical orthopaedics and related research*, 2009. **467**(12): p. 3087-3095.

VIII. 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心なご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先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野長石井源一郎先生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先端医療開発センター長 落合淳志先生に深謝致します。

研究や発表に際し、親身に御指導を賜りました国立がん研究センター先端開発センター臨床腫瘍病理分野 橋本弘子様にご御礼申し上げます。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。

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先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野藤井誠志先生、小嶋基寛先生、菅野雅人先生、柰里真也先生、桑田健先生、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皆様へ感謝致します。

心から尊敬できる先生、先輩方に恵まれ、博士課程の3年間充実した研究生活を送れたことを幸せに思います。

2017年 春

IX. 図表の説明

Table 1. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列情報

Table 2. CAFs を採取した検体の臨床病理学的因子の情報

Figure 1. 線維芽細胞の採取と形態像

- (A) 各線維芽細胞の採取部位を示す。(左: CAFs、右: hVAFs)
- (B) 各 9 検体の肺がん患者より採取された線維芽細胞の初代培養株の形態像を示す。(左: CAFs、右: hVAFs) (Scale bar = 100 μ m)

Figure 2. 骨分化誘導した線維芽細胞の染色像

- (A) CAFs/hVAFs 初代培養株の骨分化誘導後の ALP 染色像 (青色陽性)。
- (B) CAFs/hVAFs 初代培養株の骨分化誘導後の von Kossa 染色 (黒色陽性)。
- (Scale bar = 100 μ m)

Figure 3. 脂肪分化誘導した線維芽細胞の染色像

CAFs/hVAFs 初代培養株の脂肪分化誘導後の Oil red O 染色像 (赤色陽性)。

(Scale bar = 100 μ m)

Figure 4. 線維芽細胞初代培養株の骨分化能の定量値

(A) CAFs/hVAFs 初代培養株の ALP 染色に基づいた骨分化能の定量値。

(B) CAFs/hVAFs 初代培養株の von Kossa 染色に基づいた骨分化能の定量値。

(mean \pm SEM, N=9, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

Figure 5. 線維芽細胞初代培養株の脂肪分化能の定量値

CAFs/hVAFs 初代培養株の脂肪分化誘導後の Oil red O 染色に基づいた脂肪分化能の定量値

(mean \pm SEM, N=9, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

Figure 6. CAFs への hTERT 遺伝子導入の確認

(A) Control (左) および hTERT (右) のレンチウイルスベクターの遺伝子操作実施後の CAFs(検体 2)の形態像。

(Scale bar = 100 μ m)

(B) CAFs(検体 2)の hTERT 遺伝子導入細胞は hTERT の mRNA 発現が初代培養株よりも上昇している。

Figure 7. hTERT 遺伝子導入した CAFs は骨分化能を維持する

(A) Control ベクターおよび hTERT を遺伝子導入した CAFs(検体 2)の ALP 染色像 (左 : 青色陽性) と von Kossa 染色像 (右 : 黒色陽性)。(Scale bar = 100 μ m)

(B) Control ベクターおよび hTERT を遺伝子導入した CAFs(検体 2)の ALP 染色 (左) と von Kossa 染色 (右) に基づいた骨分化能定量値。(mean \pm SEM, N=3, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

Figure 8. 単細胞由来クローンの作製手順

CAFs を限界濃度で 96 well plate に播種し、単一の細胞 (*で記す) である事を光学顕微鏡によって確認した細胞を、384 well plate に再播種し、以後コンフルエントになる度に、より大きな容器に継代を続けた。最終的に 10 cm dish でコンフルエントとなった細胞をクローンとして扱った。

Figure 9. 単細胞由来 CAFs のクローンの形態像

単細胞由来の CAFs クローンを 9 種作製した。

(Scale bar = 100 μ m)

Figure 10. 骨分化誘導された単細胞由来 CAFs クローンの染色像

単細胞由来 CAFs クローンの von Kossa 染色像の代表例 (左:clone 1、右:clone 7)。

(Scale bar = 100 μ m)

Figure 11. 単細胞由来 CAFs クローンの骨分化能 の定量値

単細胞由来 CAFs クローンの von Kossa 染色に基づいた骨分化能定量値。(mean \pm SEM)

Figure 12. 単細胞由来 CAFs クローン培養上清による A549 の増殖能への影響

(A)各クローンの培養上清下における A549 の増殖能を WST 法により測定。

(B)A549 の増殖能の骨分化能が高いクローン群と低いクローンによる平均値。

(mean \pm SEM, n=12)

Figure 13. 単細胞由来 CAFs クローン培養上清下における A549 のスフェア形成

単細胞由来 CAFs クローン培養上清下で A549 のスフェア形成を実施した際の光学顕微鏡像（上：4 倍率、下：10 倍率）。（Scale bar = 100 μ m）

Figure 14. 単細胞由来 CAFs クローン培養上清による A549 の幹細胞性への影響

(A)各クローンの培養上清下における A549 のコントロール培地（EGF、bFGF、HGF:20 ng/ml）に対するスフェア形成割合。

(B)A549 のスフェア形成割合の骨分化能が高いクローン群と低いクローンによる平均値。（mean \pm SEM, N=3）

Figure 15. 単細胞由来 CAFs クローン培養上清下における A549 の遊走能

単細胞由来 CAFs クローン培養上清下で A549 の創傷治癒を実施した際の光学顕微鏡像（左：開始時、右：18 時間後）。（Scale bar = 100 μ m）

Figure 16. 単細胞由来 CAFs クローン培養上清による A549 の遊走能への影響

(A)各クローンの培養上清下における A549 の各時間（開始時、6、12、18 時間

後) の創傷面積割合。

(B) 18時間後における A549 の創傷面積割合の骨分化能が高いクローン群と低いクローンによる平均値。(mean±SEM)

Figure 17. 単細胞由来 CAFs クローンの各種遊走因子の発現

単細胞由来 CAFs クローン 6 種における A:VEGF-A、B:TGF-β1、C:SDF-1、D:HGF の mRNA 発現。PDGF-BB および EGF の検討も実施したが、検出されなかった。

Figure 18.臨床病理学的因子と骨分化能の相関

9 検体の CAFs を、5 つの臨床病理学的因子 A:性別 (男性=5 vs. 女性=4)、B:喫煙歴 (無= 3vs.有 =6)、C: リンパ節転移に基づく進行度 (早期=5 vs. 進行=4)、D: 組織型 (腺がん=7 vs. LCNEC=2)、E:脈管浸潤所見 (VI : Vascular Invasion) (無=3 vs. 有=6) に基づいて分類し von Kossa 染色に基づいた骨分化能定量値を比較した。(mean±SEM, * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$)

Supplemental figure 1. NCAFs の形態像

検体より採取された NCAFs の形態像。

(Scale bar = 100 μ m)

Supplemental figure 2. 骨/脂肪分化誘導した NCAFs の染色像

(A) NCAFs の骨分化誘導後の ALP 染色像 (青色陽性)。

(B) NCAFs の骨分化誘導後の von Kossa 染色像 (黒色陽性)。

(C) NCAFs の脂肪分化誘導後の Oil red O 染色像 (赤色陽性)。

(Scale bar = 100 μ m)

Supplemental figure 3. NCAFs の骨/脂肪分化能

(A) NCAFs の ALP 染色に基づいた骨分化能の定量値。

(B) NCAFs の von Kossa 染色に基づいた骨分化能の定量値。

(C) NCAFs の Oil red O 染色に基づいた脂肪分化能の定量値。

(mean \pm SE, N=9, ** : $P < 0.01$)

Supplemental figure 4. A549 の培養上清処理は hVAFs の脂肪を減退させる

1.0×10^6 個を 10 cm dish に播種後 2 日目に MF 培地に交換し、1 日培養後に回収

された hVAFs (コントロール)、A549 の培養上清を、hVAFs に 3 日間処理し、分化誘導を実施した。

(A) A549 培養上清処理後の hVAFs の ALP 染色像 (青色陽性)。

(B) A549 培養上清処理後の hVAFs の von Kossa 染色像 (黒色陽性)。

(C) A549 培養上清処理後の hVAFs の Oil red O 染色像 (赤色陽性)。

(Scale bar = 100 μ m)

Supplemental figure 5. A549 の培養上清処理は hVAFs の脂肪分化能を低下させる

(A) A549 培養上清処理後の hVAFs の ALP 染色に基づいた骨分化能の定量値。

(B) A549 培養上清処理後の hVAFs の von Kossa 染色に基づいた骨分化能の定量値。

(C) A549 培養上清処理後の hVAFs の Oil red O 染色に基づいた脂肪分化能の定量値。

(mean \pm SE, N=3, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

Supplemental figure 6. CAFs/hVAFs の検体毎の骨/脂肪分化能

(A) CAFs/hVAFs の ALP 染色に基づいた骨分化能定量値の散布図。

(B) CAFs/hVAFs の von Kossa 染色に基づいた骨分化能定量値の散布図。

(C) CAFs/hVAFs の Oil red O 染色に基づいた脂肪分化能定量値の散布図。

Supplemental figure 7. CAFs/hVAFs のクローン毎の ALP、von Kossa 定量値

(A)単細胞由来 CAFs クローン 9 種の ALP 染色と von Kossa 染色に基づいた骨分化能定量値の散布図。

(B) hTERT 遺伝子を導入し、FACS による single sorting により作製された単細胞由来 hVAFs クローン 48 種の ALP 染色と von Kossa 染色に基づいた骨分化能定量値の散布図。

Supplemental figure 8. CAFs クローンの骨分化制御因子と幹細胞マーカーの発現

単細胞由来 CAFs クローン 6 種における A:RUNX2、B:SOX2、C:OCT3/4、D:KLF4、E:C-MYC の mRNA 発現。

Supplemental figure 9. CAFs/hVAFs 初代培養株由来の培養上清による A549 の増殖能、幹細胞性、遊走能への影響

(A) hVAFs 初代培養株由来の培養上清下における A549 の増殖能を WST 法によ

り測定。(mean±SEM, n=12)

(B) CAFs/hVAFs 初代培養株由来の培養上清下における A549 のコントロール培地 (EGF、bFGF、HGF:20 ng/ml) に対するスフェア形成割合。(mean±SEM, N=3)

(C) CAFs/hVAFs 初代培養株由来の培養上清下における 18 時間後の A549 の創傷面積割合。(mean±SEM)

X. 図表

Table 1. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列情報

Primers for qRT-PCR		
Gene	Forward	Reverse
<i>hTERT</i>	5'-ACGGTGTGCACCAACATCTACAA-3'	5'-TCAGAGATGACGCGCAGGA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'
<i>HGF</i>	5'-ACTGCAGACCAATGTGCTAATAGA-3'	5'-CACTCCACTTGACATGCTATTGA-3'
<i>EGF</i>	5'-TCAGCCAGCAGATGGGAATG-3'	5'-TTCAGGGCTGTATGGCAAAGTA-3'
<i>VEGF-A</i>	5'-CATCCAATCGAGACCCTGGTG-3'	5'-TTGGTGAGGTTTGATCCGCATA-3'
<i>PDGF-BB</i>	5'-GTGGCTGGACTGGCCAAATAG-3'	5'-ATGGAGGTCATGTGGACAGCA-3'
<i>TGF-β1</i>	5'-AGCGACTCGCCAGAGTGGTTA-3'	5'-GCAGTGTGTTATCCCTGCTGTCA-3'
<i>SDF-1</i>	5'-TGTGCATTGACCCGAAGCTAA-3'	5'-GGTTTCAGAGCTGGGCTCCTAC-3'
<i>RUNX2</i>	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'	5'-CATTCCGGAGCTCAGCAGAATAA-3'
<i>SOX2</i>	5'-CCAAGATGCACAACCTCGGAGA-3'	5'-CCGGTATTTATAATCCGGGTGCT-3'
<i>OCT3/4</i>	5'-GTGCCGTGAAGCTGGAGAA-3'	5'-TGGTCGTTTGGCTGAATACCTT-3'
<i>KLF4</i>	5'-AAGAGTTCCCATCTCAAGGCACA-3'	5'-GGGCGAATTTCCATCCACAG-3'
<i>C-MYC</i>	5'-GGAGGCTATTCTGCCCATTTG-3'	5'-CGAGGTCATAGTTCCTGTTGGTG-3'

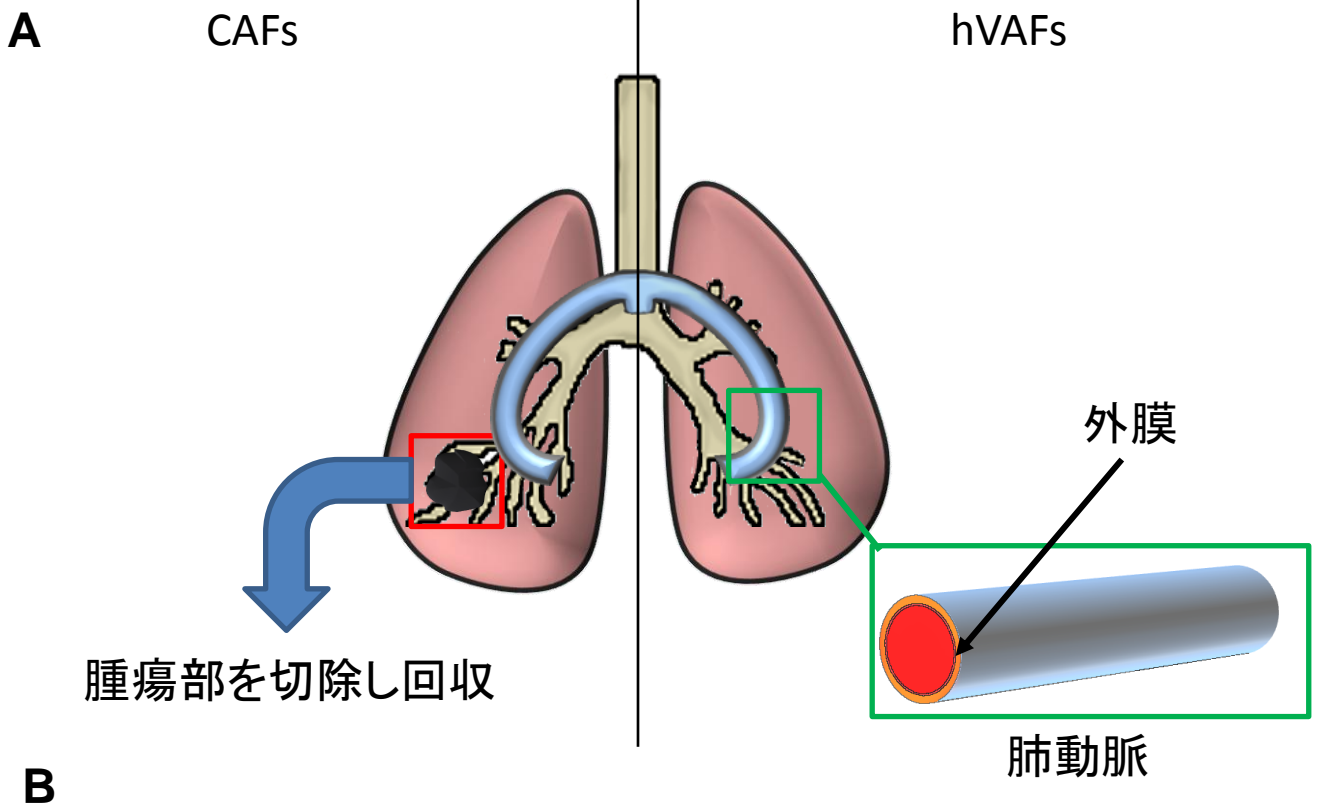
Table 2.

