

博士論文

論文題目 三次元共培養法を活用した肺上皮間葉相互作用の解明

氏名 堀江 真史

1 目次

1 目次	1
2 要旨	3
3 序文	4
モデル 1: ヒスタミンの気流制限における役割解明	8
モデル 2: 肺癌細胞との三次元共培養による CAF の機能解析	9
モデル 3: TGF- β リガンドを標的とする肺癌治療の検証	10
4 方法	13
4.1 細胞培養	13
4.2 肺線維芽細胞初代培養	14
4.3 細胞増殖アッセイ	15
4.4 ゲルコントラクションアッセイ	15
4.5 細胞内カルシウム濃度測定	16
4.6 三次元共培養	16
4.7 定量、及び半定量 RT-PCR	17
4.8 ウェスタンブロット	20

4.9	免疫細胞染色	21
4.10	miRNA 発現レンチウイルスベクターの構築	21
4.11	ELISA	25
4.12	免疫不全マウスへの肺癌異種移植	26
4.13	免疫蛍光染色	26
4.14	コラーゲンアッセイ	27
4.15	統計解析	27
5	結果	28
	モデル 1	28
	モデル 2	31
	モデル 3	34
6	考察	40
7	謝辞	46
8	参考文献	47

2 要旨

上皮-間葉相互作用は肺の発生のみならず様々な呼吸器疾患の病態において重要な役割を果たす。三次元共培養法は*in vivo*に近い環境を再現することができ、細胞間や細胞-マトリックス間の相互作用の理解に役立つ。今回三次元培養法を活用することにより、(1) 気管支喘息患者の特徴である気流制限におけるヒスタミンと肺線維芽細胞の役割の解明、(2) 肺癌組織における癌間質線維芽細胞の役割の解明、(3) TGF- β リガンドを標的とするマイクロRNA発現レンチウイルスベクターを用いたTGF- β シグナル阻害の治療の有用性、の3点を示すことができた。このように様々な疾患のモデルにおいて三次元共培養法は有用であり、肺上皮間葉相互作用の解明に寄与する。

3 序文

肺は内胚葉由来の上皮細胞から成り、気道や肺胞の表面を構成する。上皮を取り囲むように線維芽細胞、平滑筋などの間葉系細胞や内皮細胞が存在する。胎生期の肺の発生過程は気管・肺胞上皮の組織学的変化に基づいて5つの期間に分けられている。肺の発生の過程の概要をFig. 1Aにしめす。ヒトの肺では肺芽期（ヒト胎生26日～6週）、腺様期（ヒト胎生6～16週）、管状期（ヒト胎生16～28週）、嚢状期（ヒト胎生26～36週）、肺胞期（ヒト胎生36週以降）に分類される。近年マウスの肺の研究により肺の発生の過程とその複雑なシグナリングへの理解が進んでいる[1]。原腸陥入後に胚性内胚葉が形成され、胎生7.5日には周囲の中胚葉からの様々な傍分泌シグナルによって前後軸のパターンが決まる[1-3]。これらに応じて近位内胚葉では *Foxa2* (forkhead box protein A2) などの転写因子が発現する。また腹側の間葉からの *Wnt* や *BMP* (bone morphogenetic protein) シグナリングは背腹軸の形成に重要な役割を果たす[4-6]。一方心臓中胚葉からの *FGF2* (fibroblast growth factor 2) シグナリングが前腸内胚葉を組織特異的にパターンづけ、高濃度の *FGF2* は肺や甲状腺へ誘導し、低濃度は肝臓へ誘導する。胎生8.5～9.0日には腹側内胚葉は予定気管-肺領域となり *Nkx2-1* の発現を誘導する[7]。胎生9.5日になると肺芽が萌出する。胎生10.5日以降になると肺芽は伸長、および分枝を繰り返すとともにその周囲に血管網が発達し *branching morphogenesis* が始まる。その際に間葉由来の *FGF10* シグナリングは肺芽

の成長を促すが、逆に RA (retinoic acid)-TGF- β (transforming growth factor- β) シグナリングより制御される[3]。胎生 12.5 日までに 5 葉形成され、胎生 17.0 日までに respiratory tree を形成する。このように発生の段階において、上皮と間葉は常に相互的な複雑なシグナルを伝達しあっており、肺の発生・分化・形態形成の誘導において重要な役割を果たす

呼吸器は外界に開いた系であり、ウイルス・細菌などの微生物、アレルゲン、たばこ煙、大気汚染物質などの外来性因子と常に接していることが、種々の呼吸器疾患の病態において重要である。例えば呼吸器領域における炎症性疾患の代表である気管支喘息は慢性の気道の疾患で、生活の質を低下させ時に死に至ることもある。気管支喘息の有病率は世界中で増え続けており、およそ 3 億人の患者がいると推定されている[8-10]。ダニ・カビ・花粉などのアレルゲンや大気汚染物質に曝露を受けアレルギー反応が起きると、気道閉塞症状が生じ気管支喘息へと至る。

また肺癌は癌による死亡のうち部位別で最多で、全世界で年間約 137 万人が死亡しており、世界において癌関連死の中では男女ともに一番の原因である[11]。上皮細胞がタバコなどの発がん物質への曝露を受けると、直接的に DNA を障害して癌化の契機となるイニシエーターとして働く一方で、損傷した DNA を持った細胞を増殖させるプ

ロモーターとしての働き、肺癌などの発癌に至る。このように気道上皮細胞は、物理的バリアとして機能するだけでなく、外界からの刺激に反応し、多様な細胞応答を引き起こす。

これらの病態においては、上皮細胞だけではなく間葉系の構成細胞も非常に重要な役割を果たす (Fig. 1B)。気管支喘息においては吸入ステロイドなどの治療にもかかわらず治療抵抗性を示すことがあり、気道リモデリングと呼ばれる非可逆的な気流制限と気道の構造変化が認められる[12]。気道リモデリングは気道平滑筋の増生、活性化した線維芽細胞など、間葉系細胞における状態変化で特徴づけられる[13]。気道上皮細胞は線維芽細胞や気道平滑筋細胞などの間葉系細胞と成長因子やサイトカイン・ケモカインなどを通じて密接な相互作用を持ち“epithelial-mesenchymal trophic unit”が形成され、気道リモデリングに深く関与している[14]。

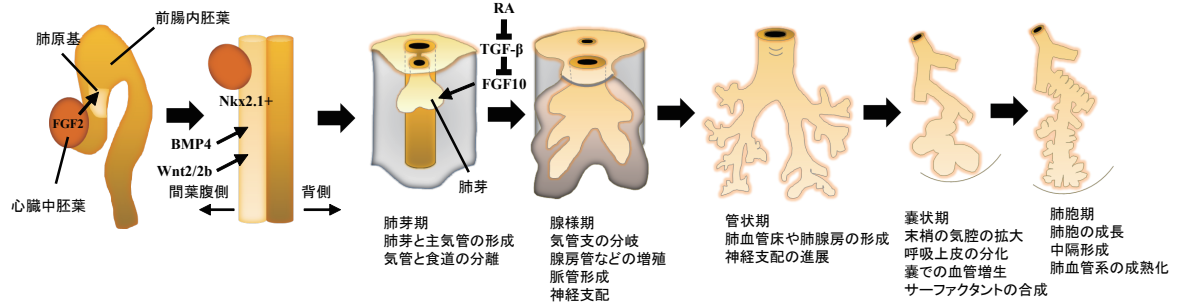
また肺癌においては EGFR チロシンキナーゼ阻害薬など分子標的治療薬の普及も目覚ましいものの二次的遺伝子変異など薬剤耐性の課題も顕在化し、新たな治療戦略の構築が迫られている[15]。肺癌細胞は単独での生存は困難で、癌間質からの増殖シグナルや、腫瘍血管からの酸素・栄養の供給がなければ、癌組織を構築して個体の

生命を脅かすことはない[16]。この背景から近年は癌間質を標的とした治療の可能性が注目されている[17-19]。癌間質において線維芽細胞は主な構成成分であり、CAF (Cancer-associated fibroblasts: 癌間質線維芽細胞) と呼ばれ、癌細胞の周囲に存在する活性化された CAF は成長因子やケモカインなどにより細胞間の相互作用や細胞外基質の修飾を誘導し癌の進行を促進する。癌の微小環境は癌細胞と間質細胞のクロストークを通じて癌の発生と進展に重要な役割を果たす[20, 21]。

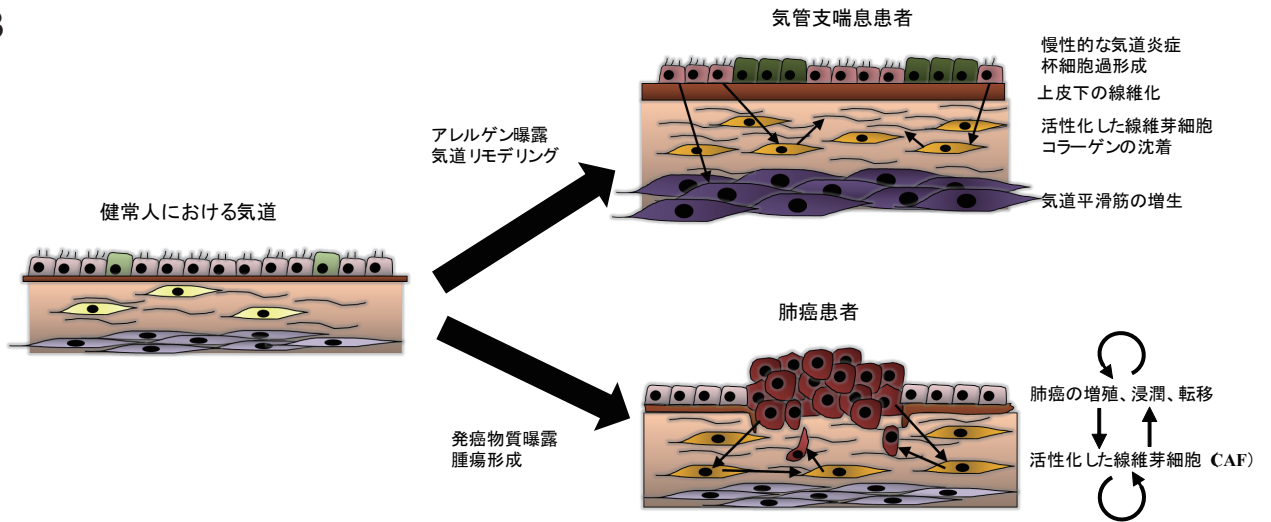
このように呼吸器疾患では発生・分化の過程で見られたような上皮-間葉の相互作用が各々の疾患にて重要な役割を果たしており、これらの相互作用を再現できる簡便な実験系の樹立が疾患の病態解明や治療への応用において必要である。二次元培養は *in vitro* の研究で広く行われているが、細胞-細胞間や細胞-細胞外マトリックス間の相互作用はその単純な状況において失われてしまっている。三次元コラーゲン培養法は、1970年代に生体における肺線維芽細胞の役割を検討するために Elsdale らによって開発され[22]、細胞-細胞間の相互作用の分子的メカニズムの解明に有用であり、さらに上皮細胞との共培養を行うことにより上皮-間葉間の相互作用を検討することができる[23-25]。本論文は三次元培養を次の3つのモデルに活用した (Fig. 1C)。

Figure 1

A

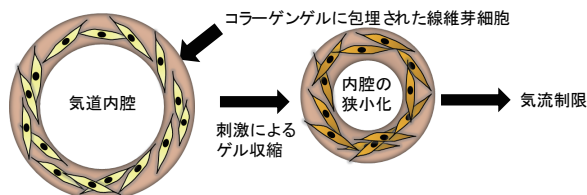


B

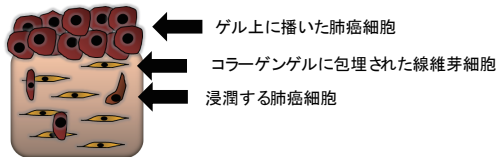


C

モデル1 肺線維芽細胞の三次元培養による気管支喘息患者における気道の再現



モデル2 肺癌細胞と肺癌間質線維芽細胞の三次元共培養による癌-間質相互作用の再現



モデル3 三次元共培養法によるTGF-βリガンドをターゲットとした治療の検証

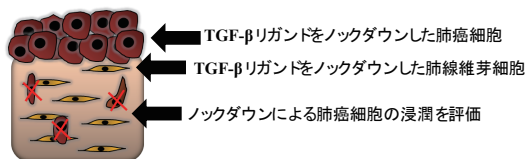


Fig. 1

A: 肺の発生の過程. B: 肺癌, 及び気管支喘息の病態における上皮-間葉の相互作用.

C: 本論文の実験の概要.

モデル 1: ヒスタミンの気流制限における役割解明

ヒスタミンはアレルギー性炎症の原因となるメディエーターでマスト細胞や好塩基球から放出され、4種類のGPCR (G protein-coupled receptor: G蛋白共役受容体)であるヒスタミンH1、H2、H3、H4受容体に結合する。なかでもヒスタミンH1受容体拮抗薬はアレルギー性鼻炎や蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などのアトピー性疾患合併の気管支喘息のマネージメントで広く使用されている。最近のレビューではヒスタミンH1受容体拮抗薬はアレルギー性鼻炎合併気管支喘息患者の症状緩和に有効とされているが[26]、一方でGINA (Global Initiative for Asthma)ガイドラインでは抗ヒスタミン薬は喘息治療の第一選択とはなっていない[9]。このように抗ヒスタミン薬の評価は定まっていない。したがって抗ヒスタミン薬の気流制限への影響を解明することにより気管支喘息治療における役割の解明につながると考えられる。

前述の様にステロイド治療抵抗性の難治性喘息では非可逆的な気流制限が病態生理に関与している。マスト細胞は肺線維芽細胞の活性化に関与していることが知られており [27]、ヒスタミンは気道リモデリングに関与しているとされる[28]。ヒスタミンの気道平滑筋への効果を検討した報告は多いが、肺線維芽細胞へのヒスタミンの効果を検討した報告は少ない[29, 30]。近年ヒスタミンは肺線維芽細胞の遊走を誘導することが報告され[29]、線維芽細胞が気管支喘息患者においてヒスタミンにより気道へリクル

ートされていることが示唆された。本論文では肺線維芽細胞の三次元コラーゲン培養法を行うことにより、ヒスタミンの肺線維芽細胞の収縮への影響、抗ヒスタミン薬の効果などを評価し、ヒスタミンの気流制限における肺線維芽細胞の役割の解明を試みた。

モデル 2: 肺癌細胞との三次元共培養による CAF の機能解析

肺癌において分子標的薬の発見、臨床応用への目覚ましい進歩にもかかわらず、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬やALK阻害薬は長期間効果を得ることは難しく、新しい治療法の出現が期待されている[31, 32]。近年では前述のように癌の微小環境が注目されている。癌の形態は線維形成と呼ばれる間質の反応と細胞外のマトリックスの沈着と関連しており、主にCAFによって制御されている[18]。癌の組織のリモデリングは癌の播種や薬剤到達の障害となる静水圧の上昇に寄与する[33]。CAFの由来はもともと存在する線維芽細胞[34]、上皮細胞がEMT (epithelial-mesenchymal transition: 上皮間葉転換) を起こしたもの[35]、骨髄由来細胞[36]、内皮細胞[37]などが考えられている。正常部位の線維芽細胞 (normal fibroblast: NF) とCAFとは異なった遺伝子発現をしているとされているものの[38-42]、上述のようにCAFはheterogeneousな集団であり、まだよくわかっていない面が多く、CAFの機能をより解明することが必要である[43, 44]。

これまで二次元培養で CAF と NF のフェノタイプの違いは示されており[45, 46]、また気道上皮初代細胞と肺癌患者由来の CAF、または正常胎児肺線維芽細胞株 (IMR-90) と三次元培養をおこなった報告では、CAF が気道上皮細胞のフェノタイプを変化させたとされている[47]。しかしこれまで肺癌細胞と同一患者由来の CAF または NF と三次元共培養し、その差異を検討した報告はない。本論文では 3 例の同一患者由来の CAF と NF の初代培養を樹立した。細胞形態、増殖能、収縮能を比較し、肺癌細胞株の A549 細胞との三次元共培養モデルにて上皮-間葉の相互作用を検討し CAF の機能解析を行った。

モデル 3: TGF- β リガンドを標的とする肺癌治療の検証

癌-間質の相互作用は前述の様に癌の進展などにおいて重要な役割を果たすが、それらに関与する可溶性因子の中でも TGF- β が重要である。前癌状態では TGF- β は上皮細胞の増殖の抑制やアポトーシスの誘導により癌に対し抑制的に働く。しかし後期になると上皮細胞は TGF- β に対し不応答になり、高濃度の TGF- β を産生するようになり、血管新生、免疫回避や線維芽細胞の活性化、細胞外マトリックスの蓄積などに寄与する[48-50]。さらに TGF- β は EMT を通じて癌細胞の遊走や浸潤能を増強する[51]。TGF- β の濃度は肺癌患者の血清中や組織で上昇していることや、予後との相関関係などが報告されており、肺癌治療のターゲットとなりうる[52-55]。

