

論文の内容の要旨

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いるが(Cirri et al. 2012)、その機能は様々である。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(Karen et al. 2011; Ding et al. 2012)。しかし、これらの報告では、単細胞単位の解析はなされていない為、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。

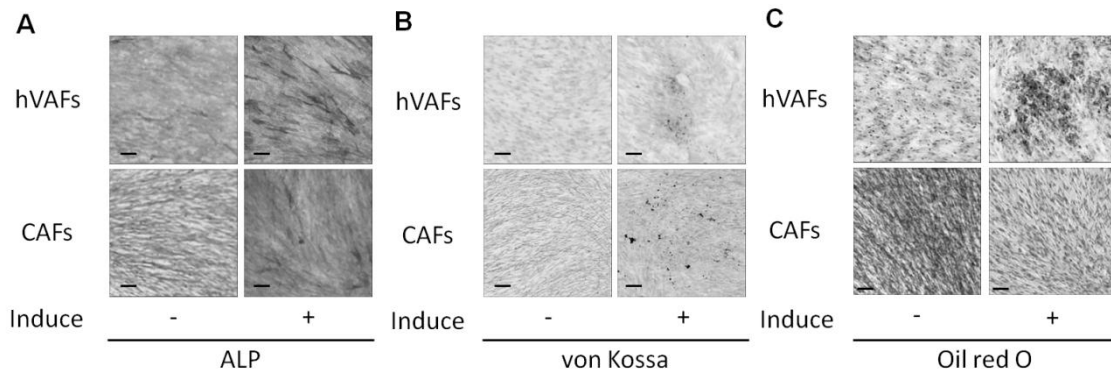


Fig.1 分化誘導を実施した線維芽細胞の染色像

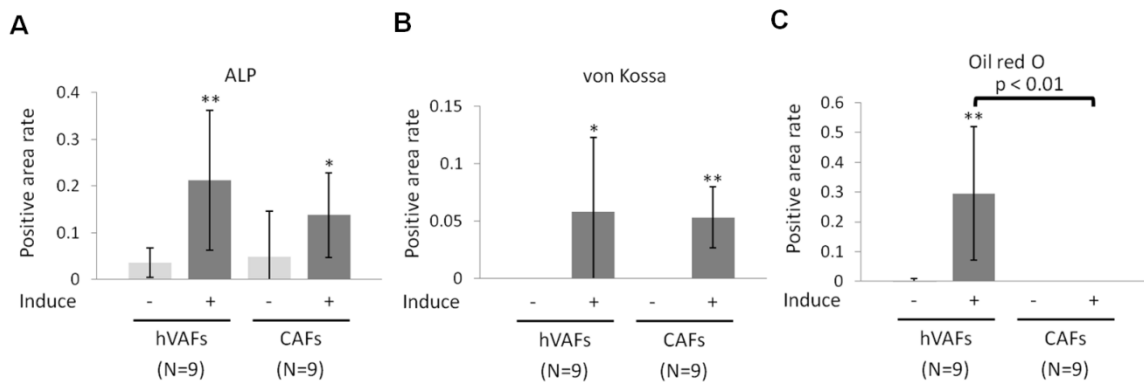


Fig.2 線維芽細胞の分化能の定量値 (非誘導群 vs. 誘導群 *: $P<0.05$ 、**: $P<0.01$)