Clinicopathological characteristics

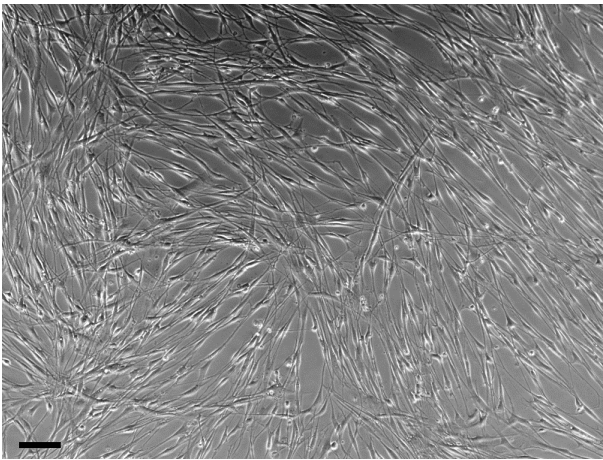
検体	組織型	性別	喫煙歴	脈管浸潤	ステージ
1	Adenocarcinoma	女性	無	有	pT2aN2M0, Stage IIIA
2	Adenocarcinoma	男性	無	無	pT2N0M0, Stage IB
3	LCNEC	男性	有	有	pT2N0M0, Stage IB
4	LCNEC	男性	有	有	pT2N0M0, Stage IB
5	Adenocarcinoma	女性	有	有	pT1bN2M0, Stage IIIA
6	Adenocarcinoma	女性	無	有	pT1aN2M0, Stage IIIA
7	Adenocarcinoma	女性	有	無	pT1bN0M0, Stage IA
8	Adenocarcinoma	男性	有	無	pT1aN0M0, Stage IA
9	Adenocarcinoma	男性	有	有	pT1aN1M0, Stage IIA

LCNEC; Large cell neuroendocrine carcinoma

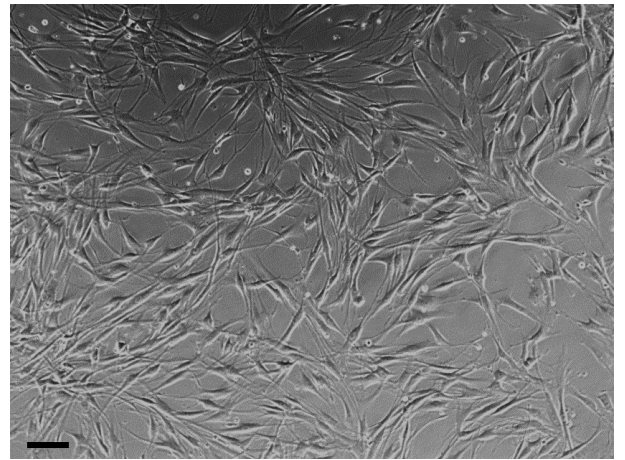
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Supplementary Table 1 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM8



B



CAFs

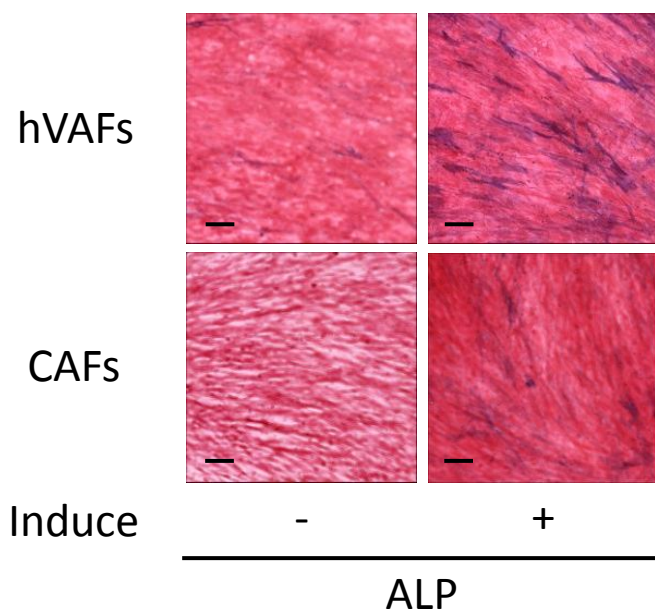


hVAFs

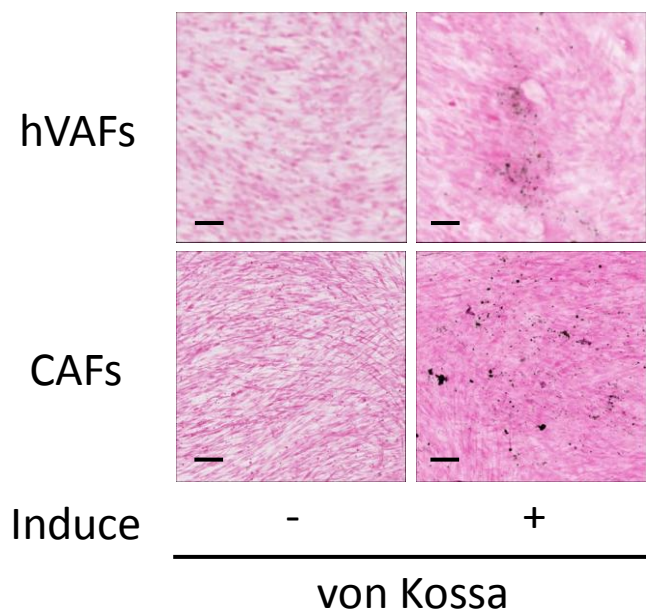
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig1 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM1

Figure 1. 線維芽細胞の採取と形態像

A

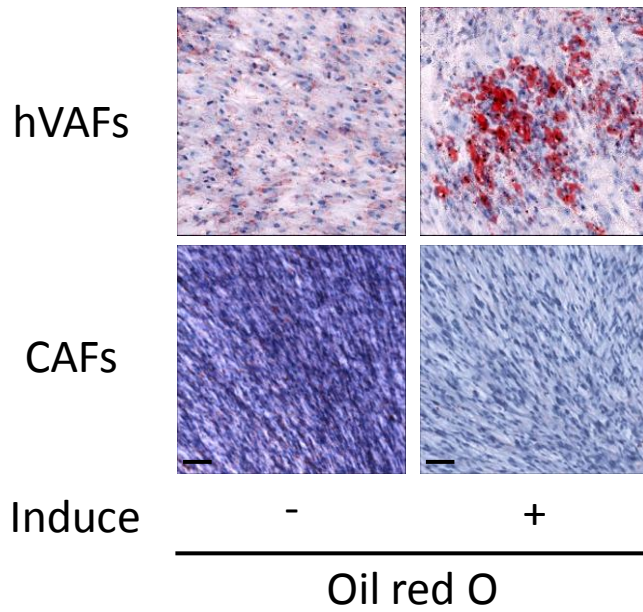


B



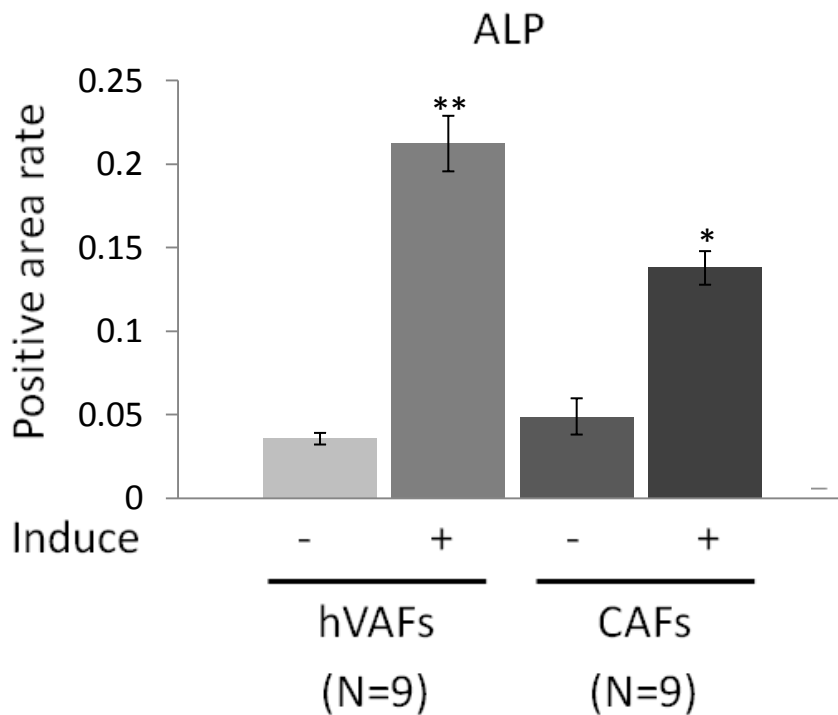
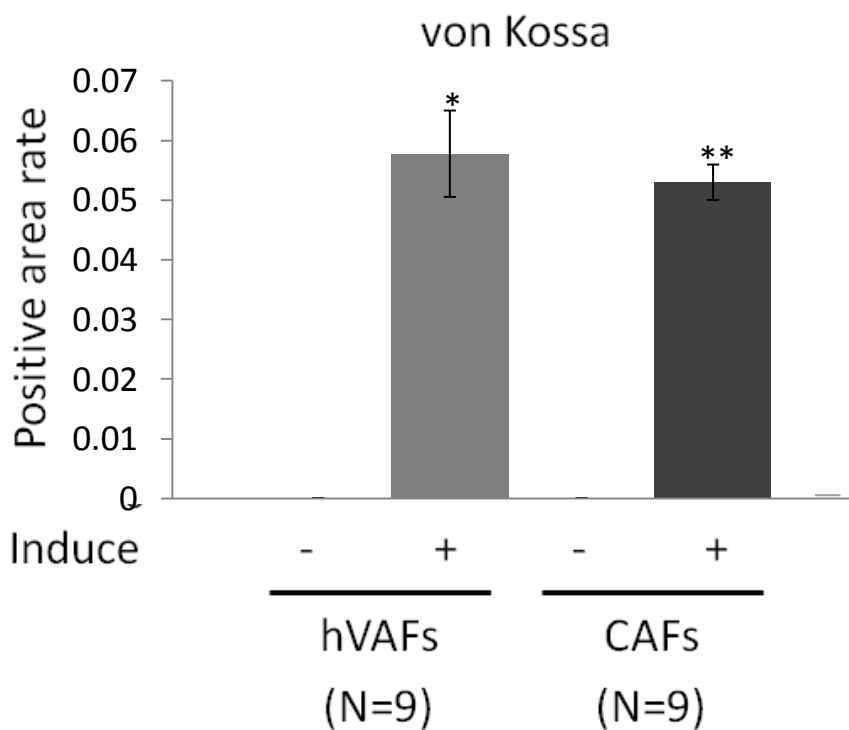
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig1 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig1

Figure 2 . 骨分化誘導した線維芽細胞の染色像



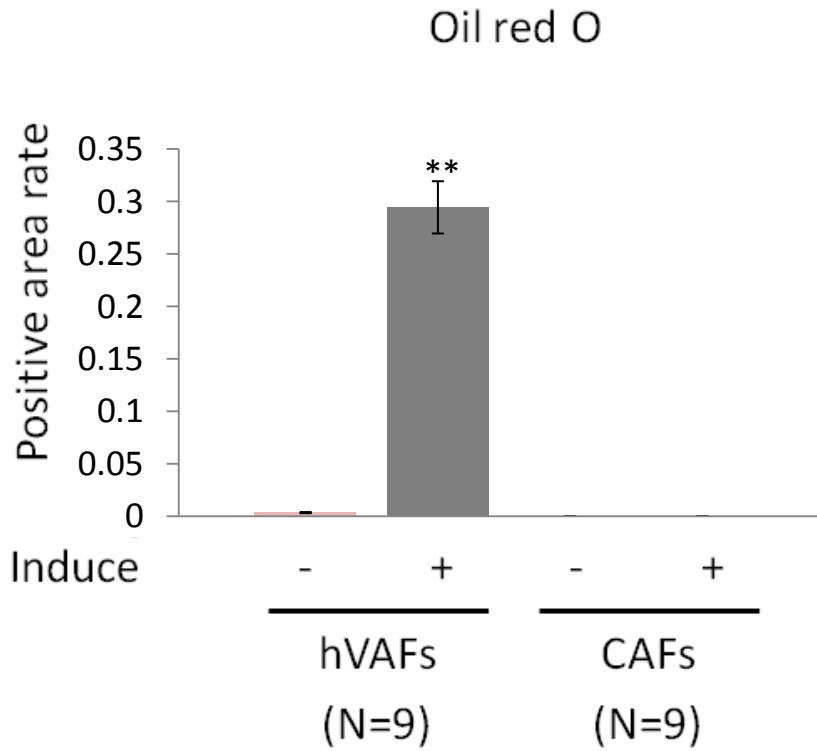
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig1 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig1

Figure 3. 脂肪分化誘導した線維芽細胞の染色像

A**B**

Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig1 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig1

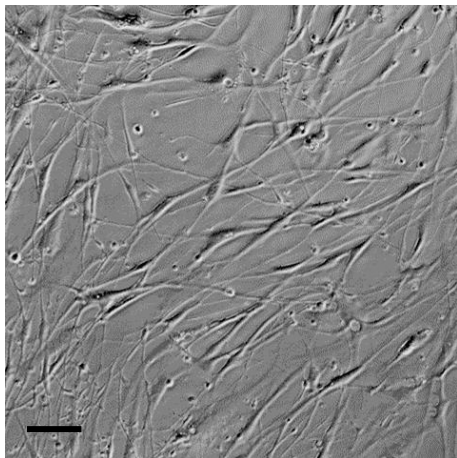
Figure 4. 線維芽細胞初代培養株の骨分化能の定量値



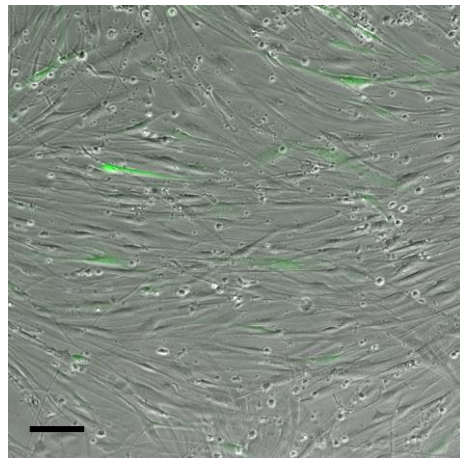
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig1 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig1