RNAi (RNA interference: RNA干渉) はmRNAに相補的に作用し、遺伝子発現の阻害をする。RNAiを誘導するものとして、合成二重鎖RNAであるsiRNA (small interfering RNAs) やPol III (RNAポリメラーゼIII) により転写されるshRNA (small hairpin RNA)、Pol II (RNA polymerase II) で転写される内因性または人工的なmiRNA (micro RNA) などがある[56, 57]。siRNAは簡便ではあるものの効果は一過性であり、一方でshRNAベクターはPol IIIプロモーターを必要とし、たくさんの配列のスクリーニングを必要とする。またインターフェロン効果と呼ばれる非特異的な阻害効果を誘導する。これらを克服するためにPol IIプロモーターを使用した合成miRNAを発現するベクターが開発された[58]。内因性のmiRNAの配列を特定の遺伝子をターゲットとするmiRNAに置き換えることにより作成し、遺伝子サイレンシングに有用なツールとされる。遺伝子を細胞の中に運ぶウイルスベクターの中で、HIVウイルス由来のレンチウイルスベクターは分裂細胞、非分裂細胞と問わず高い効果、細胞特異性、安定した発現を誘導するためRNAiの領域において有用である[59, 60]。

TGF- β を標的とした治療については、肺癌細胞のみならず癌間質細胞への影響も考慮する必要がある。そこで本論文ではレンチウイルスベクターを用いて合成miRNAの発現系を構築し、肺癌細胞および肺線維芽細胞においてTGF- β 1とTGF- β 2を効率的・

選択的にノックダウンすることを試みた。さらにこの実験系を用いてTGF- β 抑制による細胞応答の変化を調べ、さらに三次元共培養を活用して[61]、肺癌治療においてTGF- β シグナルを阻害する戦略の有効性を検証した。

4 方法

4.1 細胞培養

ヒト胎児肺線維芽細胞のHFL-1、WI-38、IMR-90、ヒト肺癌由来のA549細胞、American Type Culture Collection Cells (ATCC; Manassas, VA)から入手した。HFL-1、WI-38、IMR-90はセルカルチャー100ミリデッシュ (FALCON; Becton-Dickinson Lab-ware, Lincoln Park, NJ) 上でDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO, Paisley, PA) 培地に10% (vol/vol) の非働化済ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS, GIBCO) と1% のペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO) を加え37°C、5% CO₂にて培養した。293FT細胞はInvitrogen (Carlsbad, CA) から入手し、100ミリ型コラーゲンコートデッシュ (IWAKI, 東京) にてDMEMに10%のFBSと1%のペニシリン-ストレプトマイシンと1mMのピルビン酸ナトリウム (GIBCO) を加えて培養した。ヒスタミン、抗H1、H2、H3、H4受容体アンタゴニストであるdiphenhydramine、ranitidine、clobenpropitand、JNJ7777120はSigma (St. Louis, MO) から入手し、これまでの報告より各々10⁻⁴ M、10⁻⁶ M、10⁻⁷ M、10⁻⁵ Mの濃度で使用した[29]。IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) 受容体拮抗薬である2-amino-ethoxydiphenyl borate (2-APB) とPKC (protein kinase C: プロテインキナーゼC) 阻害薬であるbisindolylmaleimideはMerck (Darmstadt, Germany) から購入し、過去の文献を参考に各々7.5×10⁻⁵ M、10⁻⁷ Mの濃度で使用した[62, 63]。

4.2 肺線維芽細胞初代培養

東京大学医学部附属病院にて手術を受けた 3 例の非小細胞肺癌患者から肺癌組織、および正常肺組織を得た。本研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会委員長に承認された(倫理個別番号 3207)。すべての症例から書面にてインフォームドコンセントを得た。肺癌組織と腫瘍から一番遠い正常肺から組織を取得し、小さく切り刻んで細かくし細胞培養デッシュ上で DMEM+10%FBS で培養し、outgrowth 法にて各々 CAF と NF を得た。#4 では CAF は得られず、NF のみモデル 1 に使用した。臨床的特徴を Table 1 に示す。細胞は 3-7 継代で使用した。

Table 1. 患者背景

Case	Age	Gender	Pack-year	Staging	Pathology	Resection	Comorbidities
#1	67	Male	150	T1aN0M0 stage IA	Moderately differentiated SCC	LLL	IP
#2	82	Female	0	T1bN0M0 stage IA	ADN mixed subtype papillary, non-mucinous BAC > acinar	RLL	-
#3	75	Male	62.5	T2bN0M0 stage IIA	ADN mixed subtype non-mucinous BAC, acinar > papillary > solid	LLL	COPD, IP
#4	82	Male	30	T2aN0M0 stage IB	SCC with ADN component	RLL	COPD

SCC : squamous cell carcinoma、ADN : adenocarcinoma、BAC : Bronchioloalveolar cancer、LLL : left lower lobe、RLL : right lower lobe、IP : interstitial pneumonia、COPD : chronic obstructive pulmonary disease。

4.3 細胞増殖アッセイ

線維芽細胞はセルカルチャー6ウェルプレート(FALCON)に 4×10^4 個ずつ、A549細胞は 1×10^4 個ずつ細胞を播きDMEM+10% FBSにて培養した。細胞数は血球計算板を使用し、1日後、3日後、5日後に細胞数をカウントした。

4.4 ゲルコントラクションアッセイ

1.5 mg/mlに調整したI型コラーゲン(Cell matrix type IA;新田ゼラチン、大阪)・蒸留水・4×DMEMの混合液内に肺線維芽細胞を 3×10^5 cells/mlの濃度で調整し、0.5mlの懸濁液をセルカルチャー24ウェルプレート(FALCON)に播き、37度で30分かけて重合させた。プレートからコラーゲンゲルを剥がした後60ミリペトリデッシュ(FALCON)に移し5mlのDMEMを加え無血清状態にて培養した[64]。ゲルの表面面積を3日間測定しゲルの収縮力を評価した。ゲルのサイズの測定はImage analysis system (Densitograph、version 3.00; ATTO、東京)を使用した。

4.5 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) はfura-2蛍光法にて測定した[65]。Fura-2 acetoxymethylester (fura-2 AM) は同仁化学(熊本)から入手した。標準細胞外液であるTyrode液(NaCl 136.5mM、KCl 5.4mM、CaCl₂ 1.8mM、MgCl₂ 0.53mM、glucose 5.5mM、N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane sulfonic acid (HEPES)-NaOH buffer (pH 7.40))を使用し、Ca²⁺ free溶液はTyrode液からCaCl₂を除いた溶液に0.5 mMのEGTAを加えた。またカルシウムチャネルのブロックには1μMのニカルジピン塩酸塩(Sigma)を使用した。細胞をトリプシン(GIBCO)で剥離・洗浄し10⁶個/mlの濃度でTyrode液などで調整しfura-2 AMを加え30分間37 °Cで培養した。Diphenhydramine (10⁻⁴M)と2-APB (75×10⁻⁶M)は測定の30分前に加えた。Ca²⁺ fura-2 の蛍光はCAF-110(日本分光社)にて測定した。励起波長は340nmと380nmで、emissionは500nmで測定した。蛍光強度比 (F340/ F380)を細胞内カルシウム濃度として計算した。

4.6 三次元共培養

三次元共培養はこれまでの報告を参考に行った[66, 67]。5×10⁵個の肺線維芽細胞の細胞懸濁液を0.5mlのFBSに懸濁し、2.3mlのI型コラーゲン、670 μlの5×DMEM、330 μlの再構築液(新田ゼラチン)混合液を作製し、3mlをセルカルチャー6穴プレートに入

れ、37度30分間培養し重合させた。共培養としてゲル上層に 2×10^5 個の細胞を播き、DMEM+10% FBSで培養した。一晚培養した後、ゲルをプレートの壁から剥がし5日間培養しゲルの面積を5日間測定した。引き続き浮遊培養を行う場合はそのまま5日間培養した。ALI (air liquid interface)を行う場合は、6穴プレートの中に100 μ mのセルストレイナー (FALCON)を逆向きにしたものを設置しその上にゲルを置き、下層には培地を入れ、ゲルの上層は空気に、下層は培地に触れるようにした。5日間のALIを行った後、組織は4%ホルマリンで固定しパラフィン包埋した。4 μ mの垂直切片を作製しHE染色 (hematoxylin and eosin: ヘマトキシリン・エオジン)を行った。

4.7 定量、及び半定量 RT-PCR

RNeasy Mini Kit (QIAGEN、東京)を用いて RNA を抽出した。SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いて complementary DNA (cDNA)を作製した。mRNAの定量は Mx-3000P (Stratagene、La Jolla、CA)と QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN)を用いて行った。変性時間 94 度 30 秒間、アニーリング 55 度 60 秒間、伸長 72 度 60 秒間を 40 サイクル行った。相対的 mRNA の発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いてハウスキーピングジーンである glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)との相対量として定量した。また半定量 RT-PCR は PC818 サーマルサイクラー (ASTECC、福岡)と AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行

った。変性時間 94 度 20 秒間、アニーリング 55 度 30 秒間、伸長 72 度 50 秒間を 30 から 35 サイクル行った。得られた PCR 産物を 2% のアガロースゲルに流し紫外線を当てて可視化し撮影した。気管支平滑筋細胞の BSMC、肺動脈平滑筋細胞の PASMC、気管支上皮細胞の NHBE、小気道上皮細胞の SAEC の RNA は Lonza (Basel, Switzerland) から入手した細胞から調整した。ヒト気道上皮細胞の BEAS-2B とヒト単球性白血病の THP-1 の RNA は ATCC から入手した細胞から調整した。肺胞上皮細胞である AEC と脳組織の RNA は各々 ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA) と Clontech (Palo Alto, CA) から入手した。HRH1 のポジティブコントロールとして HUVEC、HRH2 のポジティブコントロールとして THP-1、HRH3 のポジティブコントロールとして脳組織、HRH4 のポジティブコントロールとして THP-1 を使用した。遺伝子特異的なプライマーは Table 2 に示す。

Table 2. プライマーの配列

Gene	Forward Primer (5' to 3')	Reverse Primer (5' to 3')
GAPDH	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA	GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA
HRH1	TGGTTTGGATTCCAGAAAGC	CACACTGAACCCCTCATCT
HRH2	CAGTTCGGGTCGCCATCTC	CTGGTCTCGTTCCTGCTGTTC
HRH3	TCCACTGCTATGCCGAGTT	TGCGCCTCTGGATGTTCAG
HRH4	CCGTTTGGGTGCTGGCCTTCTTAG	GATCACGCTTCCACAGGCTCCAAT
COL1A1	AGGACAAGAGGCATGTCTGGTT	TTGCAGTGGTAGGTGATGTTCTG
ACTA2	GCACCCAGCACCATGAAGA	ACCGATCCAGACAGAGTATTT
PDGFB	GTTTGCTGTTGAGGTGGCTGTAGATG	GAGATGAAAGGAACCAGAGGAAGAG
CTGF	CAGCATGGACGTTTCGTCTG	AACCACGGTTTGGTCCTTGG
CDH1	CCCATCAGCTGCCAGAAAATGA	CTGTCACCTTCAGCCATCCTGTTT
VIM	GACAATGCGTCTCTGGCACGTCT	TTCTTCTGCCTCCTGCAGGTTCT
TGFB1	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCACCATTAGCAC
TGFB2	CAGCACACTCGATATGGACCA	CCTCGGGCTCAGGATAGTCT

HRH1: histamine receptor H1、HRH2: histamine receptor H2、HRH3: histamine re-

ceptor H3、HRH4: histamine receptor H4、COL1A1:collagen type I alpha 1、ACTA2:
actin α 2 smooth aorta muscle、PDGFB:platelet-derived growth factor beta polypeptide、
CTGF:connective tissue growth factor、CDH1:E-cadherin、VIM:vimentin、TGFB1:
transforming growth factor- β 1、TGFB2:transforming growth factor - β 2。

4.8 ウェスタンブロット

細胞は lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 %
Nonidet P-40) にて溶解し、SDS ゲル電気泳動を行いポリビニリデンジフルオリド膜に
転写した。非特異的な蛋白結合は TBS-T バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and
150 mM NaCl, and 0.1% Tween-20) に 2% の ECL Prime Blocking Reagent (GE
Healthcare, Buckinghamshire, UK) を加えブロッキングを行った。次に一次抗体として
抗 α -SMA 抗体 (Sigma)、抗 α -tubulin 抗体 (Sigma)、抗 Erk1/2 抗体 (Cell signaling,
Danvers, MA)、抗リン酸化 Erk1/2 抗体 (Cell signaling) をそれぞれ適切な濃度にて使
用した。HRP 標識二次抗体を 1:20000 の濃度で使用し後に ECL Prime Western Blot-
ting Detection Kit (GE Healthcare) にて検出を行った。CCD カメラ (EZ-Capture MG;
ATTO、東京) にて画像を撮影した。

4.9 免疫細胞染色

細胞の免疫染色はチャンバースライド (IWAKI) に細胞を播いたものを、ゲルの免疫染色は垂直切片を用いてLSAB2 Kit/HRP (DAB) にて免疫染色を行った。アセトンとメタノールを1:1で混合した溶液で細胞を10分間固定し、3%の過酸化水素で5分間固定した。一次抗体を抗pan-keratin抗体 (Cell Signaling)、抗Ki67抗体 (DAKO、Hamburg、Germany)、ネガティブコントロールとしてマウスIgG抗体を1:100の濃度で使用した。二次抗体としてビオチン標識ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体にて60分間室温でインキュベートした。パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで10分間インキュベートした後0.05%のDABを含む基質溶液で染色をした。最後にヘマトキシリンで細胞質を染色し、乾燥させ光学顕微鏡にて観察した。

4.10 miRNA 発現レンチウイルスベクターの構築

① miRNA 配列のデザイン

合成 miRNA による RNAi の概要を Fig.2 に示す。Invitrogen 社の「BLOCK-iT™ RNAi Designer」で標的遺伝子の mRNA の GenBank accession numbers (TGFB1: NM_000660.5、TGFB2: NM_001135599.2) を入力し miRNA 配列をデザインした。
(<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)。ヒト TGF-β1 に対して 4 ペア、TGF-β2 にたいして 3 ペアのセンス・アンチセンス鎖を作製した (Table 3)。

Table 3. デザインした miRNA を含むオリゴの配列

	Oligonucleotide (5' to 3')
TGF-β1 #1 sense	TGCTGATTAGCACGCGGGTGACCTCCGTTTTGGCCACTGACTGACGGAGGTCACGCGTGCTAAT
TGF-β1 #1 antisense	CCTGATTAGCACGCGTGACCTCCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGGAGGTCACCCGCGTGCTAATC
TGF-β1 #2 sense	TGCTGATTTCTGGTACAGCTCCACGTGTTTTGGCCACTGACTGACACGTGGAGGTACCAGAAAT
TGF-β1 #2 antisense	CCTGATTTCTGGTACCTCCACGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACGTGGAGCTGTACCAGAAATC
TGF-β1 #3 sense	TGCTGTATCCCTGCTGTCACAGGAGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCTCCTGTCAGCAGGGATA
TGF-β1 #3 antisense	CCTGTATCCCTGCTGACAGGAGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCTCCTGTGACAGCAGGGATAC
TGF-β1 #4 sense	TGCTGATGAGAAGCAGGAAAGGCCGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCGGCCTTCTGCTTCTCAT
TGF-β1 #4antisense	CCTGATGAGAAGCAGAAGGCCGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCGGCCTTCTGCTTCTCATC
TGF-β2 #1 sense	TGCTGTATCCAATTTCCACCCTAGATCGTTTTGGCCACTGACTGACGATCTAGGGGAAATGGATA
TGF-β2 #1 antisense	CCTGTATCCAATTTCCCTAGATCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGATCTAGGGTGGAATGGATAC
TGF-β2 #2 sense	TGCTGTTTCATGAACAGCATCAGTTACGTTTTGGCCACTGACTGACGTAACGACTGTTTCATGAA
TGF-β2 #2 antisense	CCTGTTTCATGAACAGTCAGTTACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTAACGACTGATGCTGTTTCATGAAC
TGF-β2 #3 sense	TGCTGTTCTGATCACCACTGGTATATGTTTTGGCCACTGACTGACATATACCAGGTGATCAGAA
TGF-β2 #3 antisense	CCTGTTCTGATCACCTGGTATATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATATACCAGTGGTATCAGAAC