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。

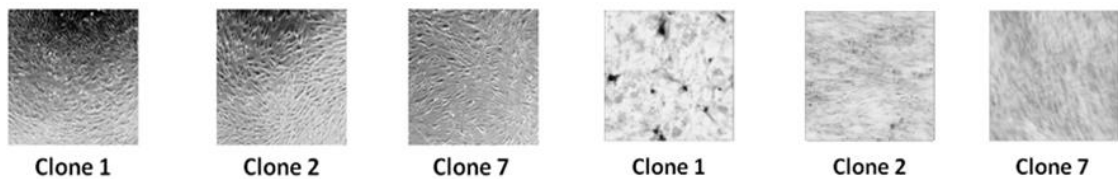
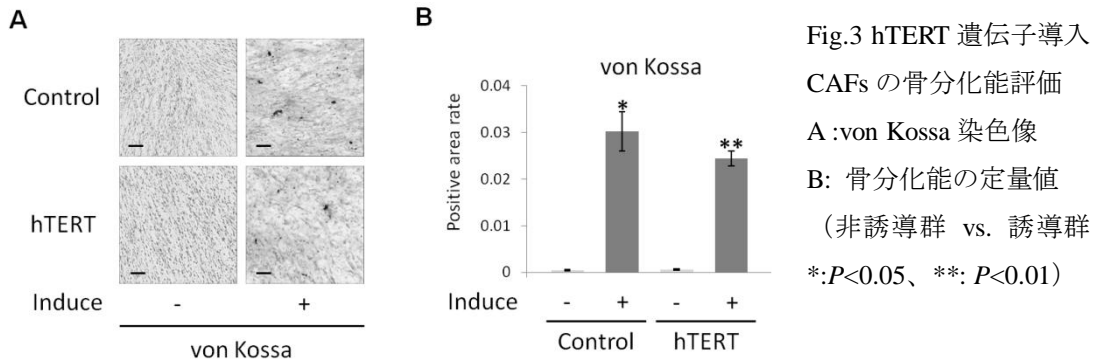
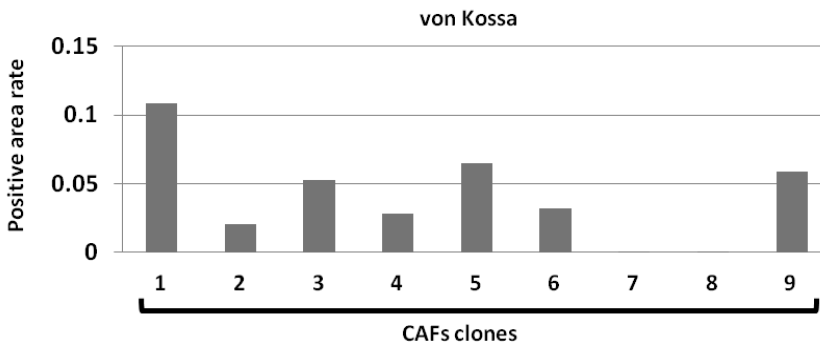


Fig.5 単細胞由来CAFクローンの von Kossa染色像



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。

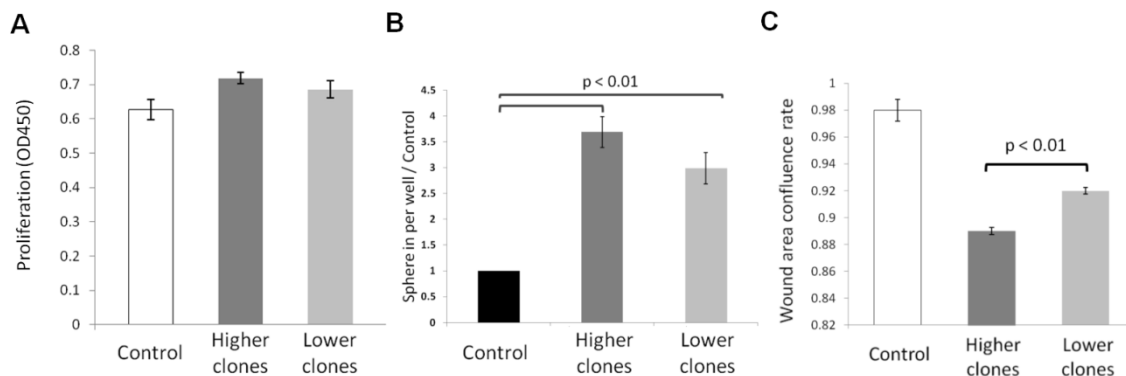


Fig.7 単細胞由来 CAFs クローンの培養上清によるがん細胞の表現型への影響の検討

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。