Figure 5. 線維芽細胞初代培養株の脂肪分化能の定量値

A

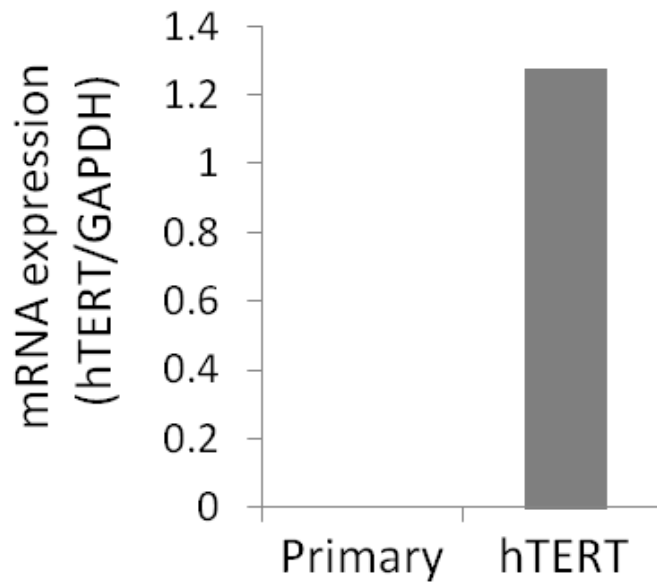


Control



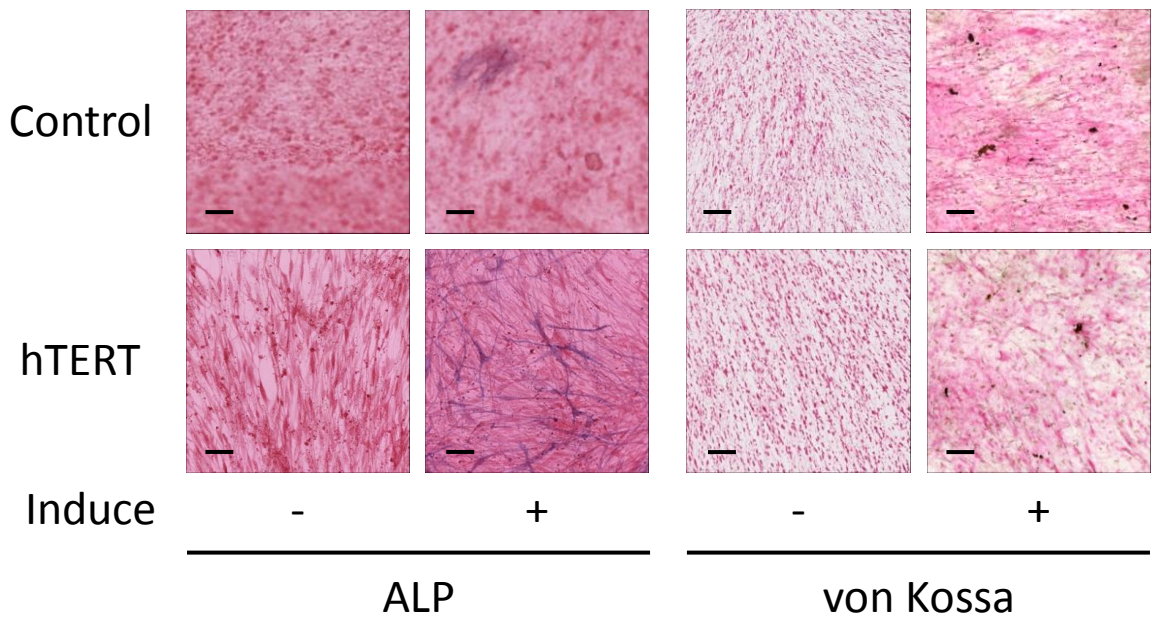
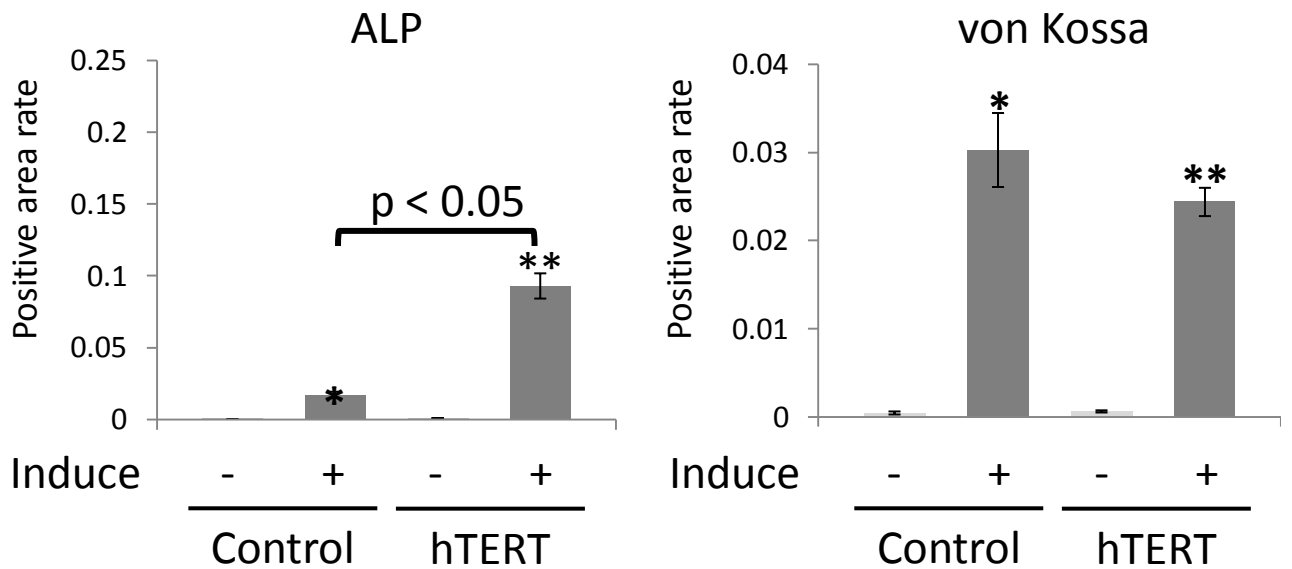
hTERT

B



Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig4 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig4

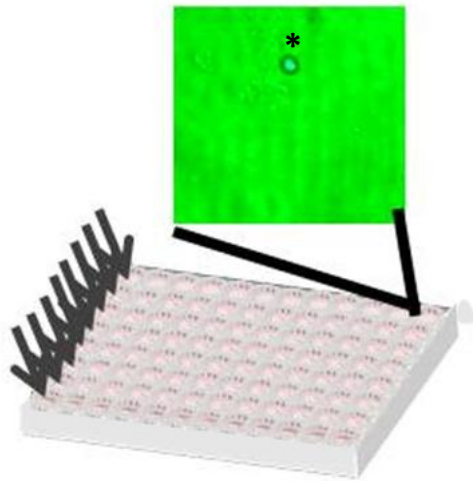
Figure 6. CAFsへのhTERT遺伝子導入の確認

A**B**

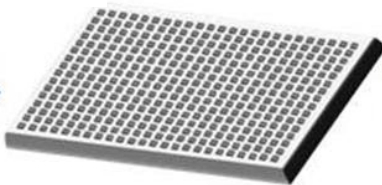
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig4 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig4

Figure 7. hTERT遺伝子導入したCAFsは骨分化能を維持する

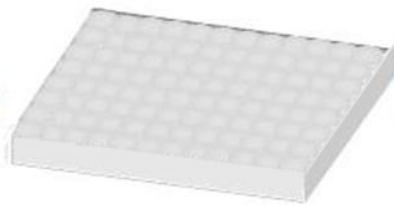
単一細胞を確認



播種



継代

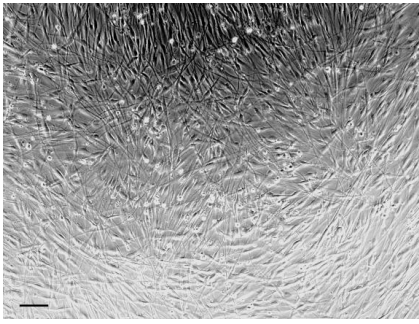


継代

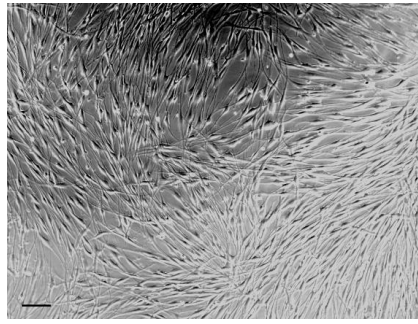


Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig4 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig4