Figure 2

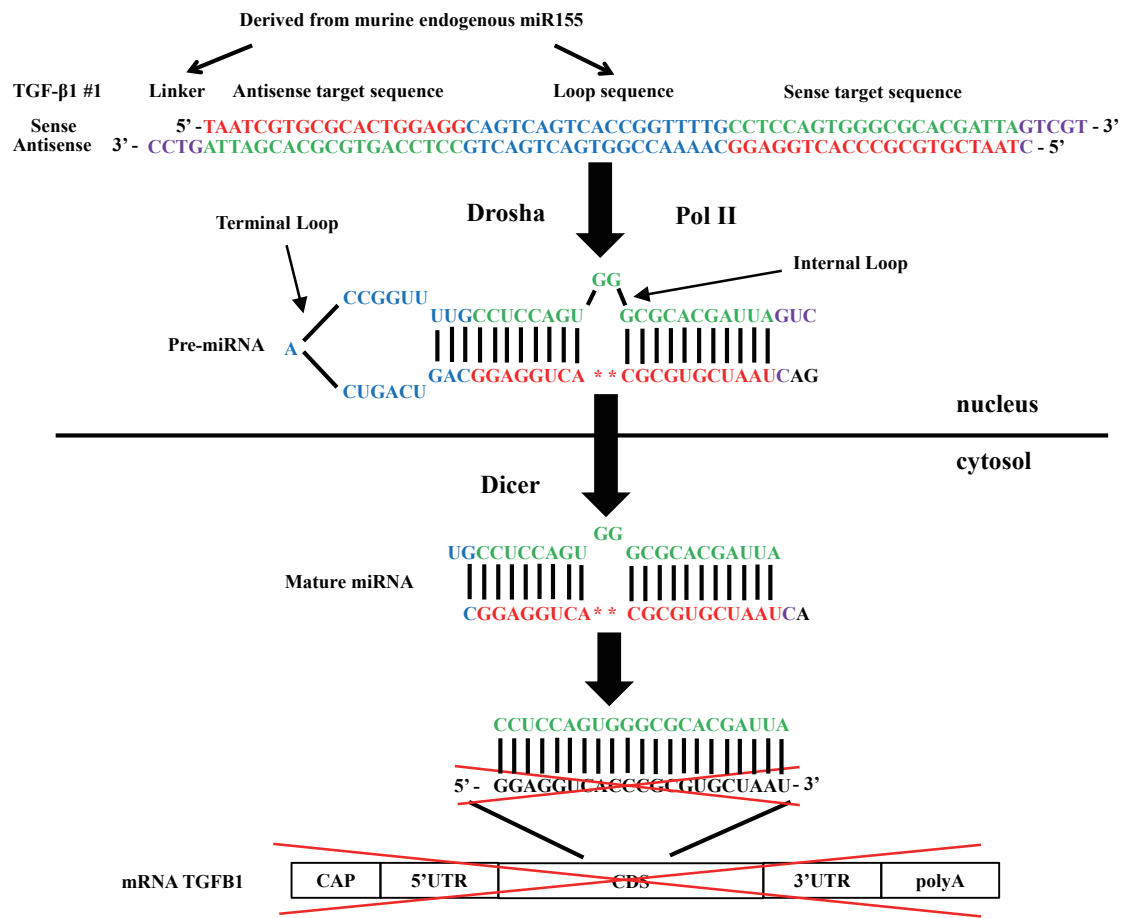


Fig. 2
合成miRNAによるRNAiの機序の概要.

② pcDNA6.2 ベクターへの組み込み

BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen) を使用した。センス鎖とアンチセンス鎖をアニーリング反応をさせ、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR と T4 DNA ligase を用いてライゲーション反応をさせた。One Shot TOP10 Chemically Competent *E. Coli* (Invitrogen) にトランスフォーメーションを行い得られた大腸菌を QuickLyse Miniprep kit (QIAGEN) にてプラスミド DNA を抽出・精製した。キットに付属の EmGFP forward sequence primer (5'- GGCATGGACGAGCTGTACAA -3') を用いて ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer にてシーケンシングを行い目的の配列が挿入されていることを確認した。

③ ドナーベクターの組み込み (BP 反応)

Gateway BP Clonase II Enzyme Mix を使用した。また negative control として pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg control plasmid を使用した。このベクターは通常の pre-miRNA としてヘアピン構造を形成するが、いずれの脊椎動物特異的遺伝子をターゲットとしない。前述の Miniprep の産物、または pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-neg control plasmid と pDONR[™]221 (Invitrogen) と Gateway BP Clonase II Enzyme Mix を加えて BP 反応を行った。BP 反応産物を One Shot TOP10 Chemically Competent *E. Coli* に前述の如くトランスフォーメーションし、得られた大腸菌を QuickLyse Miniprep

Kit にてプラスミド DNA を抽出・精製した。

④ デスティネーションベクターへの組み込み(LR 反応)

Gateway LR ClonaseII Enzyme Mix を使用した。またデスティネーションベクターとして EF-1 α プロモーターを有する CSII-EF-RfA (理化学研究所) を選択した。前述の Miniprep の産物と、CSII-EF-RfA と Gateway LR Clonase II Enzyme Mix を加えて LR 反応を行った。プロテアーゼ K にて反応を停止させた。LR 反応産物を One Shot Stbl3 Chemically Competent *E.Coli* (Invitrogen) に前述の如くトランスフォーメーションし、得られた大腸菌を HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN) にてプラスミド DNA を抽出・精製した。

⑤ レンチウイルスの作成

(a) Opti-MEM (GIBCO) を 1.25ml と pCAG-HIVgp を 2.5ug (理化学研究所) と pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理化学研究所) を 2.5ug とレンチウイルス発現ベクターを 4.5 μ g、(b) Opti-MEM を 1.25ml と Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 30 μ l の混合液を各々作成し 5 分間室温で静置した後に (a) と (b) を混合して 20 分間室温で静置した。293FT 細胞を Opti-MEM + 10% FBS で 1.2×10^6 /ml の濃度で懸濁液を作成した。上記混合溶液と細胞懸濁液 4ml を混合し 100 ミリ I 型コラーゲンコートディッシュに播き一

晩培養した。翌日 293FT 細胞の増殖培地 6ml で培地交換をした。更に 2 日後、細胞上清を回収し 3000rpm・5 分で遠心し 500 μ l ずつ分注し-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

⑥ レンチウイルス感染

A549 および HFL-1 を 1×10^5 個ずつエッペンドルフチューブに分注し 3000rpm 3 分で遠心し上清を除去した。500 μ l のウイルス液でピペッティングし、さらに増殖培地 500 μ l を加えてピペッティングしティッシュカルチャー6 穴プレートに播き一晚培養した。二種類のレンチウイルス感染させる場合はウイルス液を 250 μ l ずつ加えた。翌日に通常の増殖培地 2ml に培地交換した。感染効率は感染後 72 時間後にフローサイトメトリーにて GFP 陽性細胞の検出にて測定した (EPICS XL System II, BeckmanCoulter, Miami, Fla)。

4.11 ELISA

上清中の蛋白量は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。A549 および HFL-1 を 24 穴プレートに培養し、無血清培地で 48 時間培養したあと上清を回収した。上清中の TGF- β 1 及び TGF- β 2 の濃度は Quantikine ELISA human immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN) キットを用い、プロトコルに従い測定した。吸光度は microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA) で測定し、キット付属のスタンダ

ードを用いてスタンダードカーブを作成し、サンプルの濃度を定量した。定量にあたってはプレートリーダーに付属の MicroplateManager III data analysis software (Bio-rad) を使用した。

4.12 免疫不全マウスへの肺癌異種移植

5から8週齢のBalb/cヌードマウスを日本チャールズリバー（横浜）から購入した。

A549細胞を 5×10^7 cells /mlの濃度でPBSに懸濁し100 μ Lをマウスの皮下に各グループ10匹ずつに移植した。腫瘍の大きさ $a \times b \times c/2$ （a:縦、b:横、c:高さ）で測定し、重さはday35で測定した。動物実験は東京大学の動物実験委員会に承認された。

4.13 免疫蛍光染色。

切除したサンプルをドライアイスで冷やしたOCTコンパウンド (Sakura Finetek, Torrance, CA) に包埋し凍結保存した。作成した切片を1:1のアセトンメタノールで固定し、抗CD31抗体 (BD Pharmingen, 東京) をBlocking One solution (Nacalai Tesque, 東京) で1:200の割合で希釈し室温で1時間インキュベートした。核染色はTOTO3 (Invitrogen) で1分間行った。BIOREVO BZ-9000 microscope (キーエンス, 大阪) にて観察し撮影した。腫瘍におけるCD31陽性領域は BZ-H1C image analysis application (キーエンス) にて計算した。

4.14 コラーゲンアッセイ

腫瘍中に含まれるコラーゲン量を Sircol Soluble Collagen Assay kit (Biocolor, Newton Abbey, UK) を用いて測定した。切除した腫瘍の一部を 1% プロテアーゼインヒビターカクテル (Thermo scientific) を含む 0.5M 酢酸溶液を加え、4°C にて 24 時間攪拌を行った。次いで 15000×g で 60 分間遠心処理を行い、上清を採取してプロトコルに従いコラーゲン量を測定した。なおコラーゲン量は腫瘍の重さの 10 倍量の酢酸溶液に溶かすことにより補正した。

4.15 統計解析

結果は平均±標準誤差で示した。解析には JMP (version 9; SAS Institute Inc., 東京) を使用した。二群間の比較は Student T 検定を用いた。多群間には ANOVA による分散分析で評価し、多群間比較を Turkey-Kramer 法を用いて検定した。P < 0.05 を有意差ありとした。

5 結果

モデル 1

ヒスタミンは濃度・時間依存的にコラーゲンゲル収縮を促進した

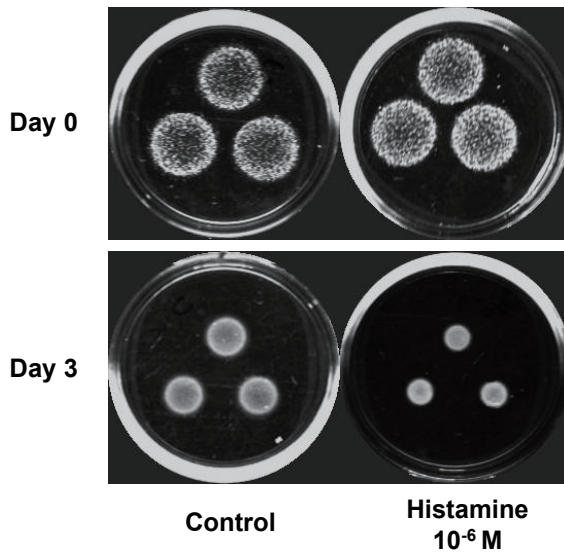
ヒスタミンの肺線維芽細胞への影響を見るために3種類の胎児肺線維芽細胞のセルライン(IMR-90、WI-38、HFL-1)含コラーゲンゲルをヒスタミンで刺激した。すべての肺線維芽細胞でヒスタミンはコラーゲンゲル収縮を時間依存性に増強させた(Fig. 3A、3B)。以降の実験ではHFL-1を使用した。次にヒスタミンの濃度変化による影響を検討した。 10^{-7} Mの濃度では効果は認めなかったが 10^{-6} から 10^{-4} Mの濃度でゲル収縮効果を認めた(Fig. 3C)。次に、成人肺における影響を検討するため、モデル2で樹立した4例の肺癌患者の切除肺の正常部分由来の肺線維芽細胞を用いてヒスタミンの効果を検討した。4例全例においてヒスタミンはコラーゲンゲル収縮を増強させた(Fig. 4)。

ヒスタミンは H1 受容体を介してコラーゲンゲル収縮を誘導した

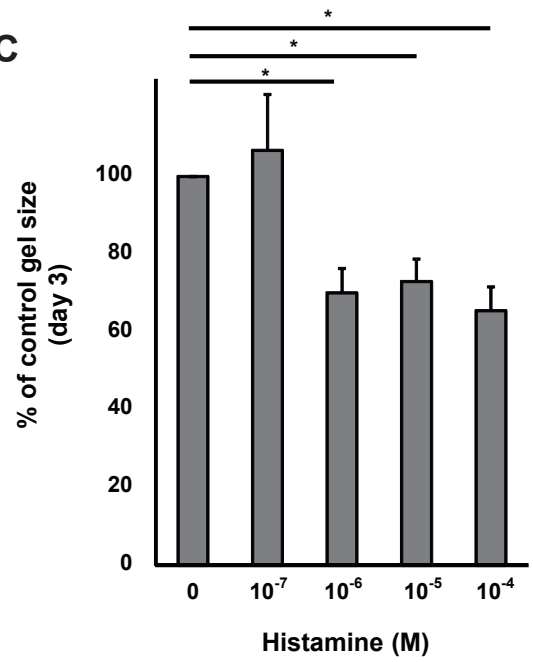
ヒスタミンの受容体はH1からH4受容体の4種類が確認されており、さまざまな細胞に発現している[68]。肺線維芽細胞においてどの受容体がヒスタミンによるコラーゲンゲル収縮に寄与しているか受容体アンタゴニストを使用して検討した。まずヒスタミンの受容体の発現を確認するため、半定量RT-PCRを行った。3種類の胎児肺線維芽細胞の

Figure 3

A



C



B

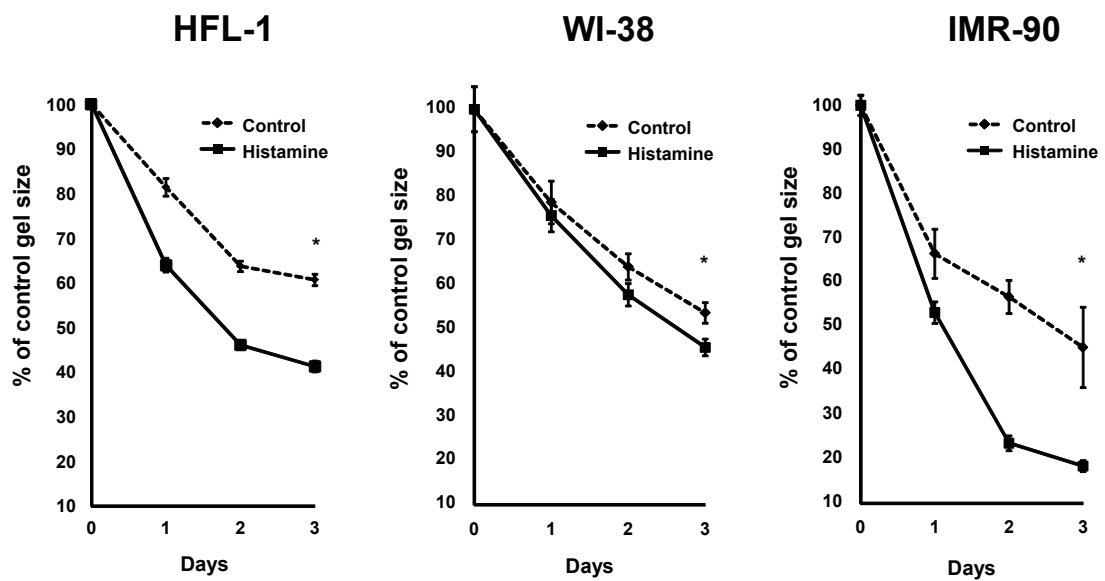


Fig. 3

A: ヒスタミンによる線維芽細胞(HFL-1)を包埋したコラーゲンゲルの収縮の写真. B: 時間経過に伴うHFL-1, WI-38, IMR-90を包埋したコラーゲンゲルのサイズの変化. 初日のゲルのサイズをコントロールとしたサイズの比率. N=3. C: ヒスタミンの濃度変化に伴うHFL-1を包埋したコラーゲンゲルの大きさの変化. 3日後にゲルのサイズを測定し非刺激群をコントロールとしたサイズの比率. N=4. * $P < 0.05$.

Figure 4

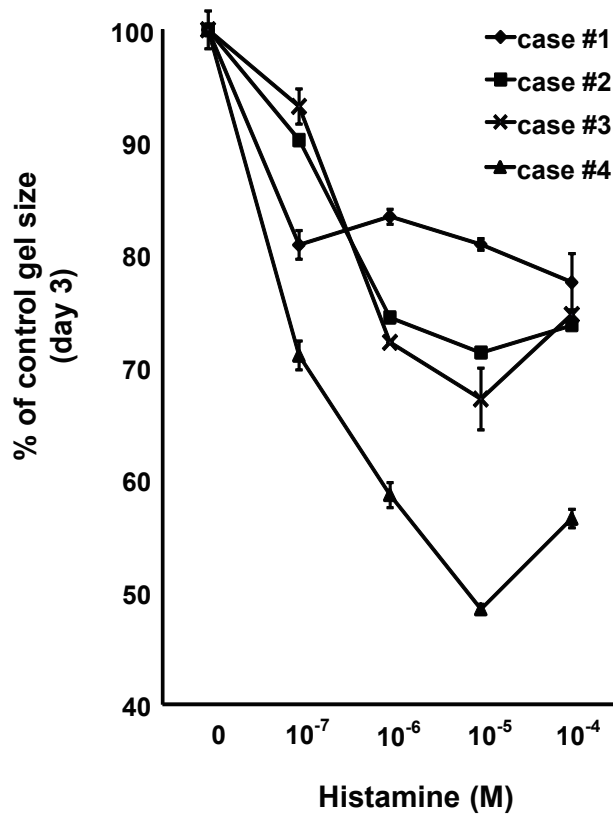


Fig. 4

ヒスタミンの濃度変化に伴う初代培養で樹立したヒト正常肺線維芽細胞#1, #2, #3, #4を包埋したコラーゲンゲルの大きさの変化. 3日後にゲルのサイズを測定し非刺激群をコントロールとしたサイズの比率.

