

## がん細胞からの刺激による線維芽細胞における炎症機構の解明

47116302 がん先端生命科学分野

阿部杏奈

指導教官

落合淳志

### [背景・目的]

がん組織は、がん細胞及び間質細胞(血管、線維芽細胞、免疫担当細胞)で構成される。がん間質細胞中で占める割合が最も高い線維芽細胞は、がん細胞の浸潤などを促進する一方、細胞外基質の産生により細胞の構造を支持する。がん組織における炎症反応はがん細胞と免疫細胞との相互作用として理解され、がん間質中で多くの割合を占める線維芽細胞との関与は不明である。がん性腹膜炎はがん組織における炎症反応として臨床的に重要である。がん性腹膜炎は胃がん、膵がん、卵巣がん患者に高頻度で認められ、症状の一つである腹水の貯留は、がん細胞と免疫細胞の相互作用により誘導された炎症性サイトカインによって引き起こされると考えられている。しかし、がん性腹膜炎における炎症反応に腹膜線維芽細胞の関与を示した研究は無い。がん性腹水中に高値で検出される転写制御因子 HMGB1 は、活性化した免疫細胞やがん細胞などから分泌され炎症と関連する事が報告されている。この HMGB1 の受容体として TLR や RAGE が報告され、TLR は主に免疫細胞に発現し、炎症性サイトカインを産生、分泌することで炎症反応を惹起する事が報告されている。

本研究の目的は、がん組織で認められる炎症反応、特にがん性腹膜炎の発生機序にヒト腹膜線維芽細胞が関与するかを明らかにすることである。

キーワード；がん組織、がん、線維芽細胞、炎症、HMGB1、TLR

### [方法]

*In vivo* で、腹膜播種巣を有する中分化胃がんの組織切片を免疫染色し、浸潤浅層部及び浸潤深層部におけるがん細胞内での HMGB1 の局在の変化を検討した。またがん細胞周囲のリンパ球及び線維芽細胞における NF- $\kappa$ B 核内移行とがん細胞における HMGB1 局在との相関関係も数値化した。*In vitro* において、ヒト初代腹膜由来線維芽細胞における TLR の発現を確認した。また、がん細胞株及びヒト初代腹膜由来線維芽細胞での HMGB1 の発現及びがん培養液中への分泌を検証した。最後に HMGB1 がヒト腹膜由来初代培養線維芽細胞において TLR を活性化し、炎症性サイトカインを誘導するか検討した。ヒト初代腹膜由来線維芽細胞を rHMGB1 及びがん細胞培養上清によって刺激した際、TLR の下流シグナルである IRAK4 のリン酸化、NF- $\kappa$ B 核内移行を確認した。また si-HMGB1 を HSC44PE に遺伝子導入して炎症性サイトカイン及び IRAK4 のリン酸化に与える影響を検討した。

### [結果・考察]

#### 1) がん細胞での HMGB1 局在と周囲リンパ球や線維芽細胞での NF- $\kappa$ B 局在の検討

がん細胞における HMGB1 の局在は、浸潤浅層部と比較して浸潤深層部において細胞質に認められた (図 1)。また、浸潤深層部でのがん細胞周囲に存在するリンパ球や線維芽細胞

で NF- $\kappa$ B 核内移行が認められた(図 2)。よって、がん細胞より放出された HMGB1 が周囲の細胞に炎症反応を惹起する可能性が示唆された。

## 2) rHMGB1 の刺激によるヒト初代腹膜由来線維芽細胞での炎症応答の検討

ヒト腹膜由来初代培養線維芽細胞において TLR が発現していた。この細胞を rHMGB1 で刺激すると IRAK4 のリン酸化、NF- $\kappa$ B 核内移行、炎症性サイトカイン誘導が認められた(図 3)。よって rHMGB1 は線維芽細胞に発現している TLR を介して、炎症反応を惹起する可能性が示唆された。

## 3) がん細胞株及び線維芽細胞での HMGB1 の発現と培養上清中への分泌を検討

初代培養線維芽細胞に比べてがん細胞株における HMGB1 発現量は高くなった。また、がん細胞株において HMGB1 分泌量が高い HSC44PE, DLD1 はがん性腹膜炎を起こす細胞株である。よってがん性腹膜炎における炎症反応に HMGB1 が関与している可能性がある。

## 4) がん細胞培養上清を線維芽細胞に添加した際の炎症応答の検討

がん細胞培養上清中への HMGB1 分泌量が高い群では、IRAK4 のリン酸化、NF- $\kappa$ B 核内移行、炎症性サイトカインの誘導が認められた(図 4)。よってがん培養上清中の HMGB1 が線維芽細胞に発現している TLR を介して炎症反応を惹起する可能性が示唆された。

## 5) siHMGB1 を遺伝子導入した HSC44PE 培養上清の刺激による線維芽細胞での炎症応答の検討

HMGB1 をノックダウンした HSC44PE 培養上清を添加すると、IRAK4 のリン酸化や IL6、IL8 のサイトカイン誘導が有意に抑制された(図 5)。HSC44PE 培養上清中で TLR を刺激するのは HMGB1 のみであり、IL1B、IL6、IL8 が完全に抑制できないことから HMGB1 以外の因子が炎症反応惹起に関与している可能性がある。

### [結論]

がん細胞から放出される HMGB1 が線維芽細胞に発現している TLR を介して炎症性サイトカインを誘導する機構を初めて明らかにした。

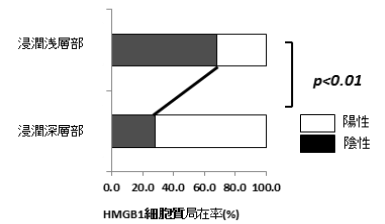


図1.胃がん浸潤浅層部及び浸潤深層部各視野における胃がん細胞内でのHMGB1細胞質局在

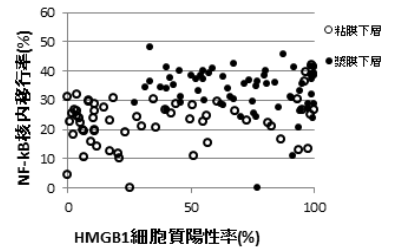


図2.がん細胞におけるHMGB1細胞質陽性率とリンパ球におけるNF- $\kappa$ B核内移行率の相関関係

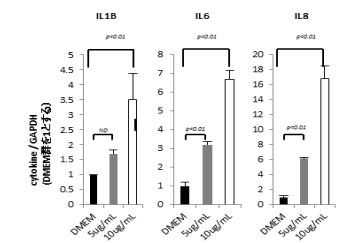


図3. rHMGB1の刺激によるヒト腹膜由来初代培養線維芽細胞での炎症性サイトカイン発現量への影響

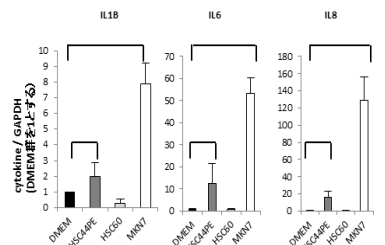


図4. がん細胞培養上清の刺激によるヒト腹膜由来初代培養線維芽細胞での炎症性サイトカイン発現量への影響

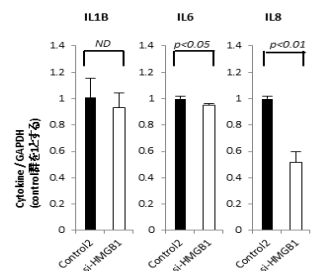


図5. si-HMGB1-HSC44PE培養上清の刺激によるヒト腹膜由来初代線維芽細胞での炎症性サイトカイン発現量への影響