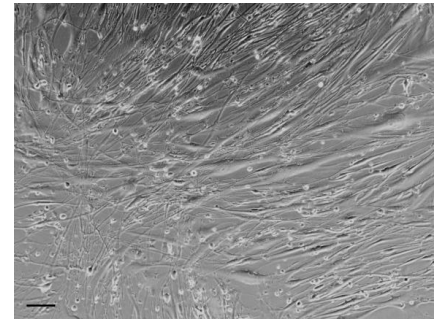
Figure 8. 単細胞由来クローンの作製手順



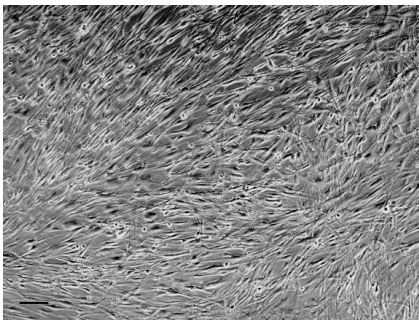
Clone 1



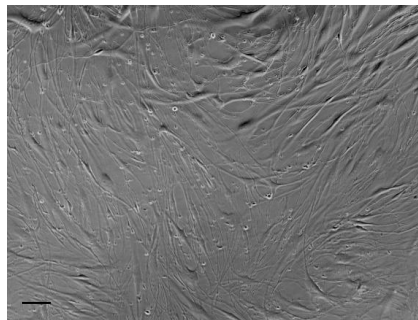
Clone 2



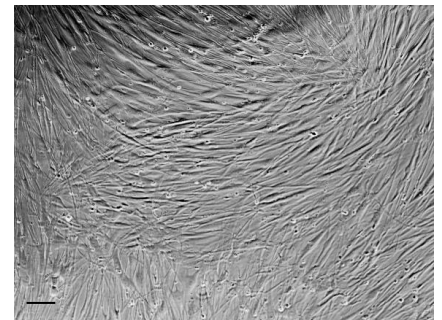
Clone 3



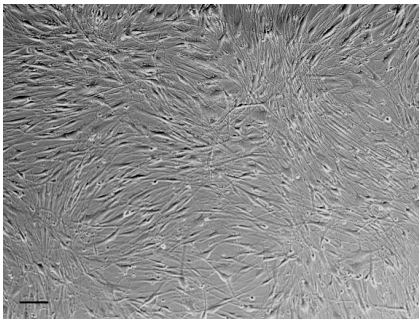
Clone 4



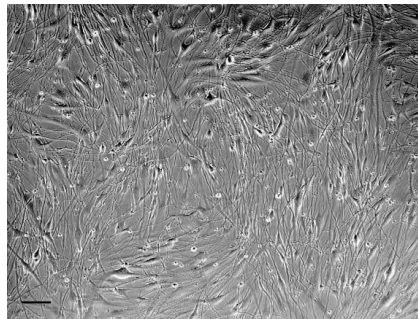
Clone 5



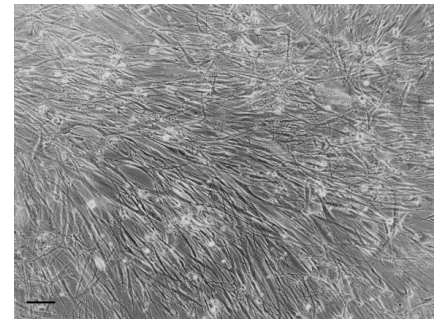
Clone 6



Clone 7



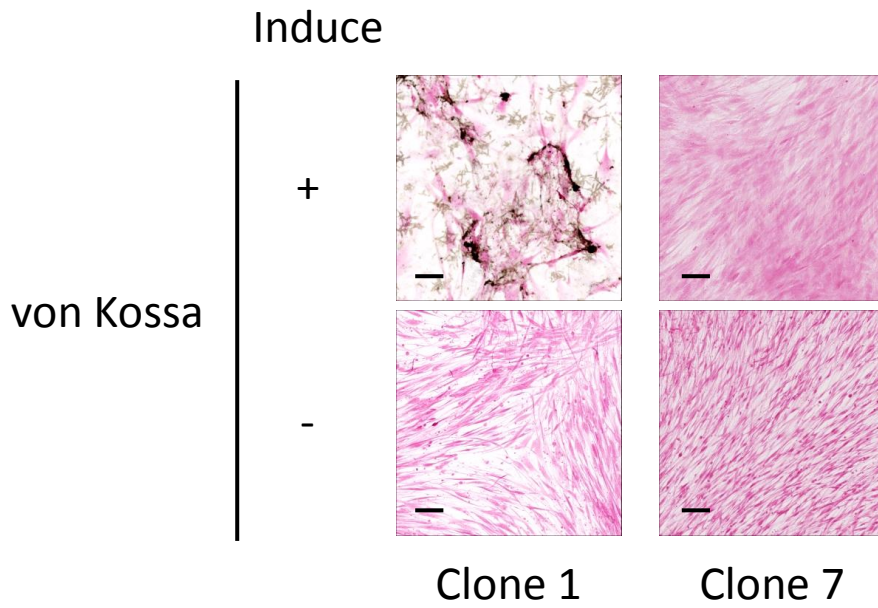
Clone 8



Clone 9

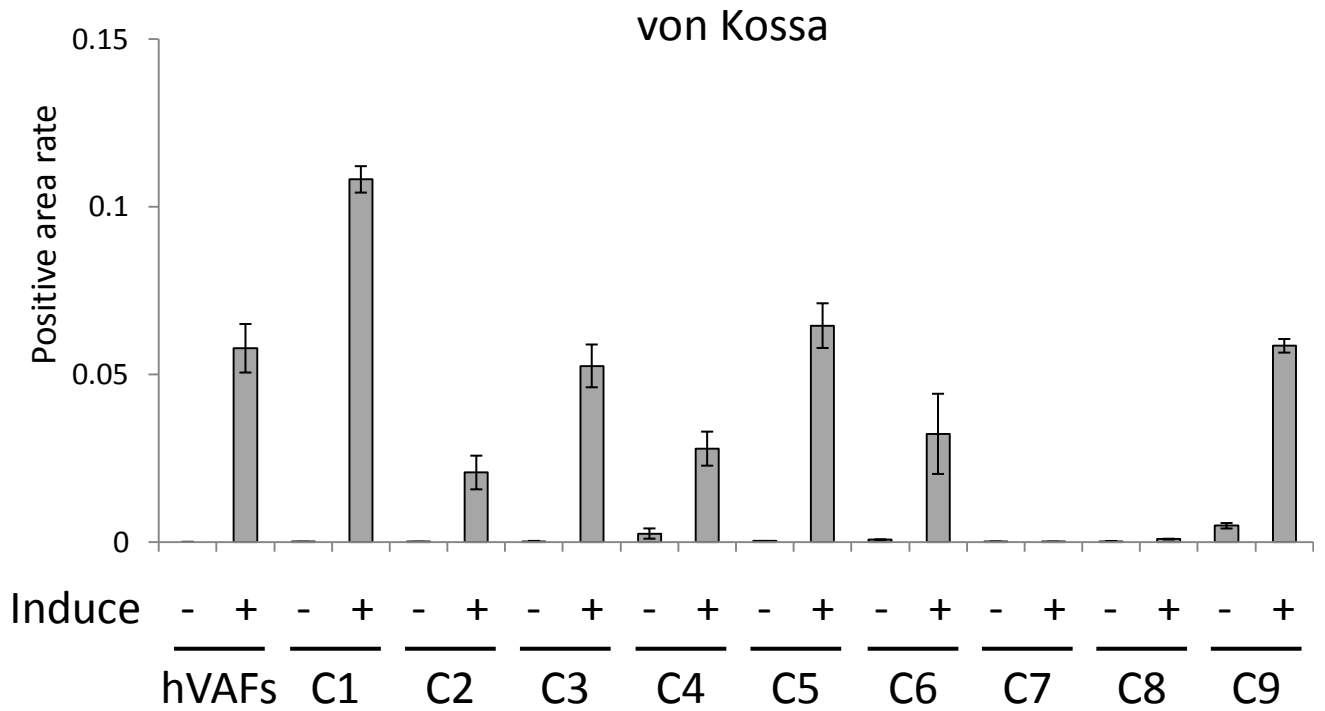
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig3 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM3

Figure 9. 単細胞由来CAFのクローンの形態像



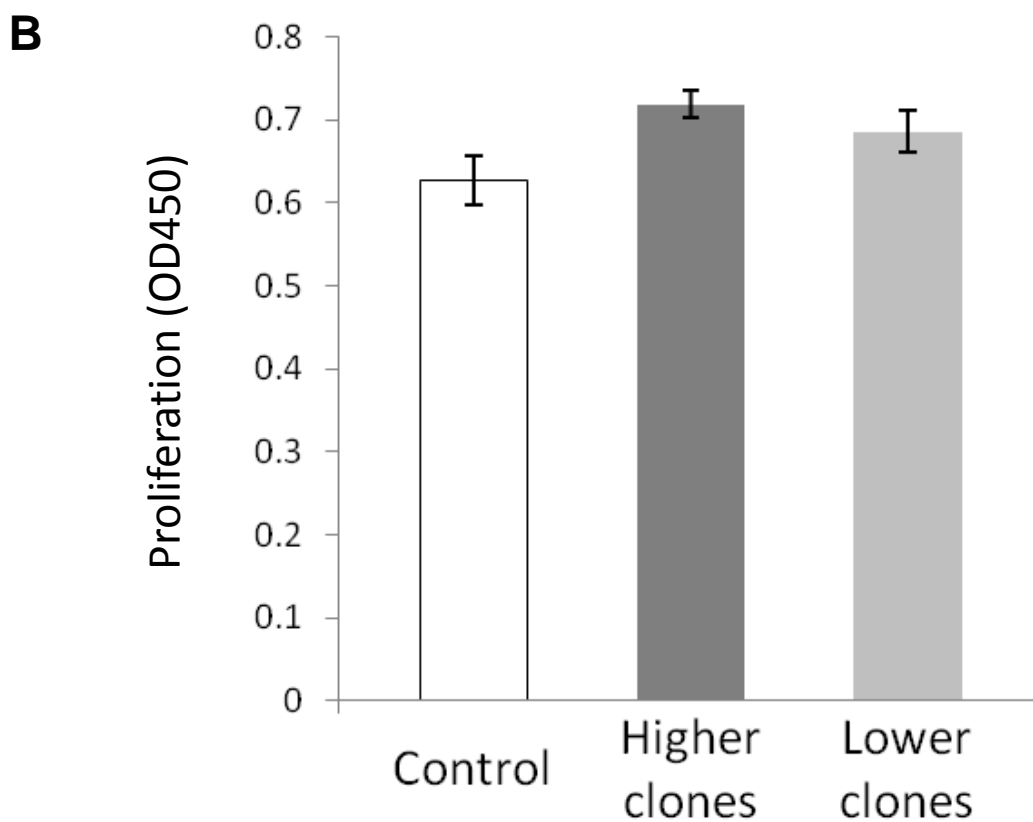
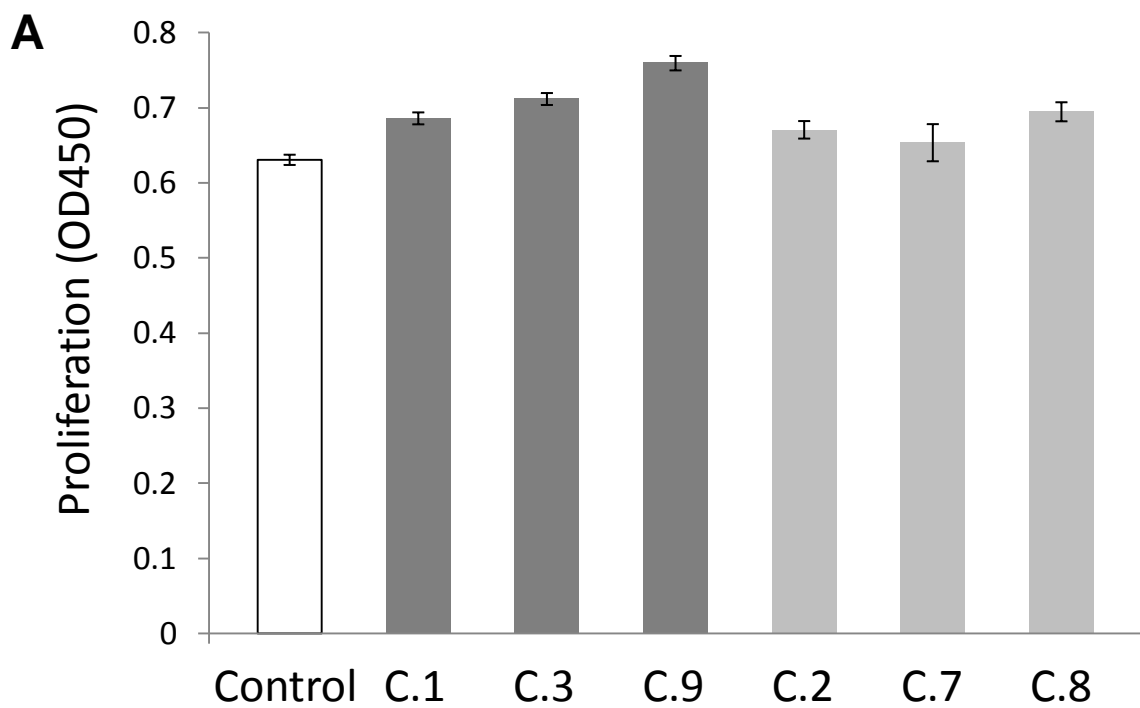
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig5 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig5

Figure 10. 骨分化誘導した単細胞由来CAFスクローンの染色像



Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig5 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig5

Figure 11. 単細胞由来CAFスクロンの骨分化能の定量値



Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig6 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig6