セルライン、および4例の成人肺由来肺線維芽細胞においてH1受容体の発現を認めた (Fig. 5)。H2受容体は肺線維芽細胞の細胞間で発現の差を認めた。またH3、H4受容体は発現を認めなかった。次に各受容体アンタゴニストを使用して検討したところ、H1受容体拮抗薬であるdiphenhydramineだけがヒスタミンの効果を打ち消すことができた (Fig. 6A)。他の受容体拮抗薬は効果を認めなかった (Fig. 6B)。

ヒスタミンは H1 受容体を介して細胞内シグナリングを誘導した

肺線維芽細胞の細胞内シグナリングを確認するため、GPCRのシグナルの下流であるMAPKカスケードの因子の一つのErk1/2のリン酸化を確認した。ヒスタミンは速やかに肺線維芽細胞内でErk1/2のリン酸化を誘導しピークは5分後に認められ、ヒスタミンは 10^{-6}M から 10^{-4}M の濃度でErk1/2のリン酸化を誘導した (Fig. 7A)。またdiphenhydramineによりErk1/2のリン酸化は 10^{-4}M の濃度で抑制された (Fig. 7B)。

ヒスタミンによるコラーゲンゲル収縮は 2-APB にて抑制された

ヒスタミンH1受容体は古典的経路としてGq蛋白を活性化させホスホリパーゼC (phospholipase C: PLC)を活性化させ、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)をdiacyl glycerol (DAG)とIP₃へ分解する。DAGはPKCを活性化させ、様々な分子をリン酸化させる活性を持つ。これらのシグナルについてまずbisindolylmaleimide (PKC阻

Figure 5

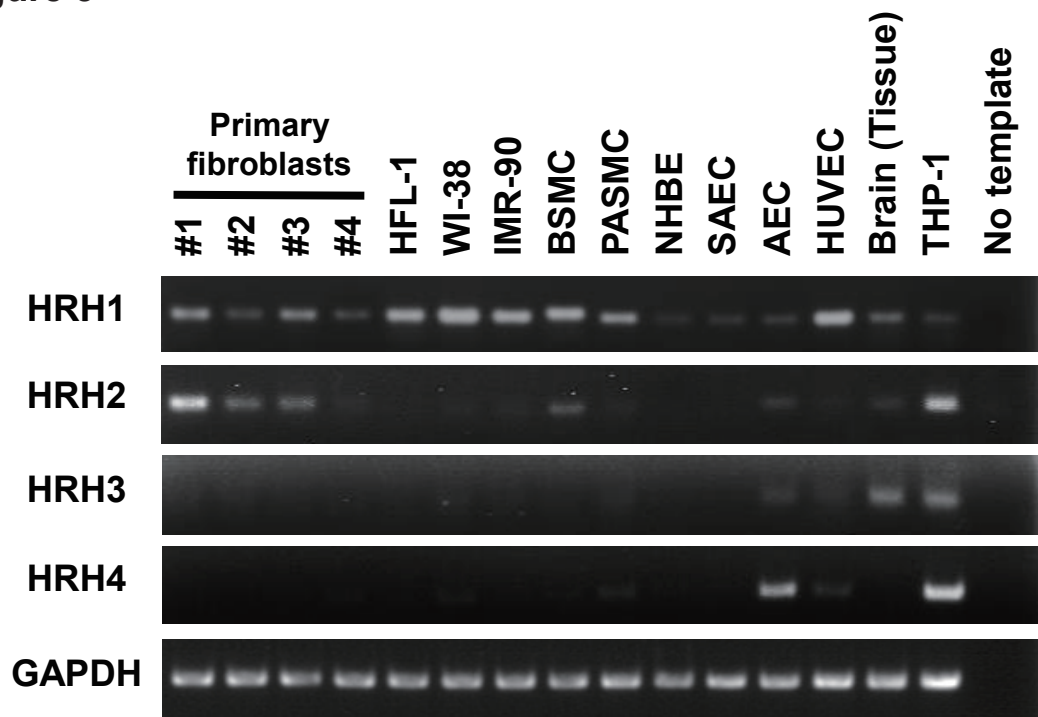


Fig. 5

半定量PCRによる4種類の初代培養で樹立した肺線維芽細胞 #1, #2, #3, #4, 及び胎児肺線維芽細胞株HFL-1, WI-38, IMR-90, 及び他の肺を構成する細胞などにおけるHRH1, HRH2, HRH3, HRH4の発現の比較. HRH1のポジティブコントロールとしてHUVEC, HRH2とHRH4のポジティブコントロールとしてTHP-1, HRH3のポジティブコントロールとしてBrain (tissue)を用いた. 内部コントロールとしてGAPDHを用いた.

Figure 6

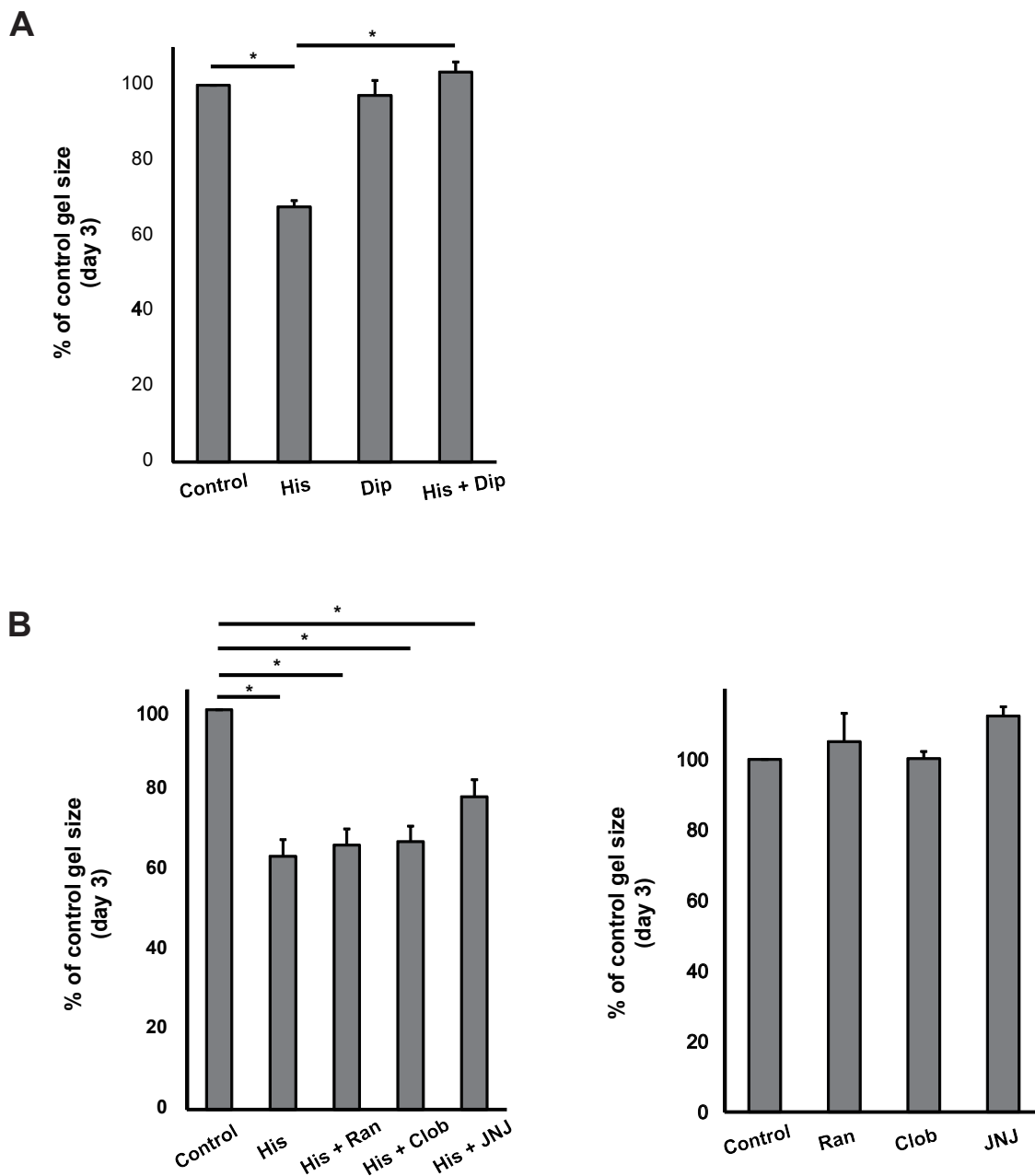


Fig. 6

A: 抗ヒスタミンH1受容体拮抗薬・diphenhydramineによるヒスタミン誘導性のHFL-1を包埋したコラーゲンゲルの収縮への影響. N=3. B: 抗ヒスタミンH2・H3・H4受容体拮抗薬 ranitidine, clobenpropitand, JNJ777120によるヒスタミン誘導性のHFL-1を包埋したコラーゲンゲルの収縮への影響. N=4. C: 抗ヒスタミンH2・H3・H4受容体拮抗薬によるHFL-1を包埋したコラーゲンゲルの収縮への影響. N=3. 3日後にゲルのサイズを測定し非刺激群をコントロールとしたサイズの比率. * $P < 0.05$.

Figure 7

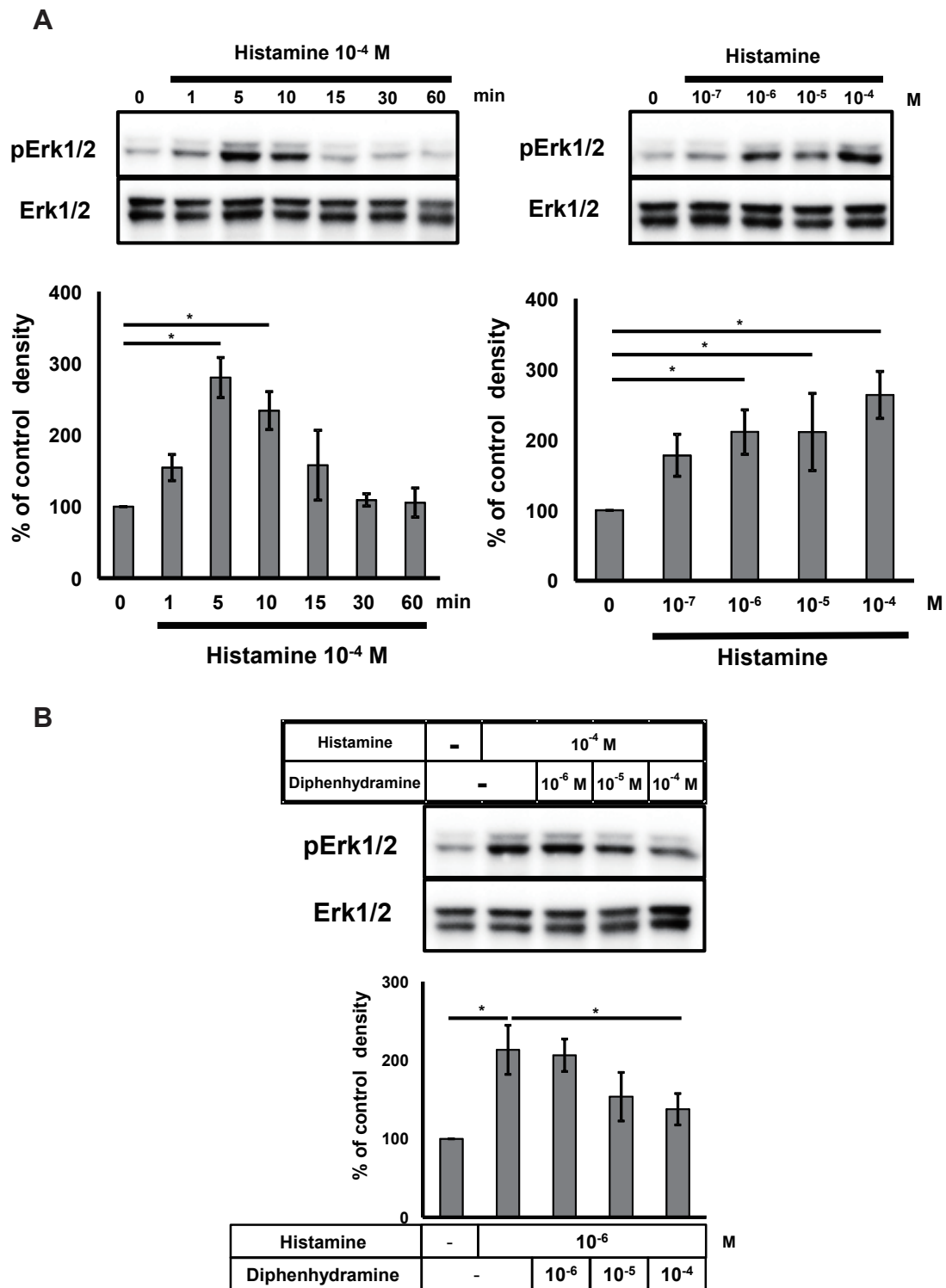


Fig. 5

A: ヒスタミンによる時間経過, 及び濃度変化に伴うHFL-1内のErk1/2及びリン酸化Erk1/2の変化. B: diphenhydramineによるヒスタミン誘導性のHFL-1内のリン酸化Erk1/2の変化への影響. 各々代表的写真とデンシトリーによるリン酸化Erk1/2の定量を示す. N=3.

* $P < 0.05$.

害薬)を用いて検討した。bisindolylmaleimideではヒスタミンによるコラーゲンゲル収縮を抑制することができず、PKCの経路はこの実験系ではあまり役割を果たしていないことが示唆された(Fig. 8A)。次にIP₃受容体による小胞体からのCa²⁺の移動の関与をみるため広く使われているIP₃受容体拮抗薬の2-APBを使用した[69]。2-APBはヒスタミンによるコラーゲンゲル収縮を抑制することができた(Fig. 8B)。これらの結果よりヒスタミンによるコラーゲンゲル収縮はIP₃受容体を介したCa²⁺シグナリングが重要である可能性が示唆された。

ヒスタミンは肺線維芽細胞において[Ca²⁺]_iを上昇させた

ヒスタミンが肺線維芽細胞の細胞内カルシウム濃度にどのような影響を及ぼすかfura-2蛍光法にて検討した。ヒスタミンは細胞外液内でニカルジピンとCaCl₂存在下でもEGTA存在下でも[Ca²⁺]_iを上昇させ、diphenhydramineにて阻害され、また2-APBにより阻害された(Fig. 9)。これらのことよりヒスタミンは[Ca²⁺]_iの上昇はヒスタミンH1受容体を介し、小胞体からのIP₃によるCa²⁺の移動を誘導することが示唆された。

Figure 8

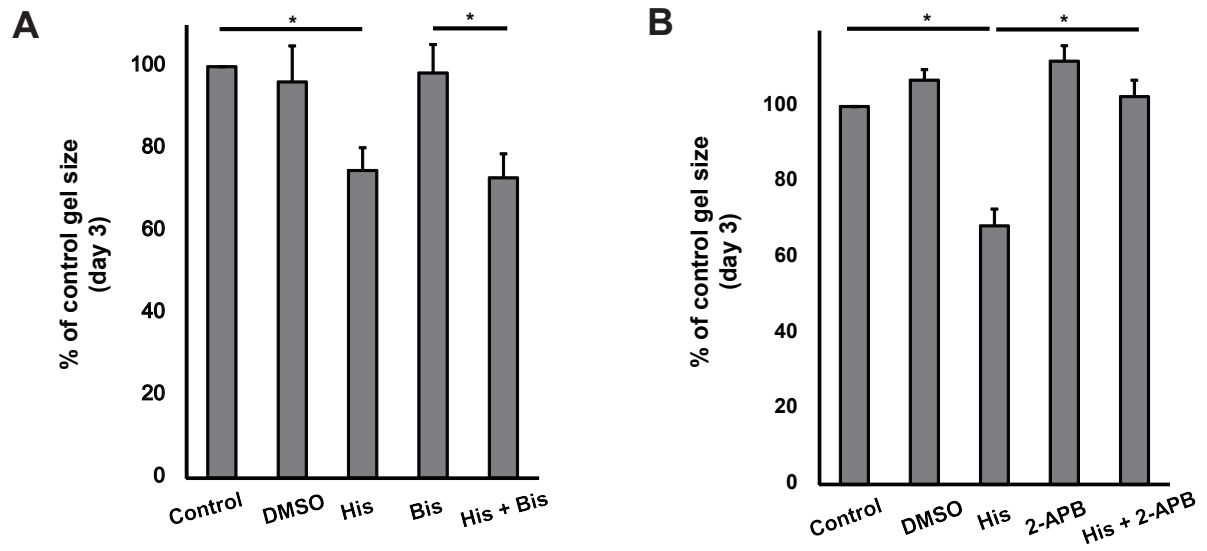


Fig. 8

A: PKC阻害薬・bisindolylmaleimideによるヒスタミン誘導性のHFL-1を包埋したコラーゲンゲルの収縮への影響. N=4. B: IP_3 受容体拮抗薬・2-APBによるヒスタミン誘導性のHFL-1を包埋したコラーゲンゲルの収縮への影響. N=3. 3日後にゲルのサイズを測定し非刺激群をコントロールとしたサイズの比率. * $P < 0.05$.