Figure 12. 単細胞由来CAFスクローン培養上清によるA549の増殖能への影響

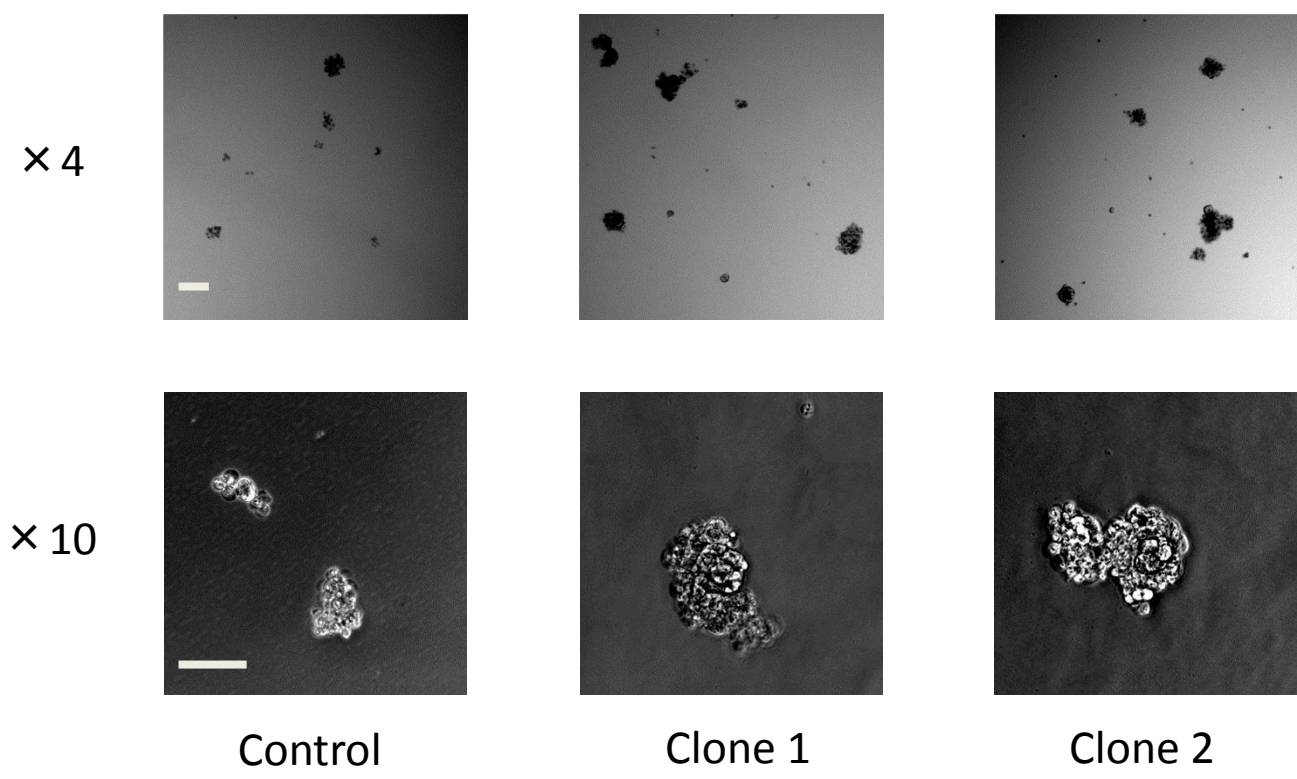


Figure 13. 単細胞由来CAFsクローン培養上清下におけるA549のスフェア形成

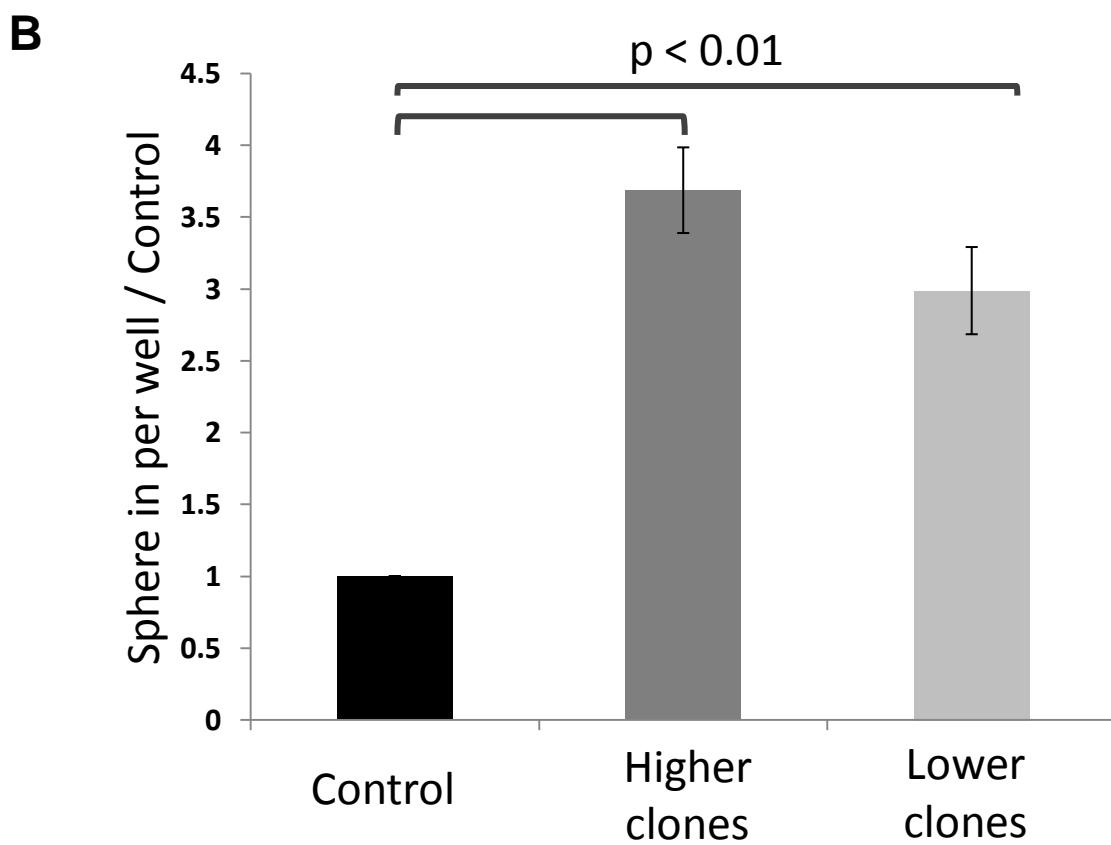
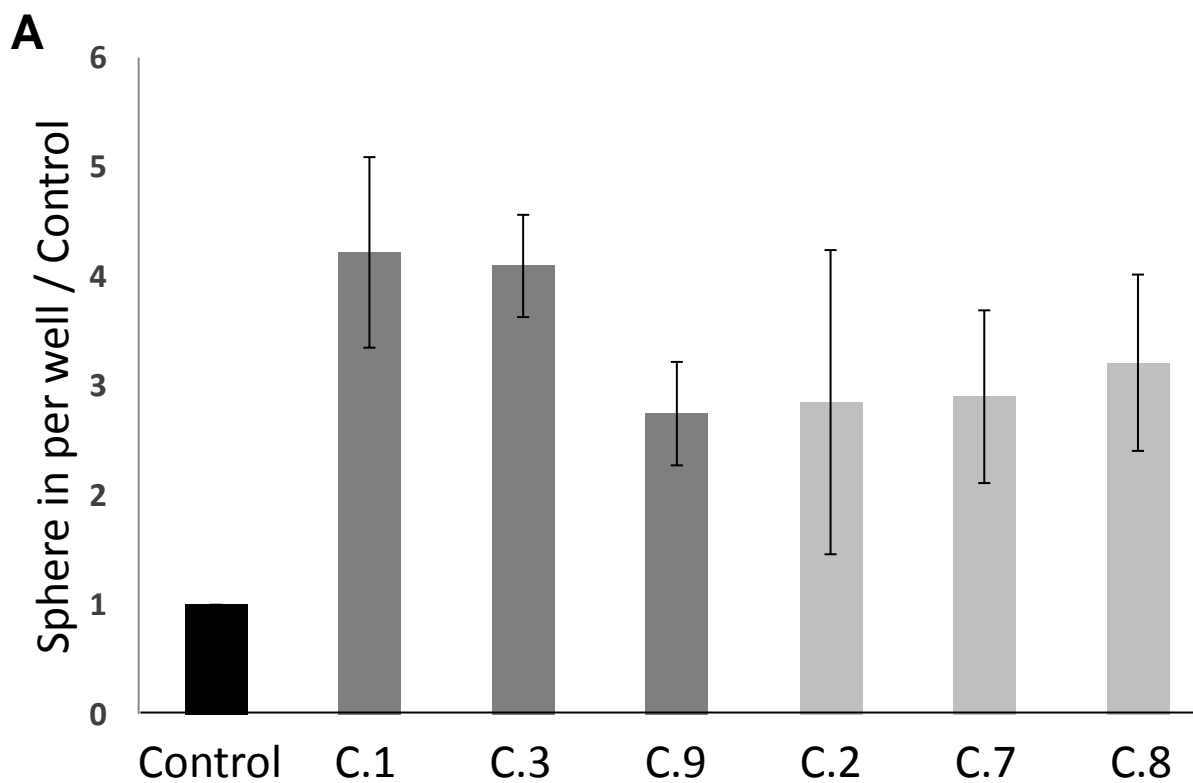
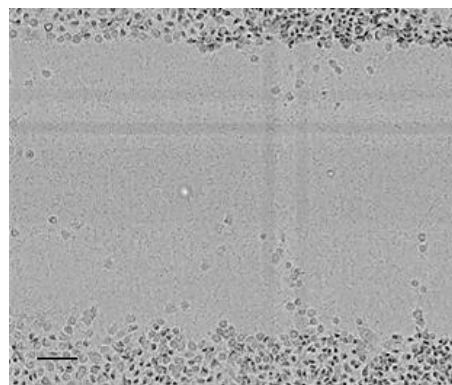
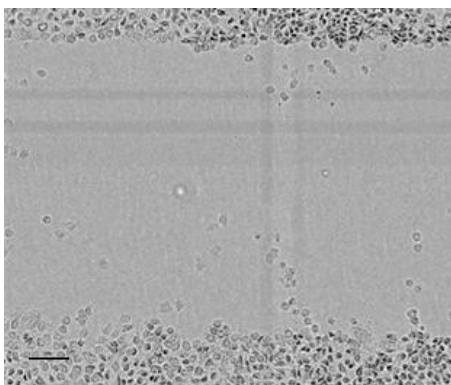
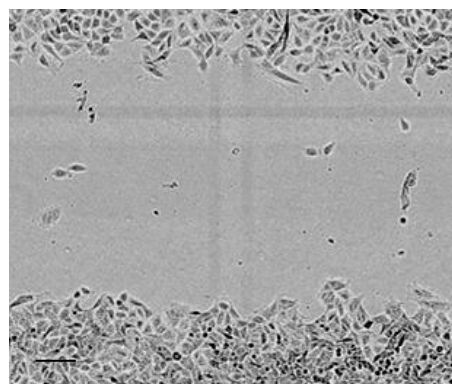
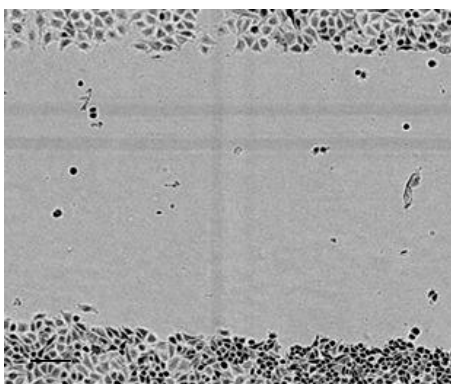


Figure 14. 単細胞由来CAFスクローン培養上清によるA549の幹細胞性への影響

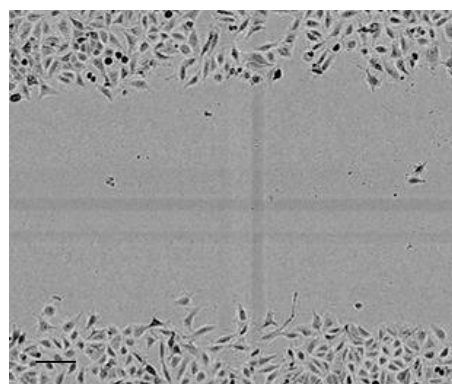
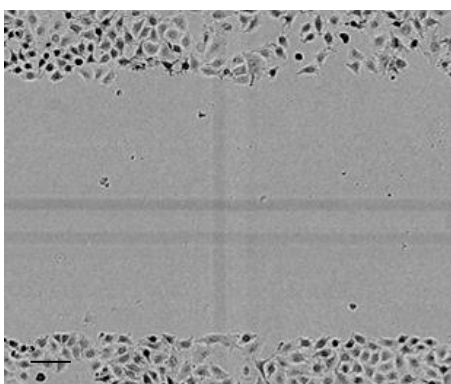
Control



Clone 9



Clone 7

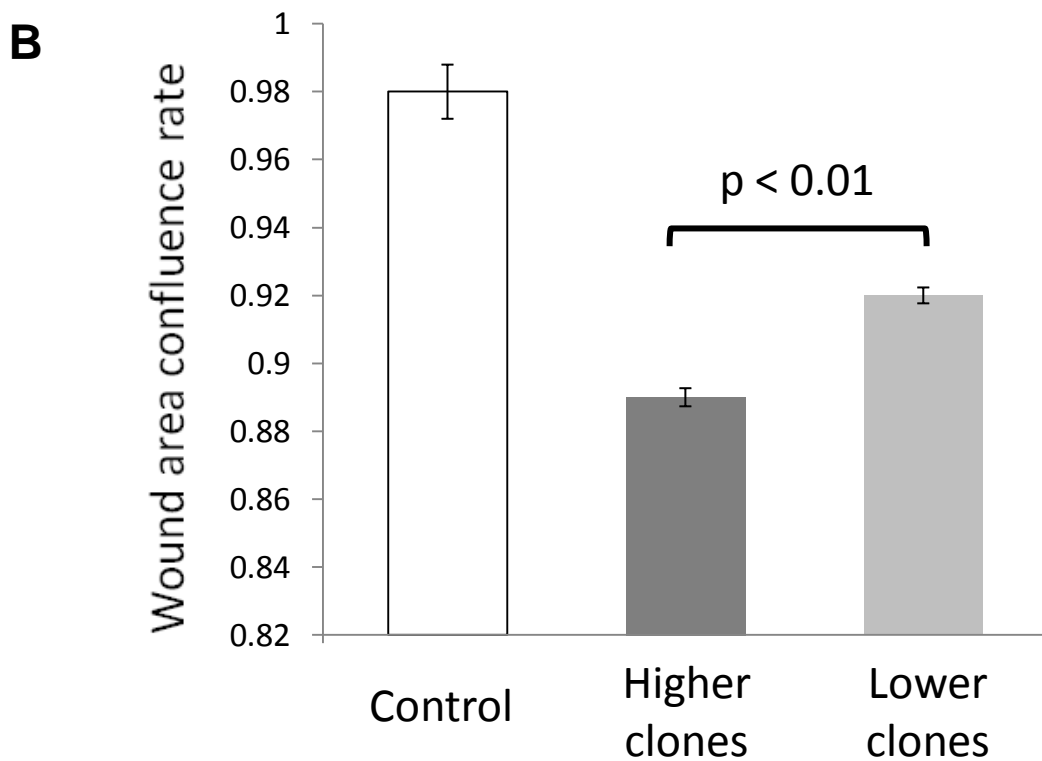
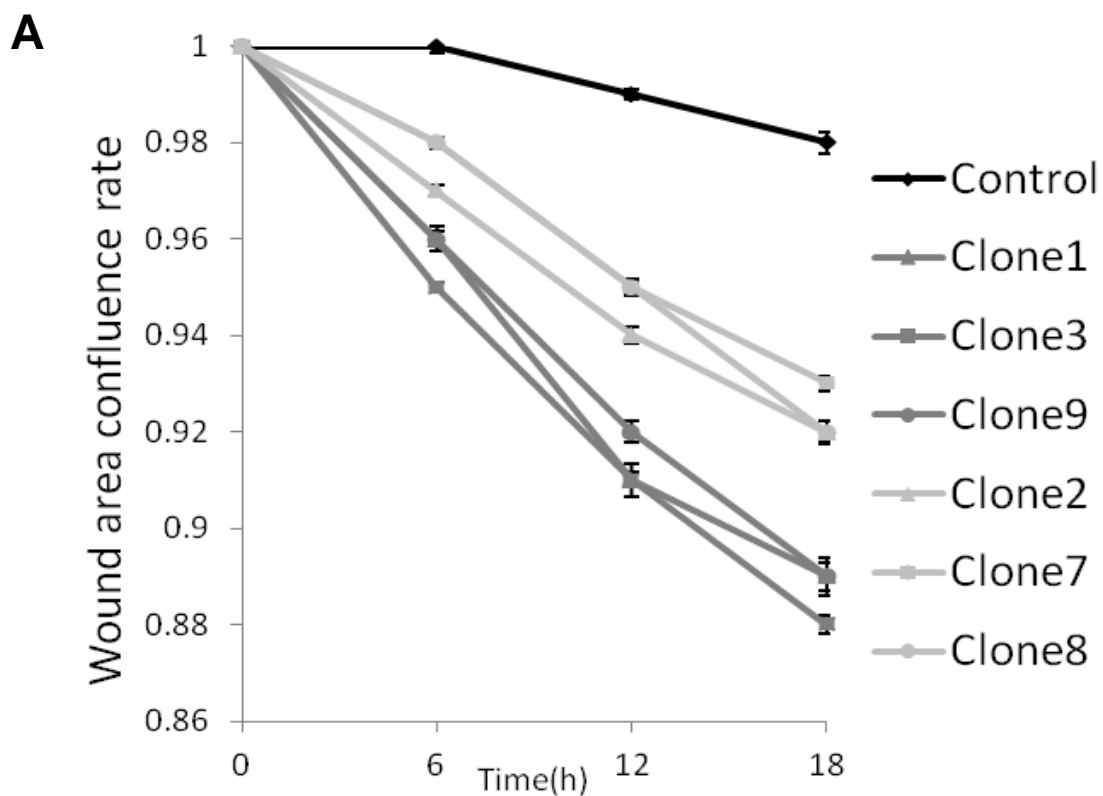


0 h

18 h

Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig6 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig6

Figure 15. 単細胞由来CAFスクローン培養上清下におけるA549の遊走能



Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig6 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig6

Figure 16. 単細胞由来CAFスクローン培養上清によるA549の遊走能への影響

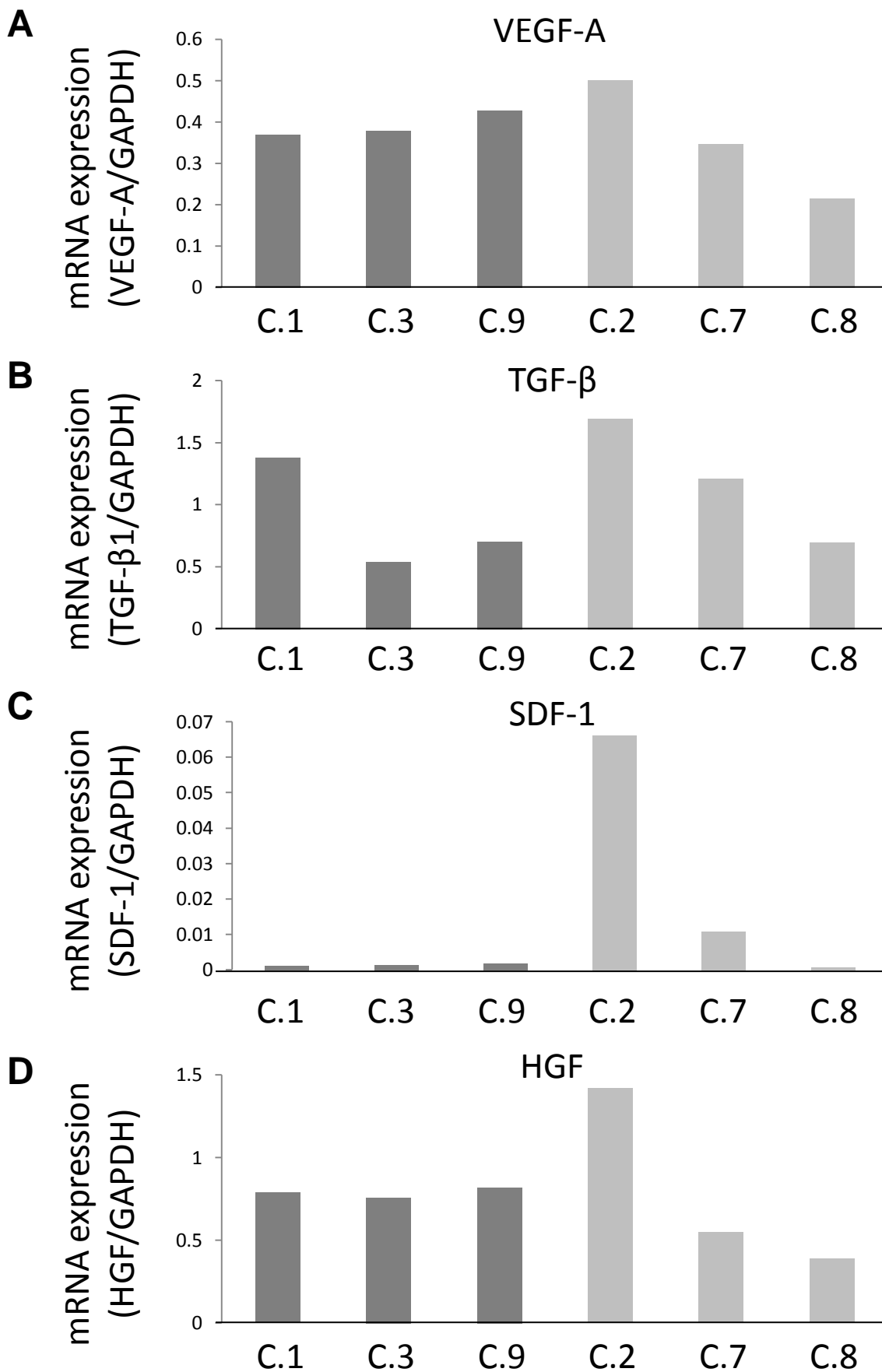
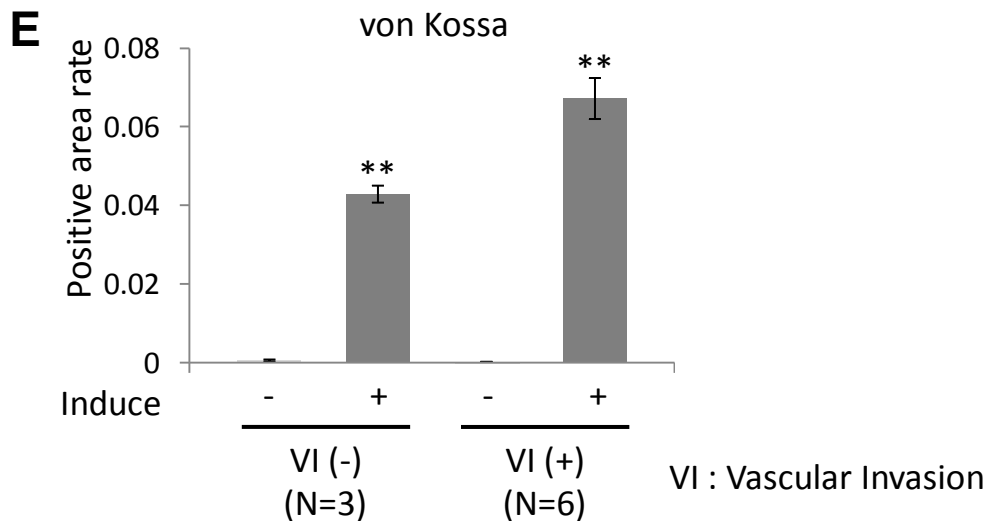
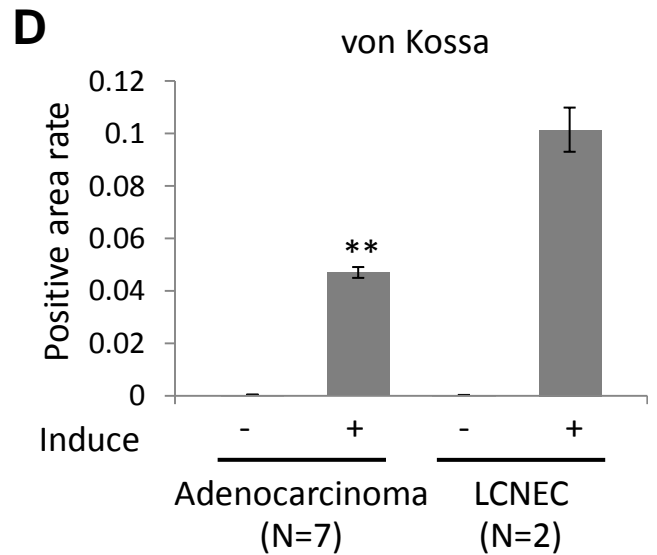
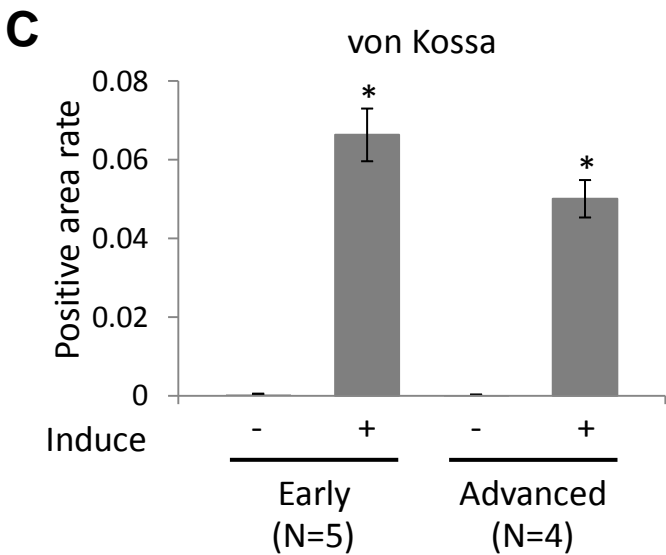
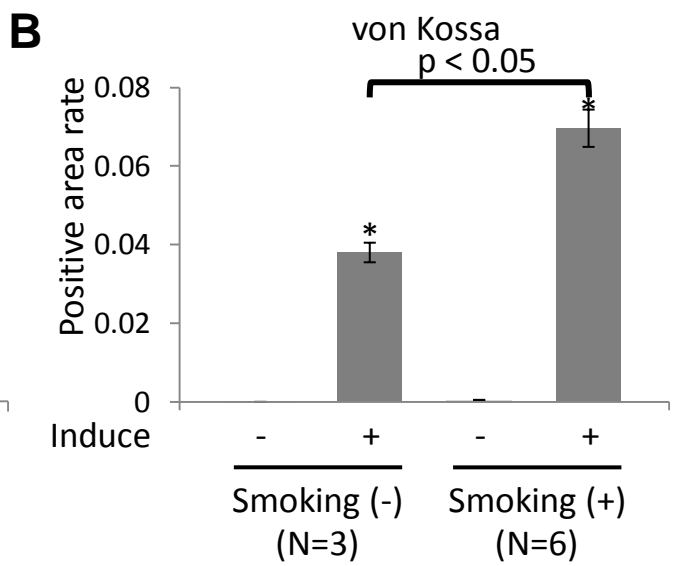
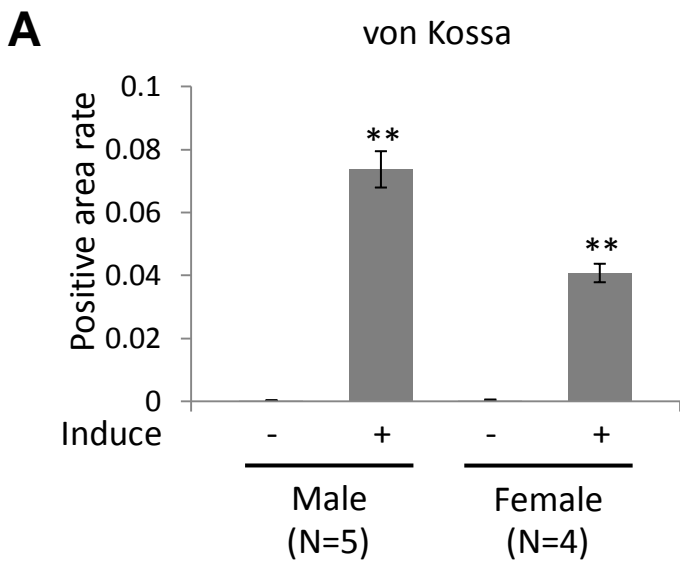
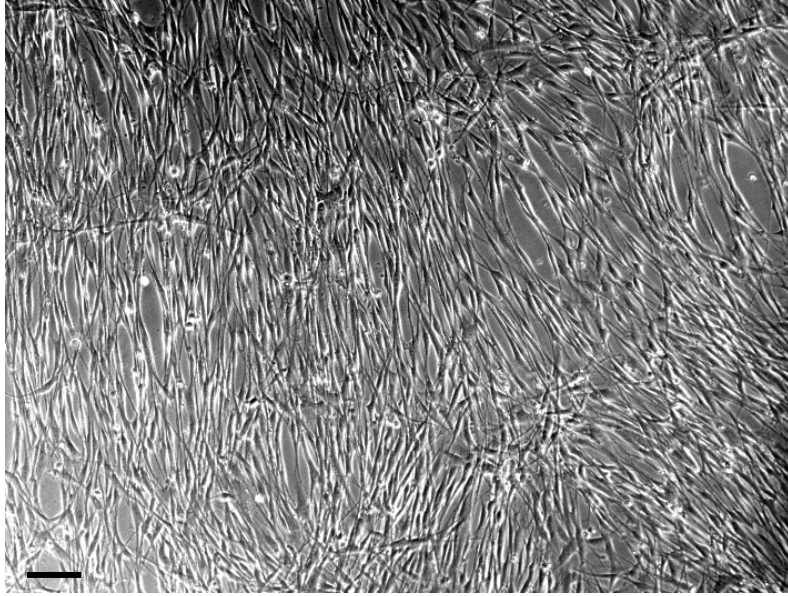


Figure 17. 単細胞由来CAFスクロンの各種遊走因子の発現



Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig2 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig2

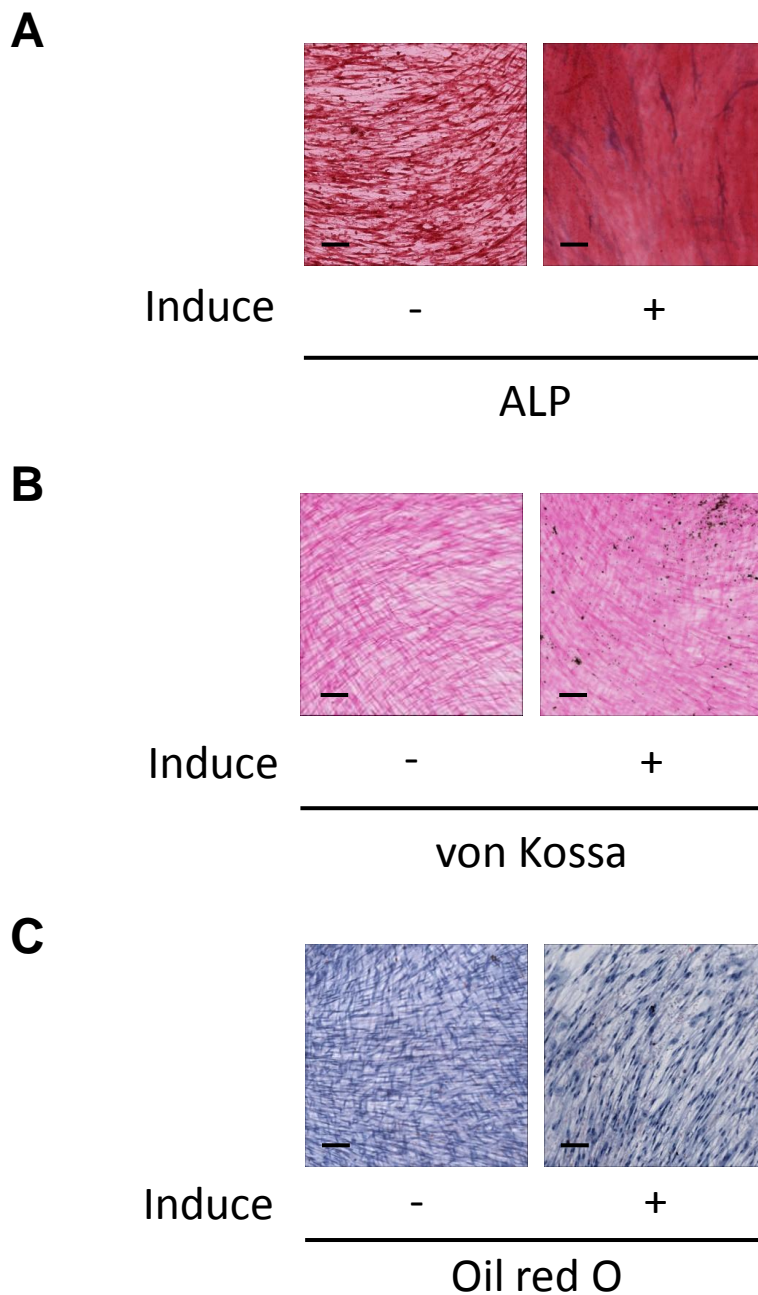
Figure 18. 臨床病理学的因子と骨分化能の相関



NCAFs

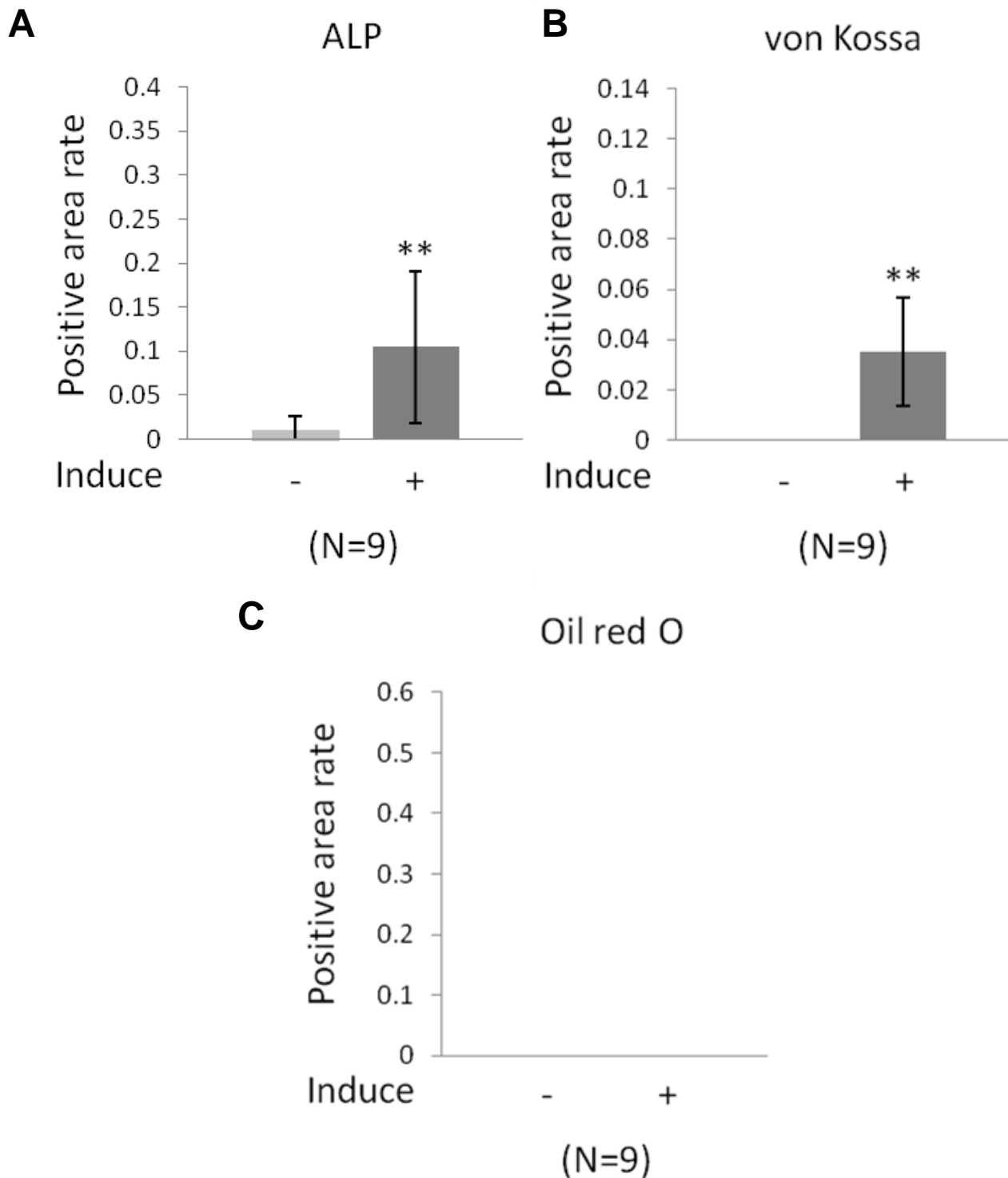
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig1 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM1