Figure 9

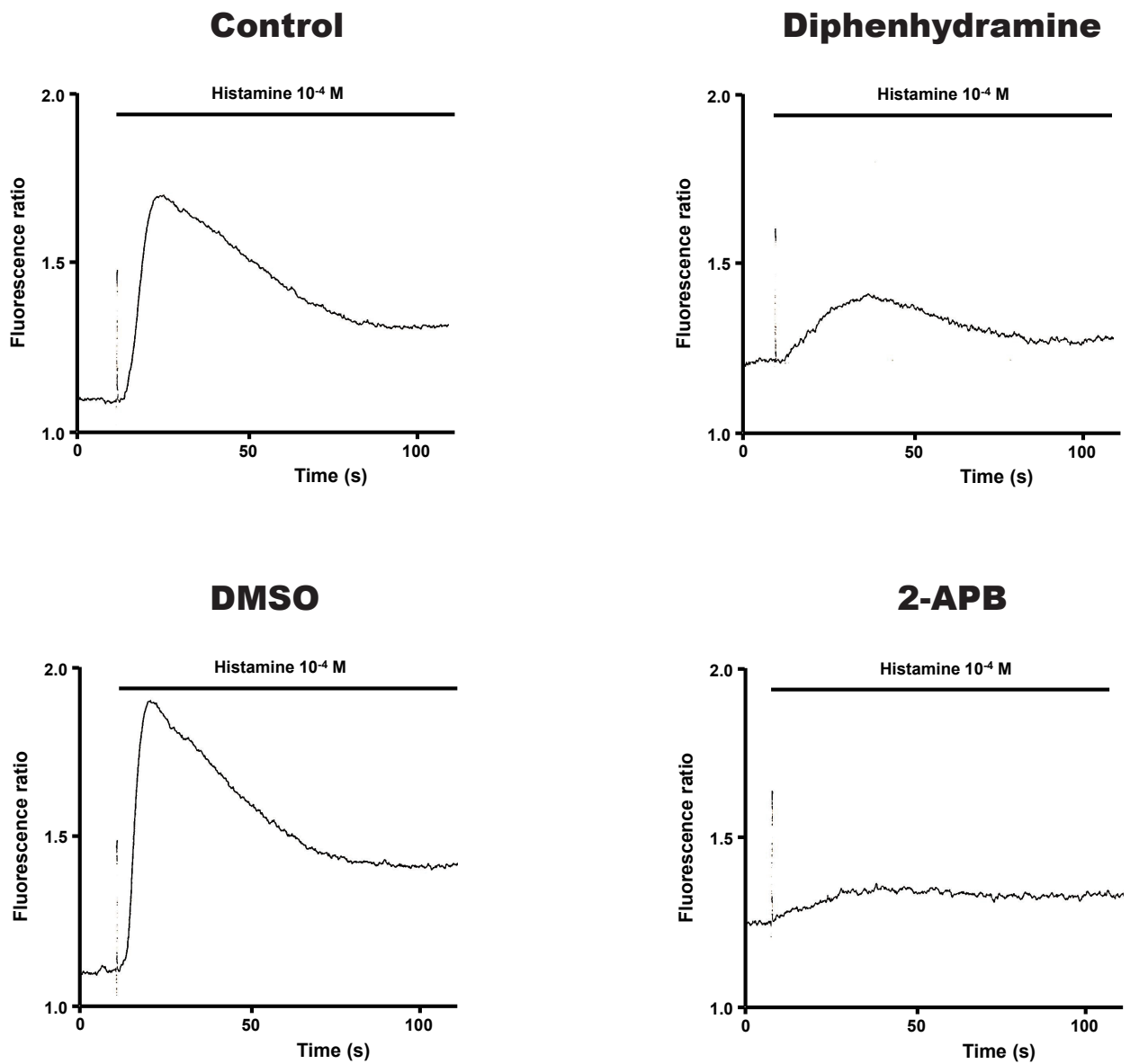


Fig. 9

ヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度の変化. 左上: 阻害剤なし. 右上: diphenhydramineをヒスタミン刺激の30分前から処理. 左下: DMSOをヒスタミン刺激の30分前から処理. 右下: 2-APBをヒスタミン刺激の30分前から処理.

モデル 2

肺癌間質線維芽細胞の初代培養の樹立

手術を受けた3例の肺癌患者からCAFとNFを樹立した。位相差顕微鏡による観察ではCAFとNFはよく似た紡錘型の形であり、線維芽細胞と考えられた (Fig. 10A)。上皮細胞のコンタミネーションの除外のため上皮に特異的なマーカーであるpan-cytokeratinによる免疫細胞染色を行った[70]。CAFとNFはpan-cytokeratinは陰性であることを確認した (Fig. 10B)。これらのことより初代培養で得られた細胞が純粋な肺線維芽細胞であることが示された。

CAFは筋線維芽細胞のフェノタイプを有した

活性化した線維芽細胞は筋線維芽細胞と呼ばれ α -SMA が陽性となり、また組織の収縮力を増強することが報告されている[71, 72]。CAFは α -SMA が陽性であり、増殖能の増強などの筋線維芽細胞の特徴を有するとされている。本研究においてCAFとNFにおける α -SMA の発現を検討した。定量 RT-PCR とウエスタンブロットにて α -SMA は全症例においてNFと比較しCAFで高発現していた。またベースラインでの発現の差も個人間で認められた (Fig. 11A, 11B)。次にCAFとNFの増殖能の違いを検討した。症例#1と#2では細胞増殖能の差を認めなかった。症例#3ではCAFは有意にNFよりも高い増殖能を有していた (Fig. 11C)。次にCAFとNFの収縮力の差を調べるため

Figure 10

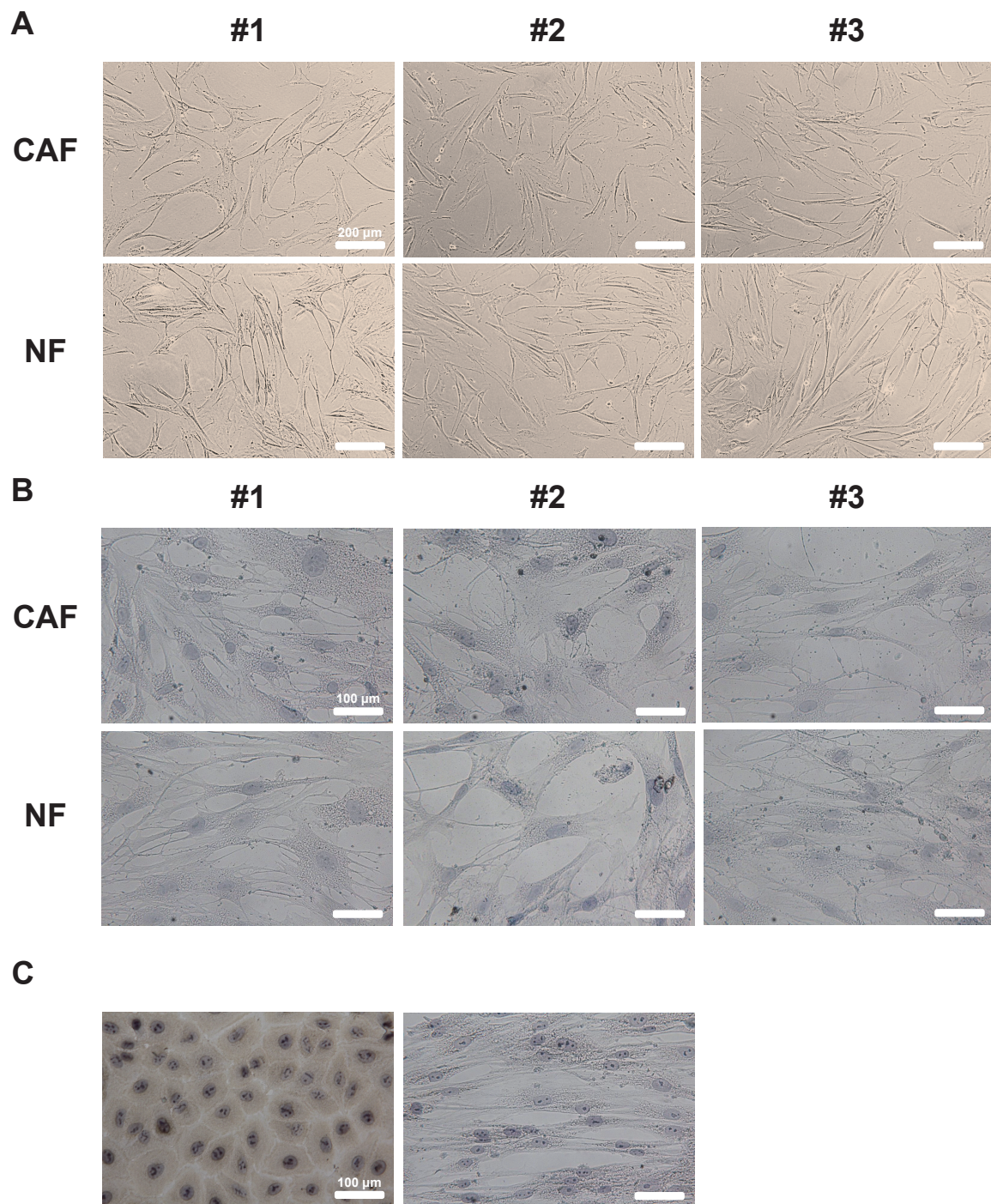


Fig. 10

A: CAF及びNFの位相差顕微鏡による観察. スケールバーは200 μ m. B: CAF及びNFの抗pan-cytokeratin抗体による免疫細胞染色. スケールバーは100 μ m. C: 左: A549の抗pan-cytokeratin抗体による免疫細胞染色(ポジティブコントロール). 右: HFL-1のマウスIgG1抗体による免疫細胞染色(ネガティブコントロール). スケールバーは100 μ m.

Figure 11

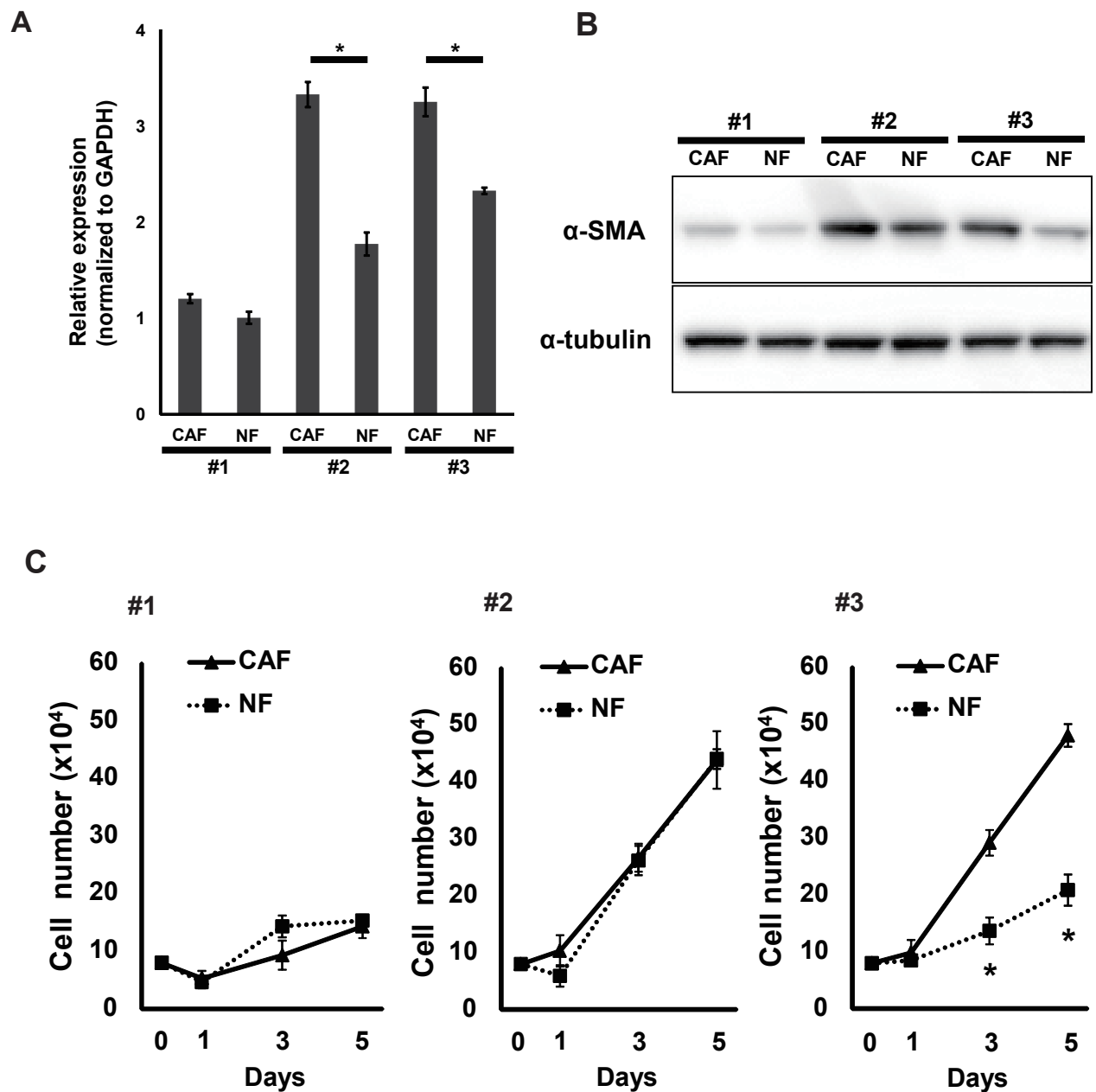


Fig. 11

A: 定量RT-PCRによるCAFとNFの α -SMAの発現の比較. N=3. B: ウェスタンブロッティングによるCAFとNFの α -SMAの発現の比較. C: 細胞増殖アッセイによるCAFとNFの細胞増殖能の比較. 細胞数は1日, 3日, 5日後に測定した. N=3. * $P < 0.05$.

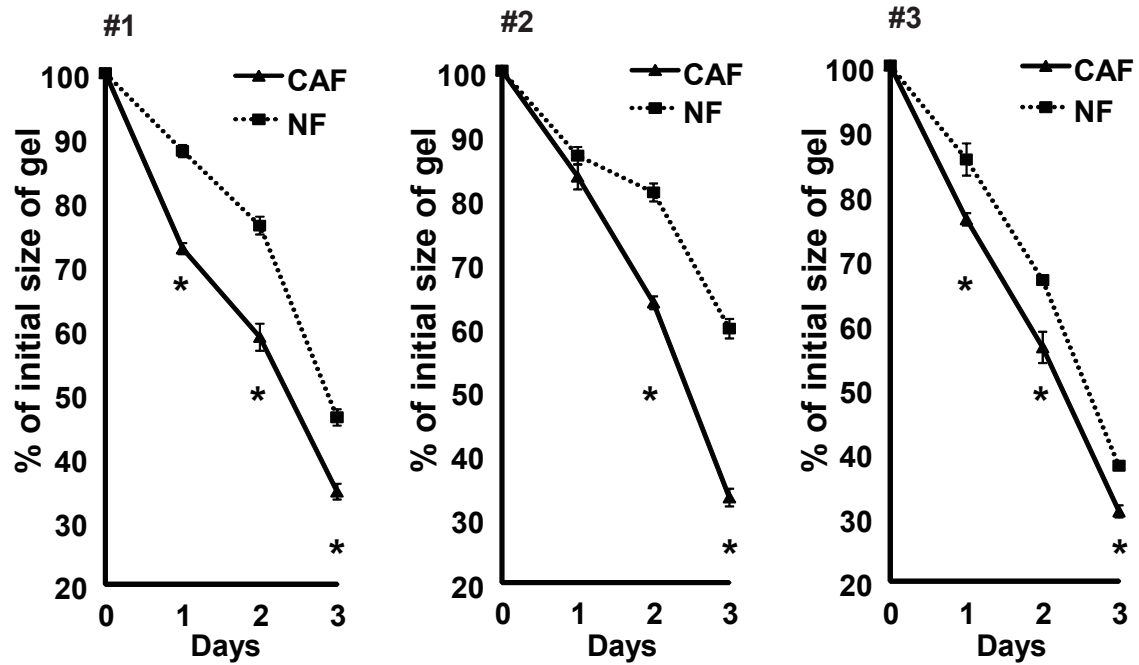
に三次元コラーゲンゲル培養法によるゲルコントラクションアッセイをおこなった。すべての症例において CAF は明らかに NF よりゲル収縮を増強した (Fig. 12A、12B)。以上より CAF は筋線維芽細胞の特徴を有することが分かった。