Supplemental figure 1. NCAFsの形態像

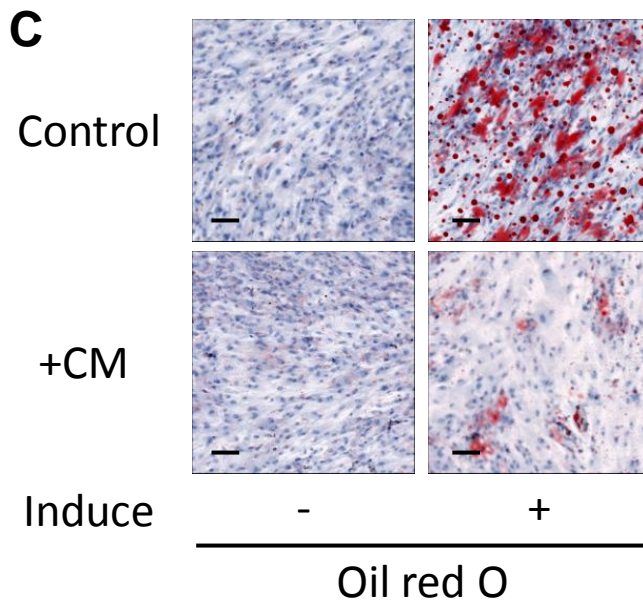
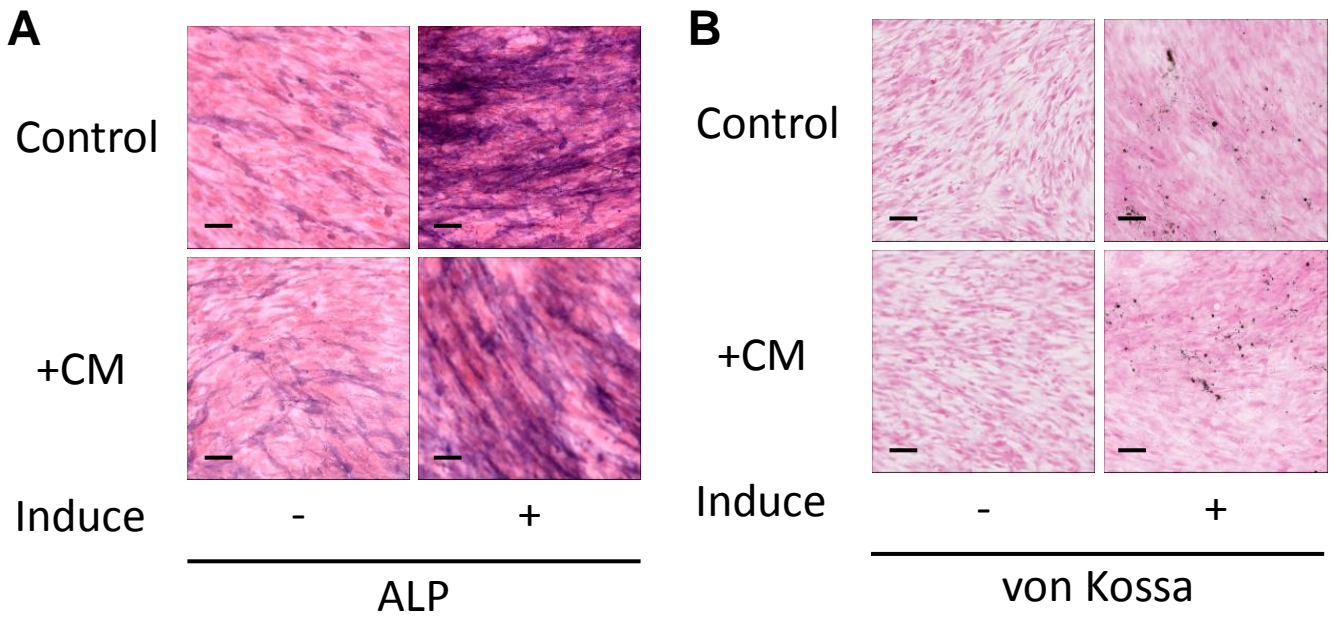


Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig5 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM5

Supplemental figure 2. 骨/脂肪分化誘導したNCAFsの染色像

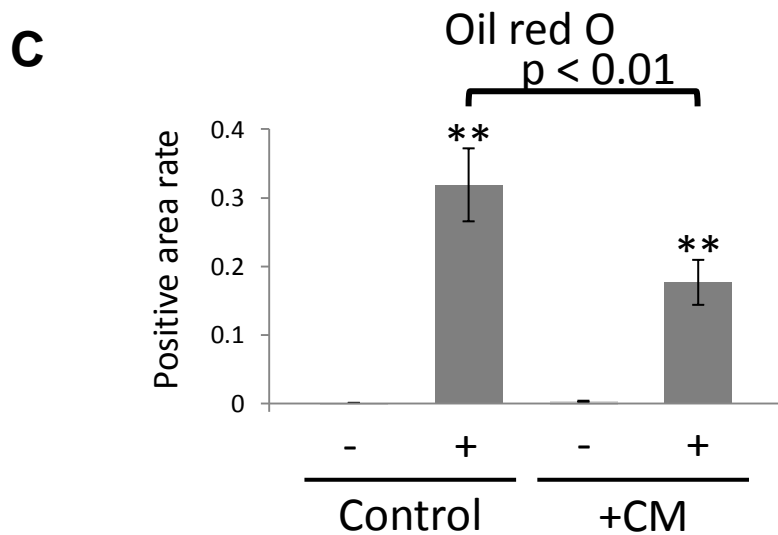
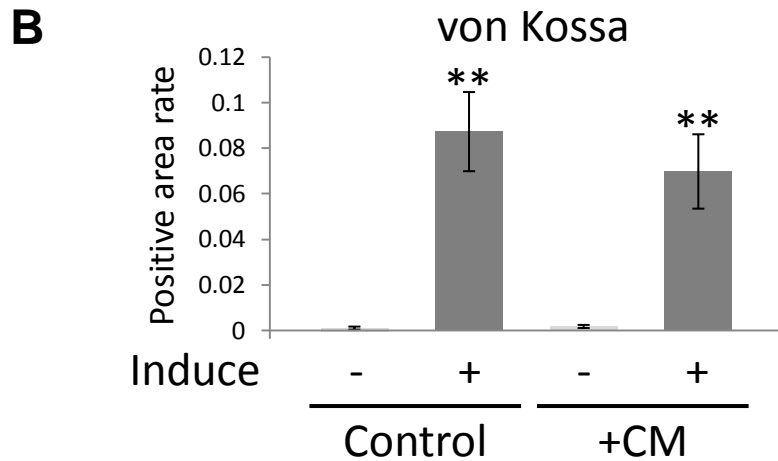
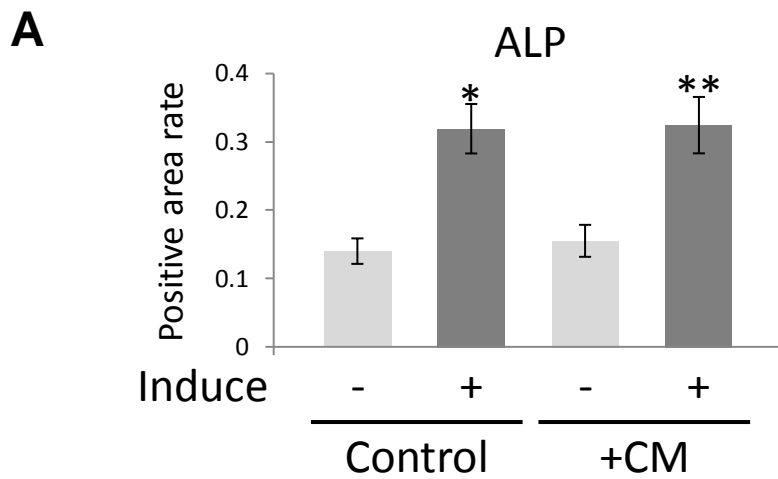


Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig5 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM5



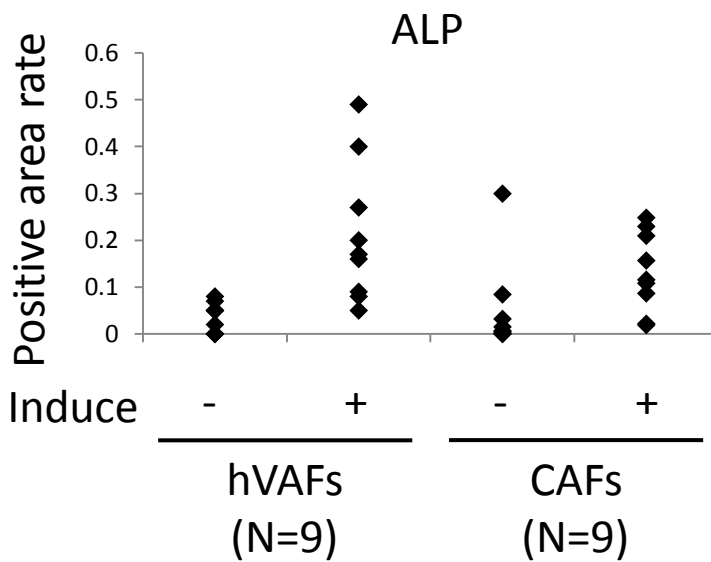
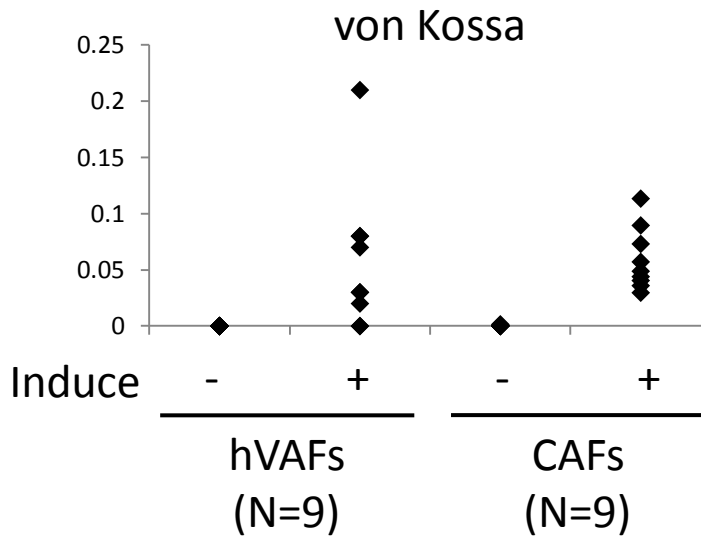
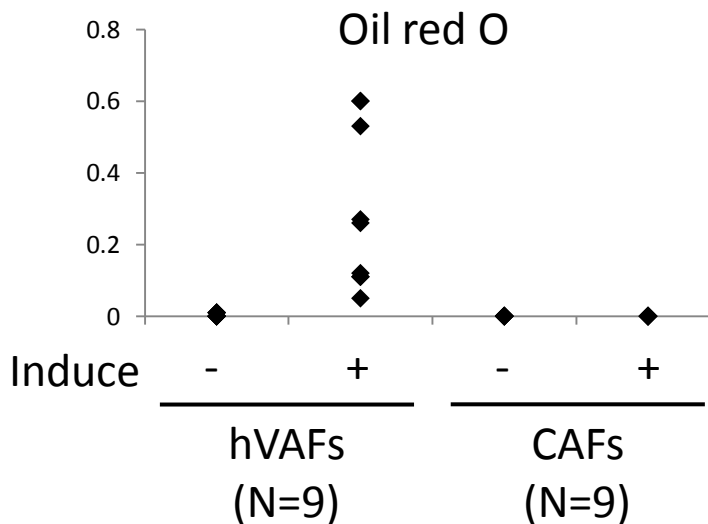
Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig3 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig3