肺癌細胞と CAF を用いた三次元共培養

肺癌細胞とCAFの相互作用を解明するために、肺線維芽細胞とA549細胞の三次元共培養の方法を樹立した。CAF及びNFをコラーゲンゲルの中に包埋し、A549細胞をコラーゲンゲルの表面上で培養した。5日間共培養したコラーゲンゲルをさらに5日間ALIを行い、コラーゲンゲルの垂直切片をHEで染色した。症例#2と#3でA549細胞はCAF群においてよりコラーゲン内への浸潤を認めた (Fig. 13A、矢印)。症例#2では管腔構造を上皮下層に認められたがNFでは認められなかった。以上よりCAFはA549の癌浸潤を増強することが示唆された。また症例#2では症例#1や#3で認められなかった粘液様構造物が上皮層内に認められた (矢頭)。症例#2のCAF/NFはA549細胞を粘液産生細胞へと分化誘導する能力がある可能性が示唆された。以上より線維芽細胞は癌細胞のフェノタイプと行動を制御する重要な役割を果たすことを示した。さらに三次元共培養モデルにおける癌細胞の増殖への影響を検討した。Ki67は細胞増殖のマーカーであり、肺癌での発現は予後不良因子と報告されており[73]、Ki67細胞で免疫染色をおこなった (Fig. 13B)。Ki-67陽性A549細胞はCAF群とNF群では同程度見

Figure 12

A



B

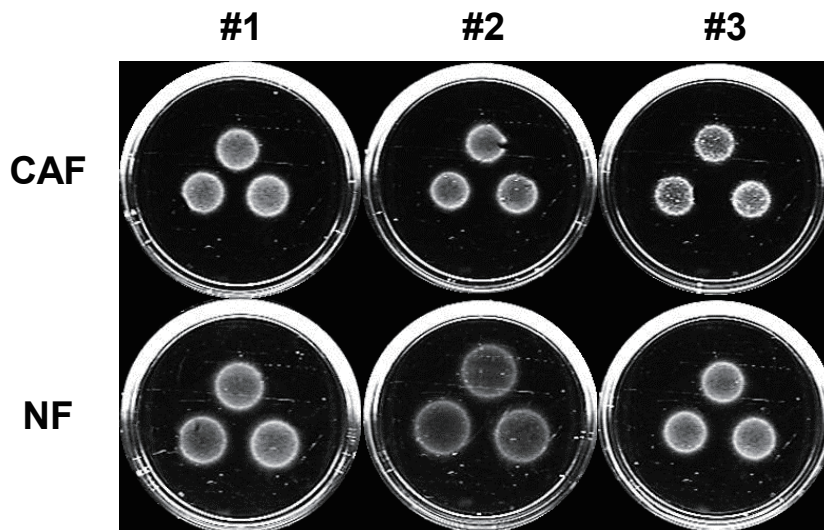


Fig. 12

A: 時間経過に伴うCAFまたはNFを包埋したコラーゲンゲルのサイズの変化. 初日のゲルのサイズをコントロールとしたサイズの比率. * $P < 0.05$. B: 3日後における収縮したコラーゲンゲルの写真.

Figure 13

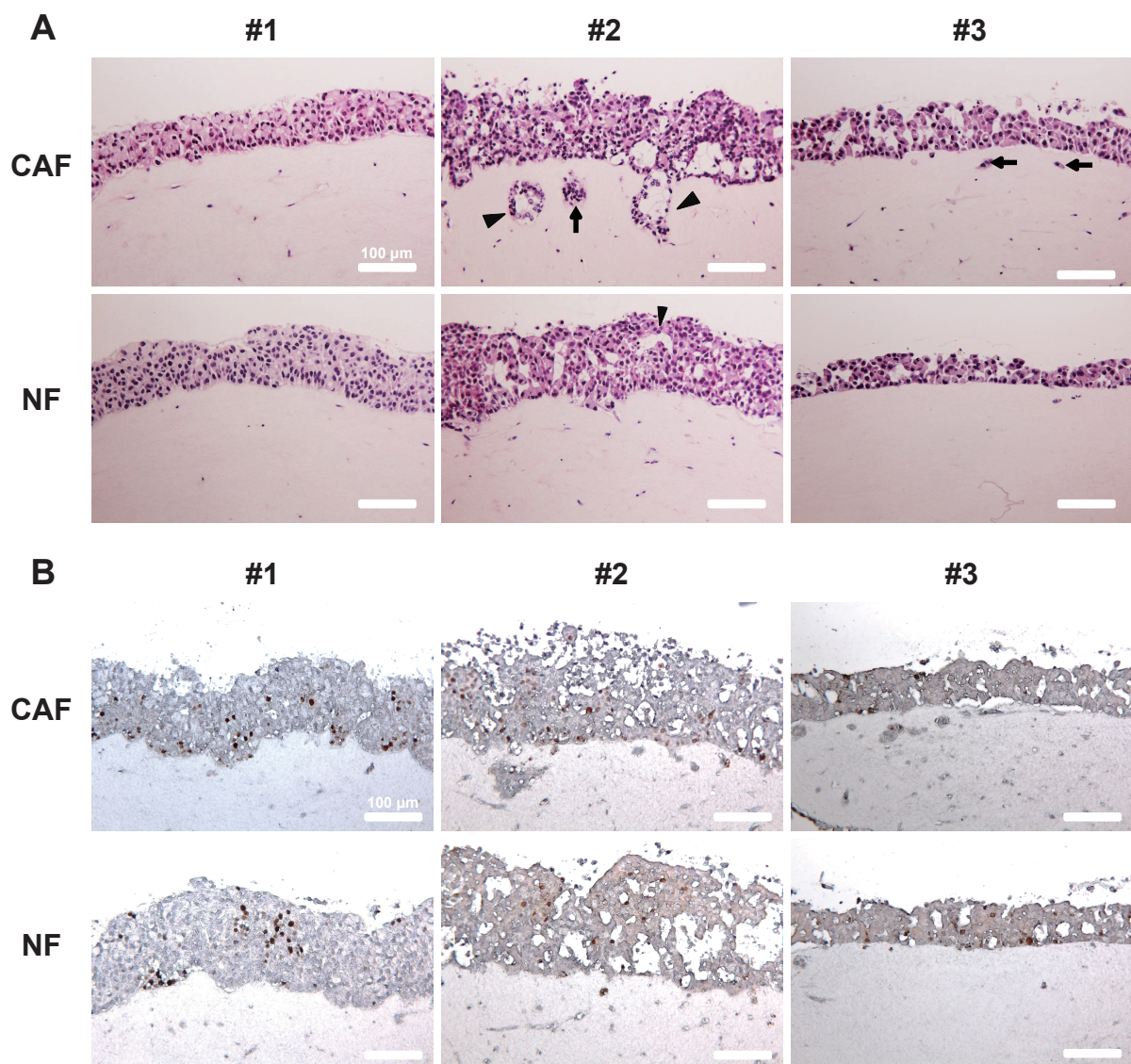


Fig. 13

A: A549細胞とCAF/NFを三次元共培養したコラーゲンゲルのHE染色. 矢印は浸潤するA549細胞, 矢頭は粘液産生する上皮様構造. **B:** 三次元共培養したコラーゲンゲルのKi-67による免疫染色. スケールバーは100μm.

られた。以上より三次元共培養モデルではCAFは細胞増殖に影響を及ぼさないことが示唆された。

モデル 3

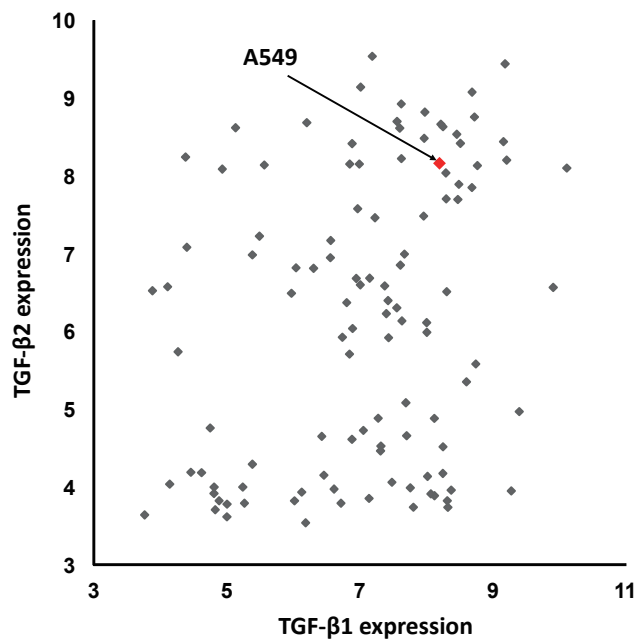
TGF- β リガンドのノックダウンのターゲットとする細胞株の選択

肺癌細胞であるA549、および肺線維芽細胞であるHFL-1において、TGF- β リガンドの3種類のアイソフォームの中で、TGF- β 1とTGF- β 2が主に発現している[74, 75]。これらの報告を参考にして使用する細胞株の選択を行った。まず肺癌細胞株の選択において、Cancer Cell Line Encyclopediaのマイクロアレイデータ(GSE36139)を用いて[76]、111種類の非小細胞肺癌細胞株のTGF- β 1とTGF- β 2の発現を比較した (Fig. 14A)。A549は非小細胞肺癌の細胞株の中でも両者の発現が高いことを確認し、今回の実験でのターゲットとした。またモデル1で使用したHFL-1、モデル2で樹立したCAF、及びNFのTGF- β 1とTGF- β 2の発現を定量PCRにて比較した。HFL-1、CAF、NFにおいてTGF- β 1とTGF- β 2の発現は大きな差は認めなかった (Fig. 14B)。以下の多くの細胞を使うこと、モデル2で樹立した初代培養肺線維芽細胞は高齢の患者由来の細胞であり集団倍加数が長く望めないことが予測される、ことなどからTGF- β の発現が同程度であるHFL-1を今回のターゲットとして選択した。

合成 miRNA 発現レンチウイルスベクターによる TGF- β リガンドのノックダウン

Figure 14

A



B

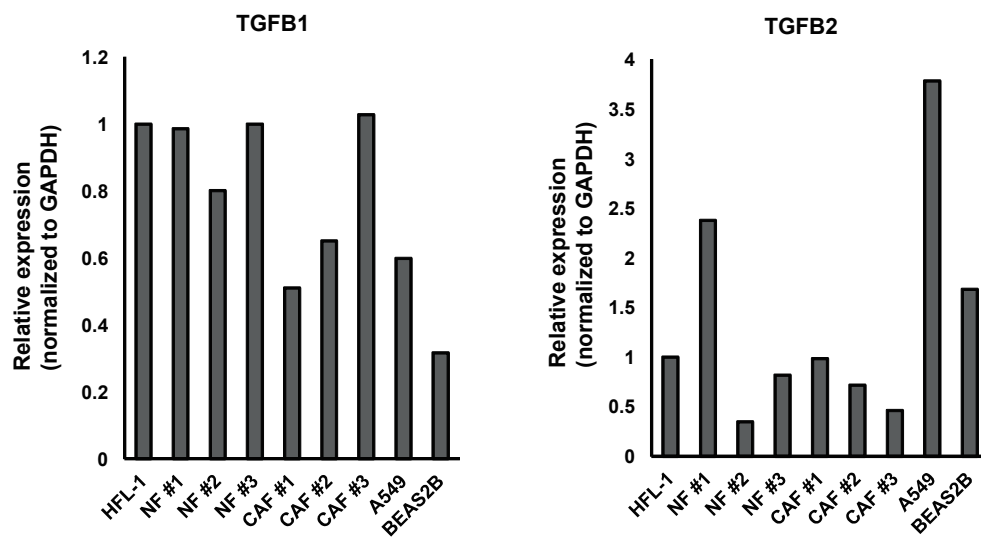


Fig. 14

A: Cancer Cell Line Encyclopediaのマイクロアレイデータ(GSE36139)を用いた非小細胞肺癌細胞株111種類におけるTGF-β1およびTGF-β2の発現. B: HFL-1, CAF, NF, A549, 及びヒト気道上皮細胞株BEAS-2BにおけるTGF-β1およびTGF-β2の発現の定量PCRによる比較.

TGF- β 1とTGF- β 2をターゲットにするmiRNAを発現するレンチウイルスベクターを各々4種類と3種類作製し、A549及びHFL-1に感染させた。フローサイトメトリーにてEmGFP陽性細胞で導入効率を推定したところA549では95%と非常に高い導入効率を示した(Fig. 15A)。一方でHFL-1でも65%から85%程度と一定以上の導入効率を示した。TGF- β 1とTGF- β 2の2種類の共感染でも同様の結果を得た。次にELISAで上清中のTGF- β リガンドの濃度測定を行いノックダウン効率を評価した。TGF- β 1とTGF- β 2はNTC(negative control) miRNAにより影響されなかった。A549ではTGF- β 1 miRNA(#1、#2、#4)はTGF- β 1の発現を抑え、またTGF- β 2 miRNA(#1~#3)はTGF- β 1の発現に影響を及ぼさなかった(Fig. 15B)。TGF- β 2 miRNA(#2、#3)はTGF- β 2の発現を抑えたがTGF- β 1 miRNA(#1~#4)はすべてTGF- β 2の発現に影響を及ぼさなかった。同様にHFL-1ではTGF- β 1 miRNA(#1~#3)はTGF- β 1の発現を抑制したが、TGF- β 2 miRNA(#1~#3)はTGF- β 1の発現に影響を及ぼさなかった(Fig. 15C)。TGF- β 2 miRNA(#2、#3)はTGF- β 2の発現を抑制したが、TGF- β 1 miRNA(#1~#4)はTGF- β 2の発現に影響を及ぼさなかった。これらの結果よりmiRNAはそれぞれのリガンド特異的に影響を及ぼしていることが分かった。2種類のウイルスベクターによるダブルノックダウンでもA549・HFL-1ともにTGF- β 1 #2 miRNAとTGF- β 2 #2 miRNAにて良好なノックダウン効果を示した。これらの結果よりTGF- β 1 #2 miRNA及びTGF- β 2 #2 miRNAを選択した。

Figure 15

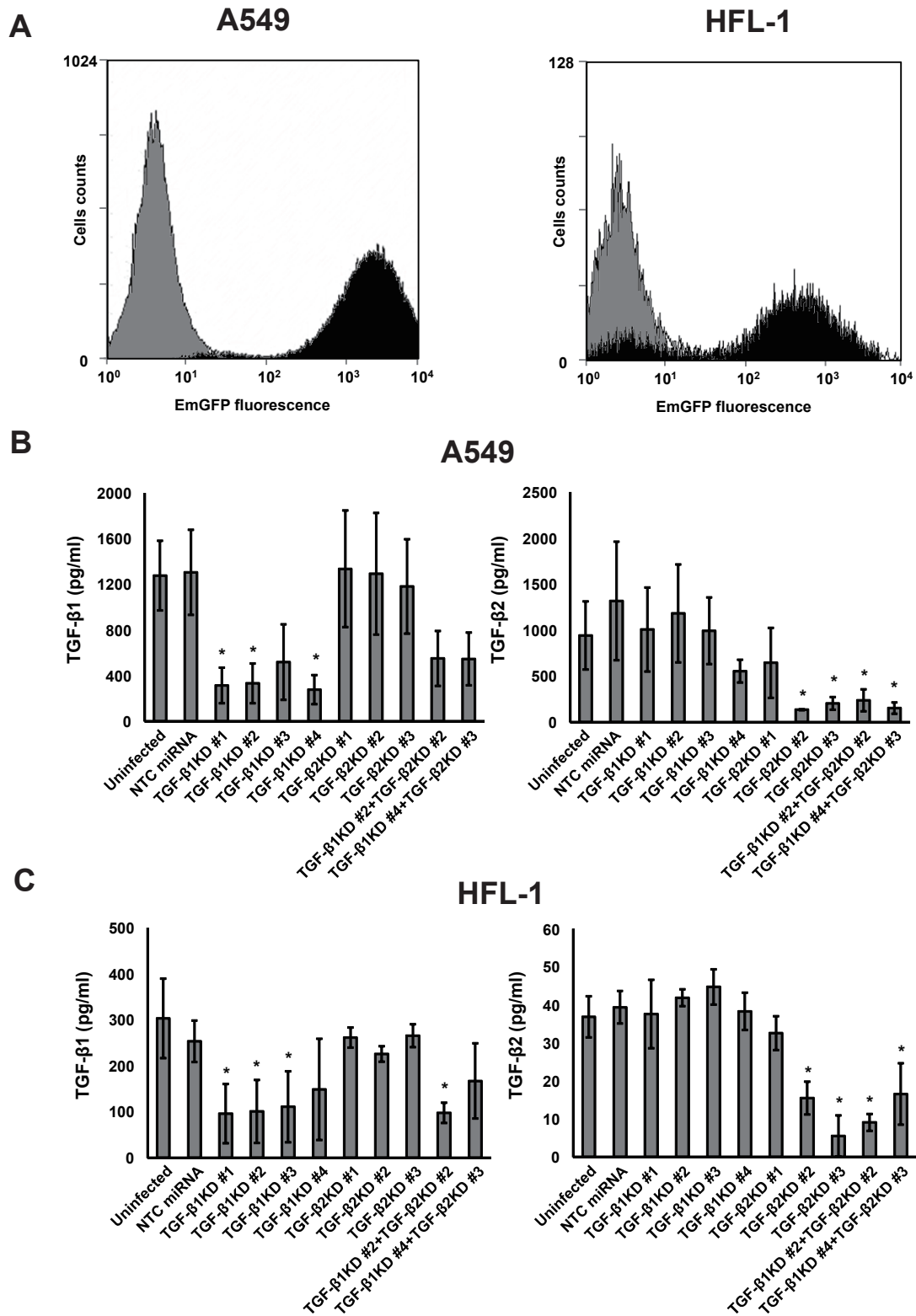


Fig. 15

A: A549及びHFL-1におけるmiRNAの導入効率をフローサイトメトリーのFL-1チャンネルでEmGFP陽性細胞を検出することにより推定した。B: TGF- β 1及びTGF- β 2をノックダウンしたA549における上清中のTGF- β 1とTGF- β 2の濃度をELISAにて測定した。C: 同様にHFL-1にて測定した。N=3. * P <0.05.

TGF- β リガンドのノックダウンによる細胞増殖への影響

次に TGF- β 1とTGF- β 2のノックダウンのA549とHFL-1の細胞増殖への影響を検討した。両細胞においてTGF- β 1、及びTGF- β 2の導入により細胞増殖が抑制され (Fig. 16)、ダブルノックダウンによってさらに増強された。TGF- β は上皮細胞では強力な増殖阻害作用があり、間葉系細胞では増殖促進作用を示す。また癌細胞では生存を増強することが報告されている[48-50]。我々のレンチウイルスによるmiRNAの導入はTGF β リガンドの安定したノックダウンを誘導する。このことにより細胞内シグナリングが恒常的に変化し、細胞の生存や増殖を制御する機構が変化し、細胞増殖を抑制すると考えられた。

TGF- β リガンドのノックダウンによる遺伝子発現の変化

EMTは癌細胞において浸潤性を獲得するのに重要な役割を果たす。EMTはE-cadherinの発現低下、およびvimentinの発現増加に特徴づけられる。A549はEMTの中間段階の状態であり、外因性のTGF- β が間葉系のフェノタイプの獲得に寄与するとされる[77]。TGF- β リガンドのノックダウンがEMTマーカーの発現の変化を及ぼすか検討した。TGF- β 2 miRNAはE-cadherinの上昇を誘導し、上皮のフェノタイプの再獲得を示唆した。同様にvimentinの発現はTGF- β 1及びTGF- β 2のmiRNAにより抑制された

Figure 16

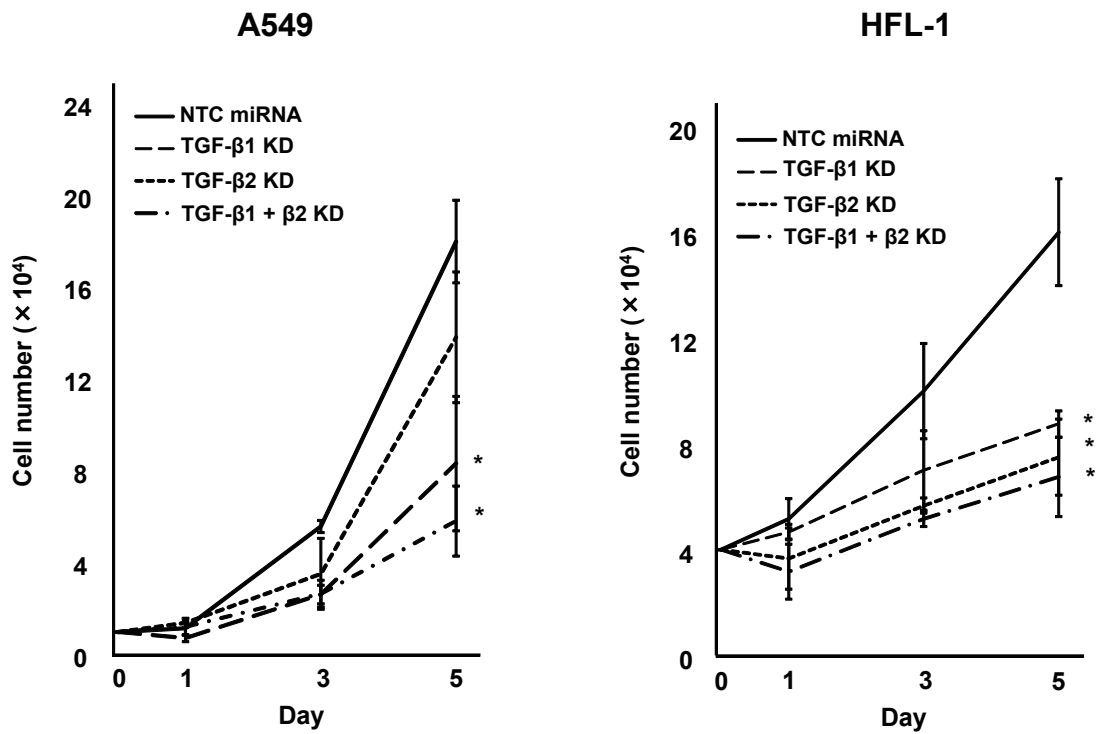


Fig. 16

NTC miRNA, TGF-β1 miRNA, TGF-β2 miRNA, TGF-β1 miRNA + TGF-β2 miRNAを導入したA549とHFL-1について細胞増殖アッセイを行った. 細胞数は1日, 3日, 5日後に測定した. N=3. *P < 0.05.

(Fig. 17A). EMTのプロセスは線維化を増強するPDGFやCTGFなどの産生と同時に起こることが知られており[77]、ノックダウンによるこれらの成長因子の発現を評価した。TGF- β 2のノックダウンはCTGFの発現を低下させ、またTGF- β 1及びTGF- β 2のmiRNAはPDGFBの発現を低下させた(Fig. 17A)。一方線維芽細胞ではTGF- β の刺激で活性化され細胞外マトリックスの産生を増強する。TGF- β リガンドのノックダウンによる、細胞外マトリックスの主要成分であるI型コラーゲンの発現への影響を検討した。HFL-1ではTGF- β 1 miRNAはCOL1A1の発現を低下させたが、TGF- β 2 miRNAは影響を及ぼさなかった(Fig. 17B)。これらの結果より、癌細胞と線維芽細胞でのTGF- β リガンドによるターゲット遺伝子の制御が明らかになった。肺の発生ではTGF- β 1は間葉全体で発現しているが、TGF- β 2は遠位の気道上皮に局在している。TGF- β 2は細胞自律的に上皮細胞・癌細胞の行動を決定する重要な役割を果たすと考えられた。一方でTGF- β 1は線維芽細胞で重要な役割を果たしていると考えられた。

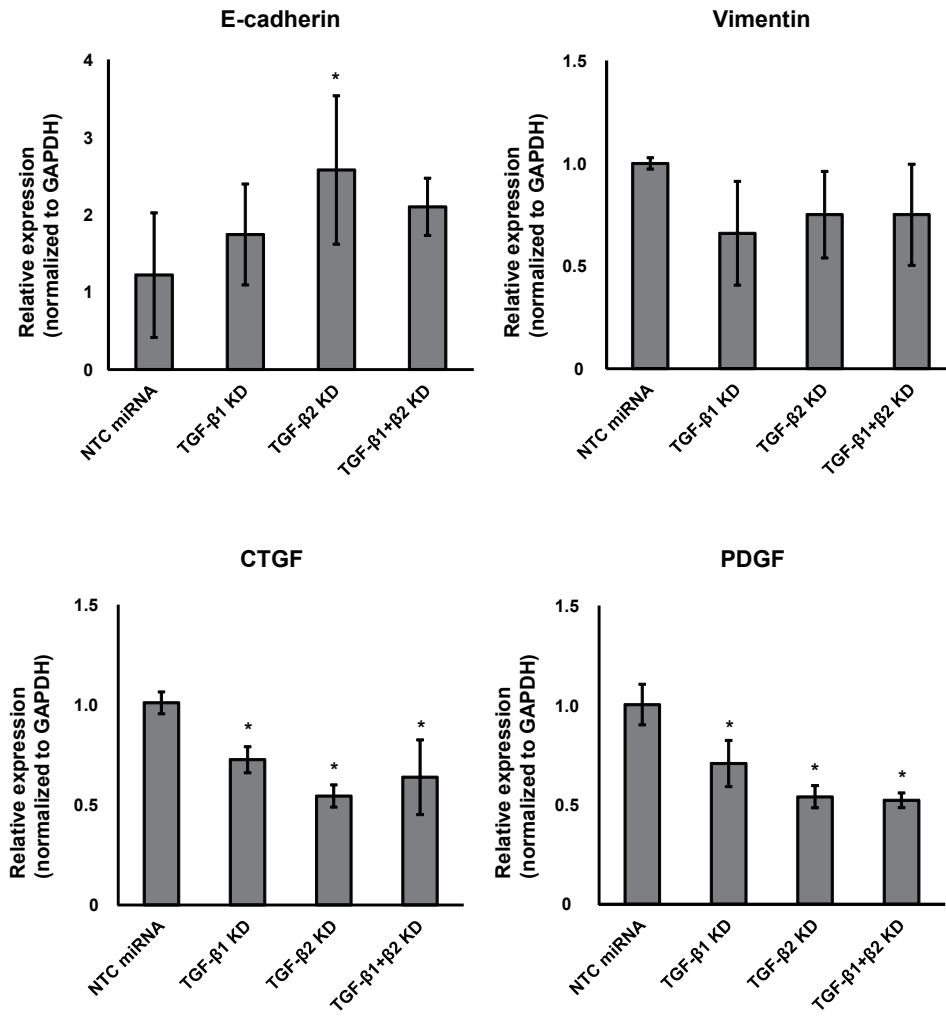
TGF- β リガンドのノックダウンによるコラーゲンゲル収縮への影響

癌組織の収縮は腫瘍の進行を促進し、間質の静水圧を上昇させ薬剤到達を阻害する[33]。TGF- β はコラーゲンゲル収縮を促進することが知られており[78]、今回 TGF- β リガンドのノックダウンが肺線維芽細胞による組織の収縮へ影響するかどうか検討した。ゲル収縮開始 1 日後にはゲルのサイズは 50% 程度収縮し、5 日後には 20% 以下の大

Figure 17

A

A549



B

HFL-1

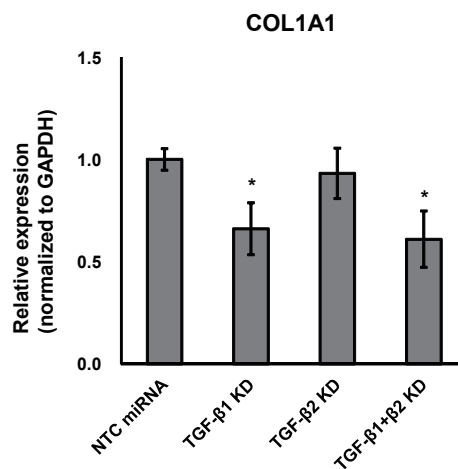


Fig. 17

A: A549における定量RT-PCR. B: HFL-1における定量RT-PCR. N=3. * $P < 0.05$.

きさまで収縮した (Fig. 18)。コントロールと比較して TGF- β 1 及び TGF- β 2 の miRNA はゲル収縮を減弱させる傾向にあった。以上より内因性の TGF- β シグナリングを阻害することで組織の収縮を減弱させる可能性を示した。

TGF- β リガンドをノックダウンした A549 と HFL-1 の三次元共培養

肺癌細胞と肺線維芽細胞の相互作用を検討するために、前述の三次元共培養法を応用した[61]。NTC miRNA または TGF- β 1 miRNA + TGF- β 2 miRNA を導入した HFL-1 を I 型コラーゲン内に包埋し、NTC miRNA、TGF- β 1 miRNA、TGF- β 2 miRNA または TGF- β 1 miRNA + TGF- β 2 miRNA を導入した A549 細胞をゲルの表面上で 10 日間培養した。垂直切片を作製し HE 染色を行った (Fig. 19)。NTC-miRNA を導入した A549 細胞はゲル内に浸潤を認めた。A549 の TGF- β 1 または TGF- β 2 をノックダウンさせても浸潤は変わらなかったが、ダブルノックダウンしたところ浸潤は消失を認めた。一方で HFL-1 において TGF- β 1 と TGF- β 2 のダブルノックダウンは A549 細胞の浸潤には影響を及ぼさなかった。これらのことより HFL-1 における TGF- β リガンドは浸潤には影響を及ぼさないことを示唆した。

TGF- β リガンドのノックダウンさせた A549 の異種移植モデル

TGF- β リガンドのノックダウンの *in vivo* における効果を検証するため、A549 細胞を免疫

Figure 18

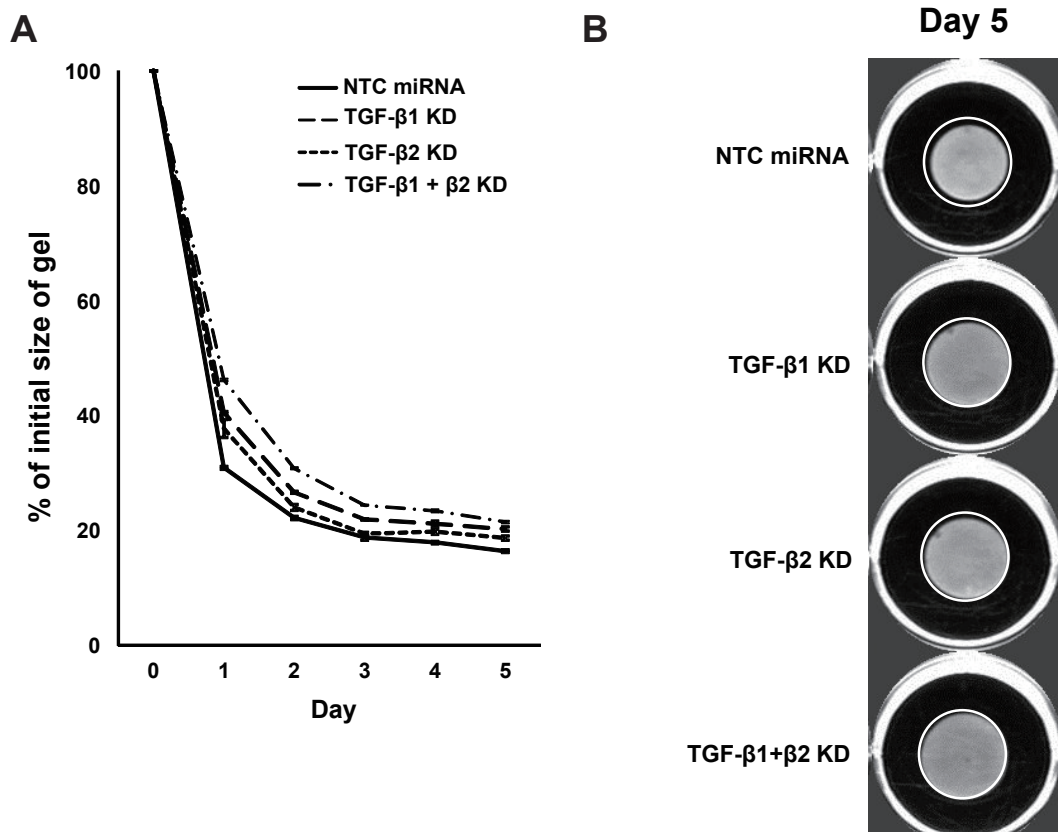


Fig. 18

A: NTC miRNA, TGF-β1 miRNA, TGF-β2 miRNA, TGF-β1 miRNA + TGF-β2 miRNA を導入したHFL-1を包埋したコラーゲンのゲルのサイズを5日間測定した. B: 5日後におけるコラーゲンゲルの写真.

Figure 19

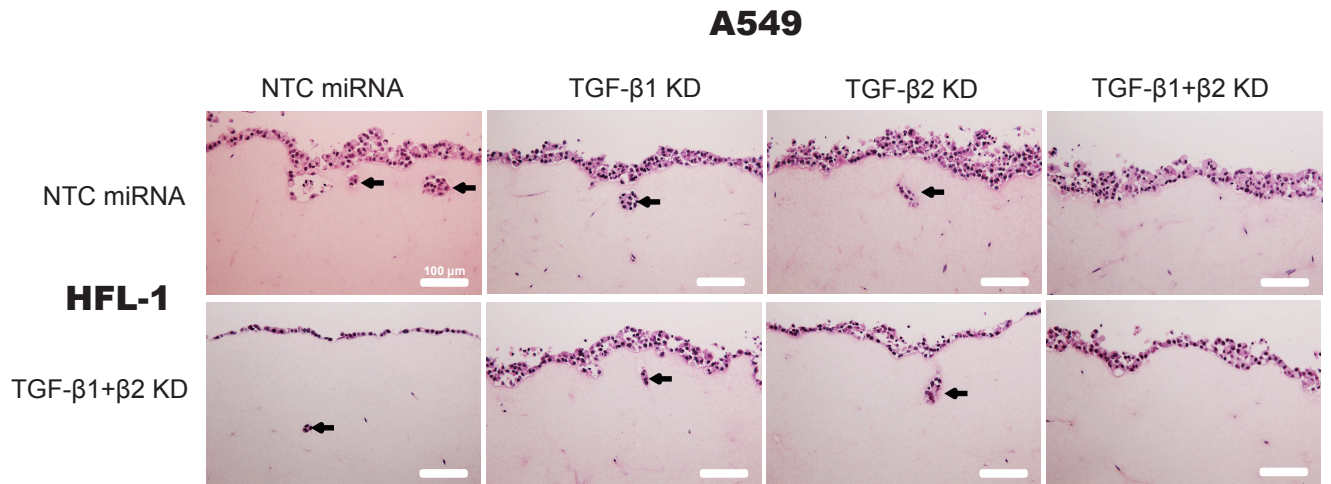


Fig. 19

NTC miRNA, TGF- β 1 miRNA, TGF- β 2 miRNA, TGF- β 1 miRNA + TGF- β 2 miRNA を導入したA549とNTC miRNAまたはTGF- β 1 miRNA + TGF- β 2 miRNAを導入したHFL-1を三次元共培養したコラーゲンゲルのHE染色像. スケールバーは100 μ m.