Supplemental figure 4. A549の培養上清処理はhVAFsの脂肪を減退させる

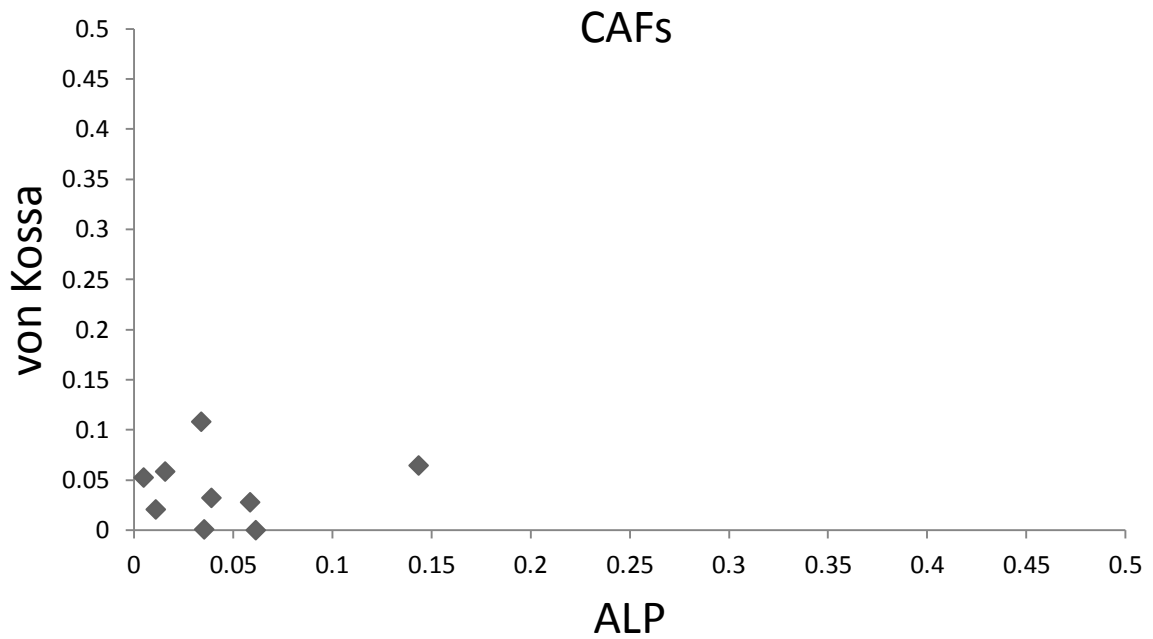
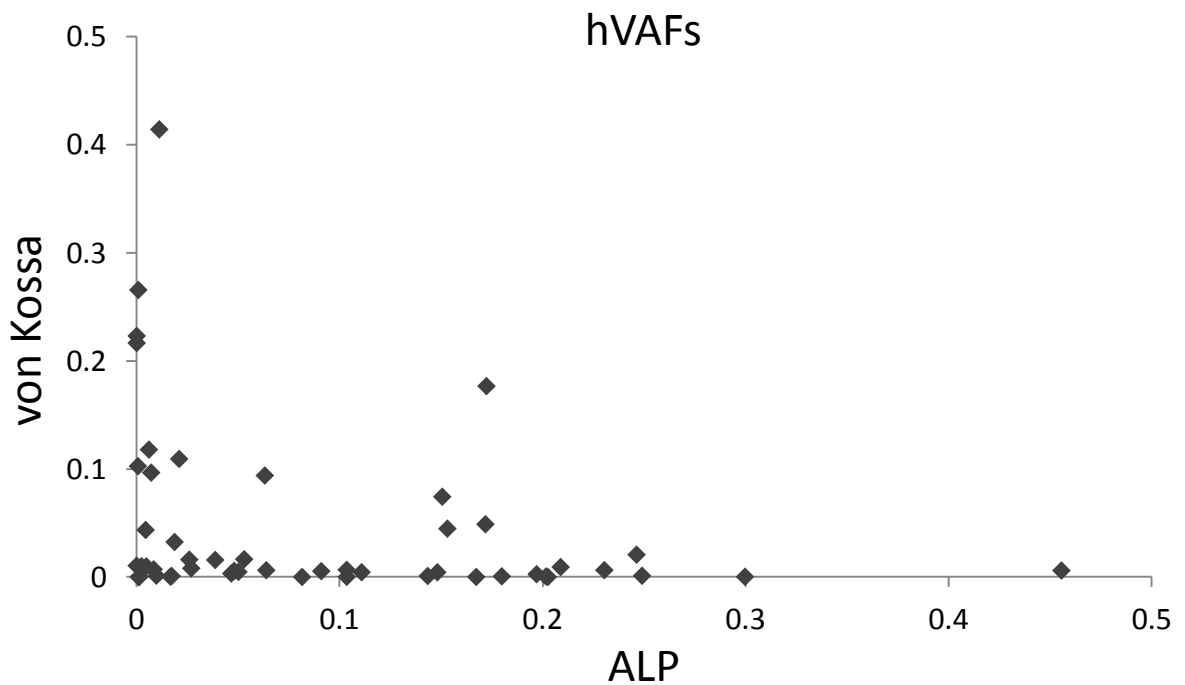


Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Fig3 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. Fig3

Supplemental figure 5. A549の培養上清処理はhVAFsの脂肪分化能を低下させる

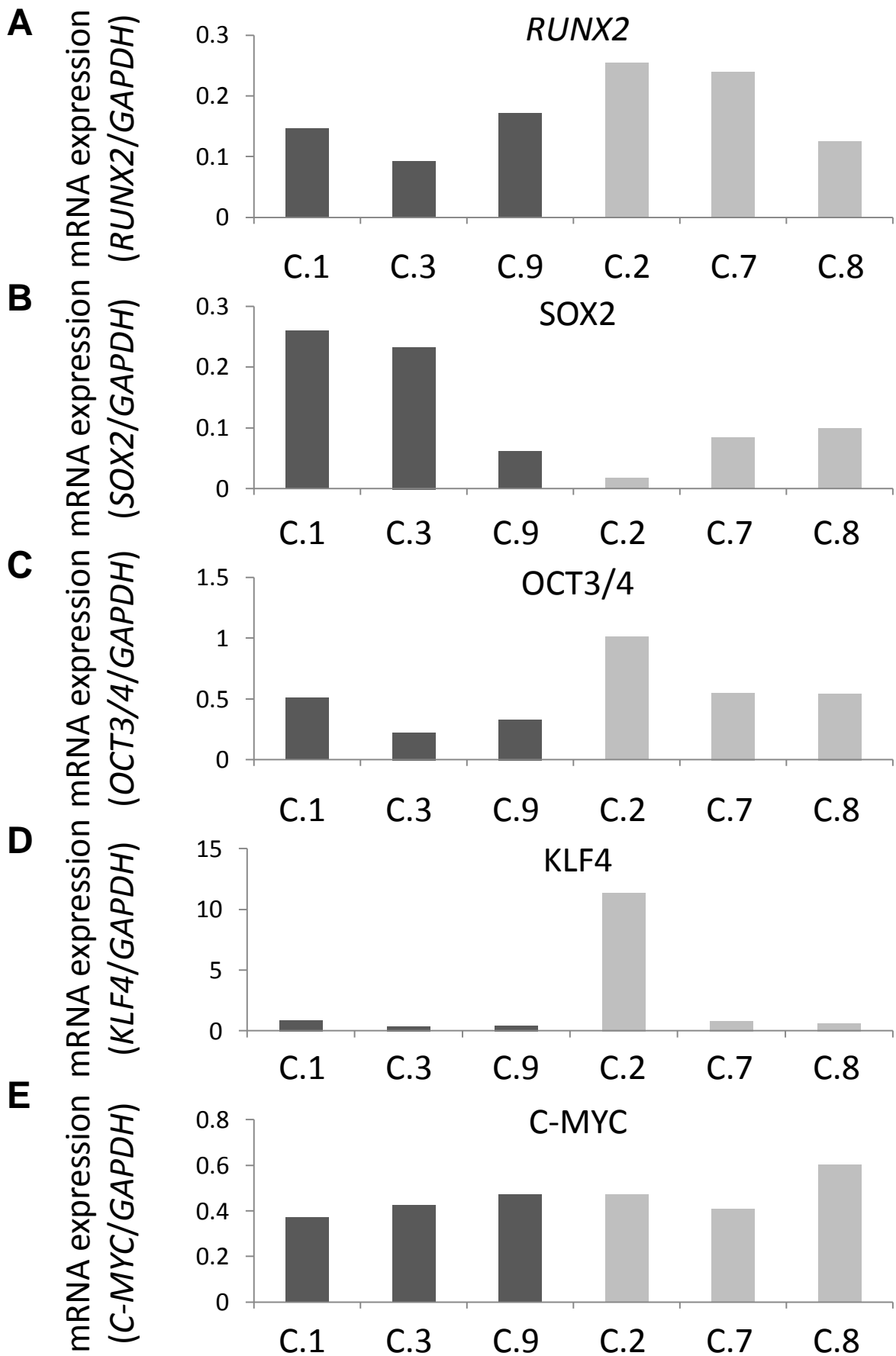
A**B****C**

Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig3 (Modified)
 doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM3

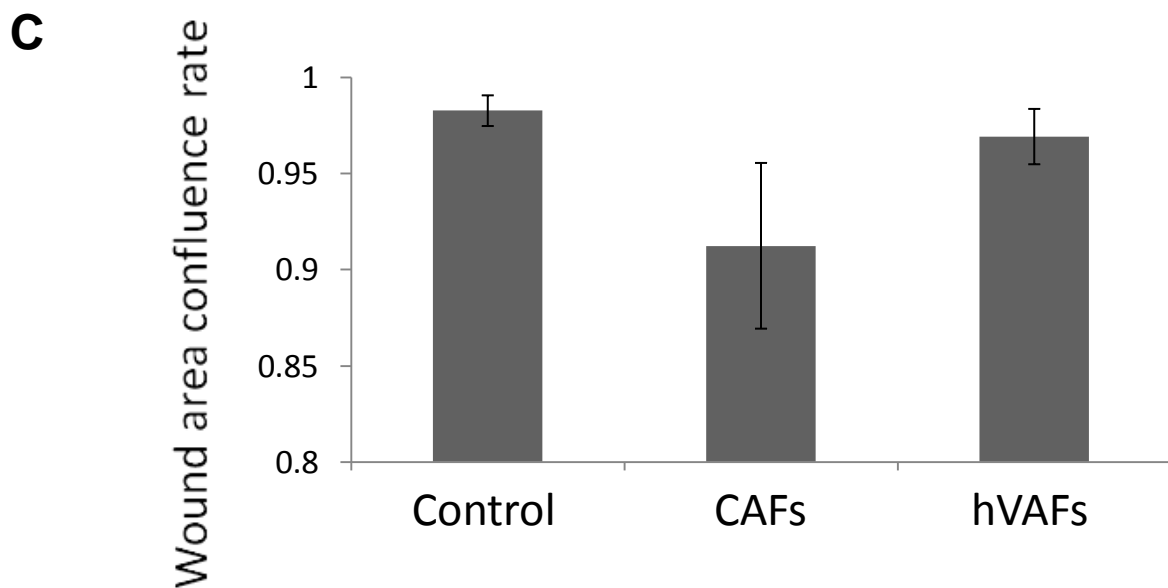
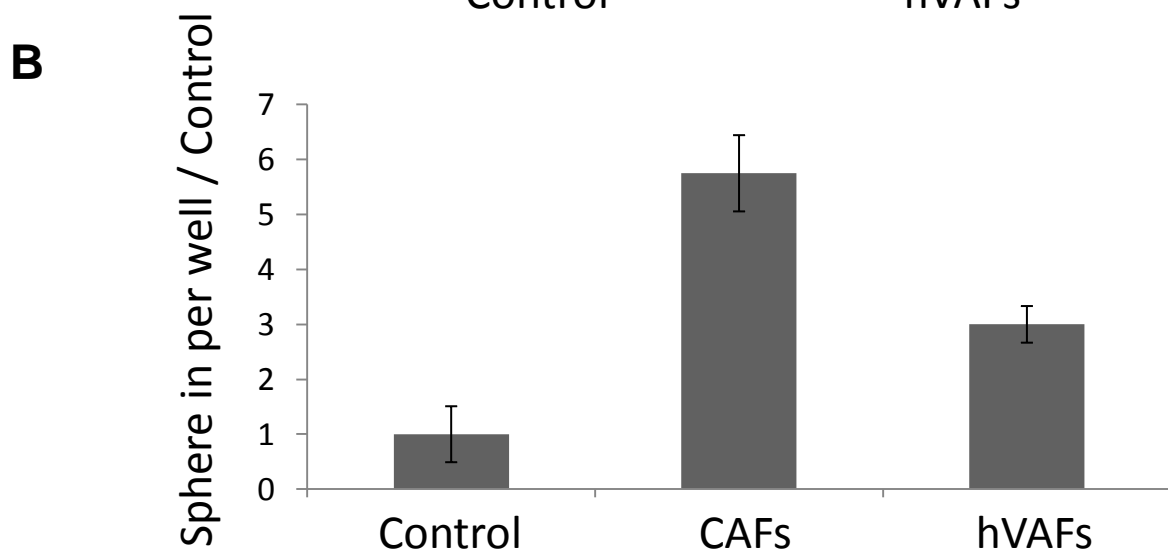
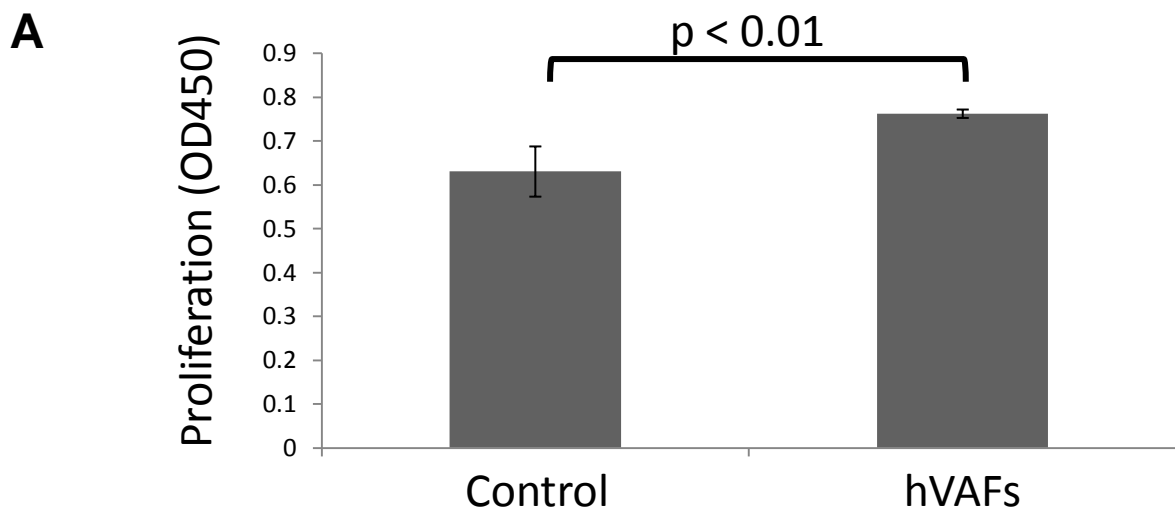
A**B**

Suda Y et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2016, SFig7 (Modified)
doi: 10.1007/s00432-016-2171-y. MOESM7

**Supplemental figure 7. CAFs/hVAFsのクローン毎の
ALP、von Kossa定量値**



Supplemental figure 8. CAFsクローンの骨分化制御因子と幹細胞マーカーの発現



Supplemental figure 9. CAFs/hVAFs初代培養株由来の培養上清によるA549の増殖能、幹細胞性、遊走能への影響