不全マウスへ異種移植を行った。NTC miRNA、TGF- β 1 miRNA、TGF- β 2 miRNA、またはTGF- β 1 miRNA + TGF- β 2 miRNAを安定的に発現しているA549細胞をBalb/cヌードマウスの皮下に注射した。統計学的有意差は検出できなかったが、TGF- β 2 miRNAは腫瘍の成長を抑える傾向を認めた (Fig. 20A、20B)。抗CD31抗体による免疫染色ではCD31陽性領域は差を認めなかった (Fig. 20C)。また腫瘍中のコラーゲン量の定量では差を認めなかった (Fig. 20D)。以上よりTGF- β リガンドをA549細胞でノックダウンさせると異種移植させた肺癌の成長を抑制する可能性を示唆した。

Figure 20

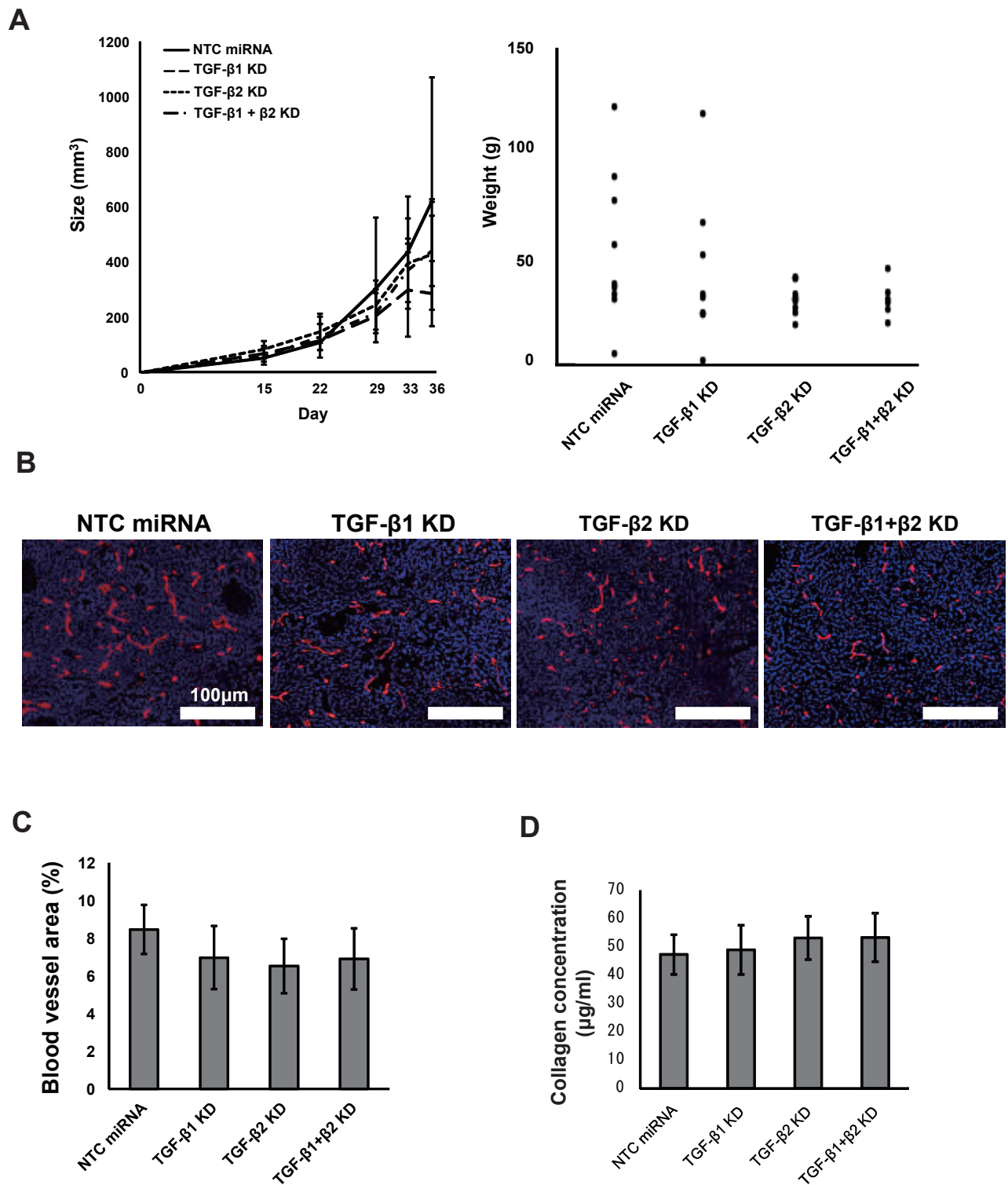


Fig. 20

NTC miRNA, TGF-β1 miRNA, TGF-β2 miRNA, TGF-β1 miRNA + TGF-β2 miRNA を導入した A549 を免疫不全マウスの皮下に注射した。A: 腫瘍の大きさの時間経過と切除された腫瘍の重さ。B: 腫瘍の抗 CD31 抗体による蛍光免疫染色。CD31: 赤, TOTO3 (核染色): 青。スケールバーは 100 μm。C: 腫瘍における CD31 陽性領域の割合。D: 腫瘍中に含まれるコラーゲンの濃度。

6 考察

本論文ではまずモデル1で、ヒスタミンは時間、及び濃度依存的に肺線維芽細胞を含むコラーゲンゲルの収縮を誘導することを示した。この効果はヒスタミンH1受容体を介していることを示し、肺線維芽細胞においてヒスタミンH1受容体が主に発現しており機能的であるという以前の報告と合致した[30]。さらなる下流ではIP₃経路を介していることを示し、さらにヒスタミンH1受容体拮抗薬とIP₃受容体拮抗薬(2-APB)はヒスタミン誘導性の細胞内カルシウム濃度上昇を阻害することを示した。平滑筋の収縮はフィラメントの滑りのメカニズムにて表現され、IP₃の経路を介して放出されたCa²⁺はカルモデュリンと結合し、ミオシン軽鎖キナーゼ(myosin light chain kinase:MLCK)を活性化させる。MLCK はミオシン軽鎖をリン酸化し、cross-bridge cyclingを誘導する[79]。このように気道平滑筋細胞でよく知られている細胞の収縮のメカニズムと同様に線維芽細胞でも細胞内カルシウムシグナリングがコラーゲンゲル収縮に関与していることを示唆した。

今回モデル1では胎児肺線維芽細胞に加えモデル2で樹立した成人肺由来の正常肺線維芽細胞を使用した。Outgrowth法にて得られたこれらの細胞は、正常の肺胞に存在する線維芽細胞は少ないため主に末梢気道周囲に存在する線維芽細胞由来であると推測され、気道の線維芽細胞として使用した。厳密に気道の線維芽細胞を得るには、得られた肺組織から気道を分離し採取するべきではあるが、軟骨や筋層

が存在すること、小さいサンプルから採取するため気道の同定や分離に熟練したものでないと困難である、などと技術面などの問題が高い。気道線維芽細胞を気管支鏡の生検検体から樹立している報告もあり[80]、今後これらの方法を用いた気道の線維芽細胞の樹立を今後の課題としていきたい。

これまでの報告ではオボアルブミン感作マウス喘息モデルでヒスタミン H1 受容体拮抗薬であるエバスチンがアレルギー性気道炎症に対して抑制効果を有し、粘液過分泌や杯細胞過形成を抑制したという報告や[81]、ヒスタミン H1 受容体ノックアウトマウスを用いたオボアルブミンマウス喘息モデルで好酸球の減少、メサコリンの反応性が低下、血清中の IgE 濃度や気管支肺胞洗浄液中の IL-4・IL-5・IL-13 など Th2 系サイトカインの低下を認めたとの報告があり[82]、気管支喘息におけるヒスタミン-ヒスタミン H1 受容体のシグナリングがアレルギー性の気道炎症に関与し、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬が治療に有望であることが示唆されている。しかしながらこれらのモデルでは気道リモデリングについては検討されていない。今後 *in vivo* における気道リモデリングの評価に向いているとされるラットによるオボアルブミン感作喘息モデルを用いて、ヒスタミン-ヒスタミン H1 受容体のシグナリングの気道リモデリングにおける役割を検討していきたい。

以上より三次元コラーゲン培養法を行うことによりヒスタミンは肺線維芽細胞に作用することにより気流制限に関与することが示唆された。また気流制限が起きている難治性気管支喘息のマネージメントにおける抗H1受容体拮抗薬の可能性を示すことができた。

次にモデル2ではまず癌間質線維芽細胞、及び正常肺由来線維芽細胞の初代培養の樹立に成功した。引き続きCAFとNFの比較を行い、CAFはより α -SMAを高発現しており筋線維芽細胞のフェノタイプを有していることを示した。またコラーゲンゲル収縮能はCAFがNFと比較して増強していることを示した。新たに肺癌細胞と肺癌間質線維芽細胞の三次元共培養法を樹立し、CAFは3例のうち2例でA549のコラーゲンゲルへの浸潤を増強していることを示した。また症例によって肺線維芽細胞は癌細胞の分化を誘導する可能性を示した。間質の細胞は成長因子やケモカインなどのシグナルを通じて癌細胞や上皮細胞の振る舞いを制御するのに重要な役割を果たす[20, 83]。患者間でのheterogeneousな特徴を考慮すると、さらにサンプル数を増やして検討する必要があると考えられた。

これまで本研究のようにCAFとNFを肺癌の同一患者から樹立した報告はほとんどなく、15例の報告があるのみである[38]。今後は我々の樹立した3例のCAFと3例のNF

で DNA microarray を用い遺伝子プロファイルの解析・比較し、新たな CAF のマーカーになるような分子の同定、また肺癌患者の間質の中で新たな治療ターゲットになる分子を同定を目指す。またそれらの分子に関して、実際の肺癌組織中の CAF における発現を tissue microarray を用いて解析し、患者の予後データも加えることにより予後への影響の検討していきたい。

以上より、今回樹立した三次元共培養モデルは *in vivo* の癌組織を再現し、癌細胞の浸潤を評価することができた。そしてこのモデルを使って CAF の肺癌における役割を解析することができた。

最後にモデル 3 ではレンチウイルスベクターを用いて合成 miRNA の発現系を構築し、肺癌細胞および肺線芽細胞において TGF- β リガンドを効率的・選択的にノックダウンすることに成功した。レンチウイルスベクターの A549 肺癌細胞や HFL-1 肺線維芽細胞への導入効率は極めて良好であり、30%以下の TGF- β リガンドのノックダウン効率が両細胞で得られた。TGF- β リガンドのノックダウンは両細胞の増殖抑制をした。さらに A549 では EMT マーカーや線維化関連の成長因子が修飾されて、HFL-1 では I 型コラーゲンの発現が減少した。これらの細胞の機能に関して TGF- β リガンドのサイレンシングは HFL-1 によるコラーゲンゲル収縮を抑制し、A549 細胞の三次元共培養モ

デルで肺癌細胞の浸潤を抑制した。TGF- β リガンドのノックダウンは異種移植肺癌の成長を抑制する傾向を認めた。これらの所見は TGF- β の腫瘍促進能と、TGF- β のノックダウンによる腫瘍間質相互作用の阻害する利点を示唆した。

ALK 阻害剤である crizotinib などの低分子医薬や、抗 VEGF モノクローナル抗体である bevacizumab などの抗体医薬に次ぐ、新規の分子標的薬として、核酸医薬が期待されている。核酸修飾や薬剤送達法の向上により臨床応用が現実化しており、TGF- β を標的としたアンチセンス医薬を肺癌治療に応用した Phase III の臨床試験も進行中である[84]。TGF- β を標的とした治療については、TGF- β が癌細胞、および線維芽細胞を含めた腫瘍の間質に影響し癌の進行に影響を及ぼすことを考慮する必要がある[18]。しかし腫瘍-間質や上皮-間葉の相互作用という点で TGF- β リガンドの遺伝子サイレンシングの効果を探求したものは少ない[85]。我々の知る限りではこの研究がヒト TGF- β 1 と TGF- β 2 をターゲットにした miRNA を発現するレンチウイルスベクターを製作し、肺癌の進展への影響を見た初めての研究である。

肺癌においては今回検討した TGF- β リガンド以外にも HGF などの成長因子、サイトカインやケモカインなど様々なものが細胞の増殖、浸潤、遊走などに関与しており[18]、肺癌-CAF の相互作用として TGF- β 1/ β 2 以外にそれらの関与を検討する必要があると考えられる。今後は今回樹立したレンチウイルスを用いた miRNA によるノックダウンの

実験系を活用して他の因子について検討していきたい。

以上より、レンチウイルスベクターを用いて合成 miRNA の発現系を構築し、肺癌細胞および肺線芽細胞において TGF- β リガンドを効率的・選択的にノックダウンすることに成功した。この実験系を用いて TGF- β 抑制による細胞応答の変化を調べ、さらに三次元での共培養系を活用して、肺癌治療において TGF- β シグナルを阻害する戦略の有効性を示した。

このように上皮-間葉の相互作用は肺の発生・分化の過程のみならず様々な呼吸器疾患においてきわめて重要な役割を果たしている。本論文では三次元培養法を用いて *in vivo* で実際に起こっている病態を *in vitro* で再現することにより気管支喘息や肺癌など代表的な呼吸器疾患の病態解明、治療の有効性の検証などを行うことができた。

7 謝辞

本研究の遂行をご支援、ご指導頂きました、東京大学大学院医学系研究科・器官病態内科学講座の長瀬隆英 教授に感謝申し上げます。

また本研究全般にわたりご指導およびご協力を頂きました、東京大学保健・健康推進本部の齋藤朗 助教に感謝申し上げます。

また共同研究者である帝京大学医学部附属溝病院・第四内科の幸山正 准教授、奥羽大学薬学部・生化学講座の大島光宏 教授、東京大学医学部大学院医学系研究科・呼吸器外科学の中島淳 教授、東京大学大学院医学系研究科・分子病理学の森下保幸 技術補佐員にも、終始ご助言、ご指導頂きました。ここに深謝いたします。

終わりに臨み、本研究に数々の御助言、御協力を賜りました東京大学呼吸器内科 517 研究室の諸氏および東京大学呼吸器内科 243 研究室の城大祐 助教に厚く御礼申し上げます。

8 参考文献

1. Kadzik RS, Morrisey EE. Directing lung endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell stem cell*;10:355-361; 2012.
2. Zorn AM, Wells JM. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annual review of cell and developmental biology*;25:221-251; 2009.
3. Morrisey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: Genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental cell*;18:8-23; 2010.
4. Domyan ET, Ferretti E, Throckmorton K, Mishina Y, Nicolis SK, Sun X. Signaling through bmp receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of sox2. *Development*;138:971-981; 2011.
5. Goss AM, Tian Y, Tsukiyama T, Cohen ED, Zhou D, Lu MM, Yamaguchi TP, Morrisey EE. Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Developmental cell*;17:290-298; 2009.

6. Sherwood RI, Maehr R, Mazzoni EO, Melton DA. Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. *Mechanisms of development*;128:387-400; 2011.
7. Desai TJ, Chen F, Lu J, Qian J, Niederreither K, Dolle P, Chambon P, Cardoso WV. Distinct roles for retinoic acid receptors alpha and beta in early lung morphogenesis. *Developmental biology*;291:12-24; 2006.
8. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *The New England journal of medicine*;355:2226-2235; 2006.
9. Global strategy for asthma management and prevention, global initiative for asthma (gina). 2011. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.
10. World health organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: A comprehensive approach.; 2007.
11. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*;62:10-29; 2012.

12. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2011.
13. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J*;36:1174-1184; 2010.
14. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nature medicine*;18:684-692; 2012.
15. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA. Met amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating erbb3 signaling. *Science*;316:1039-1043; 2007.
16. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*;21:309-322; 2012.

17. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*;7:513-520; 2005.
18. Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*;45 Suppl 2:S163-175; 2004.
19. Gonda TA, Varro A, Wang TC, Tycko B. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: Can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol*;21:2-10; 2010.
20. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*;6:392-401; 2006.
21. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*;4:839-849; 2004.
22. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *The Journal of cell biology*;54:626-637; 1972.

23. Choe MM, Sporn PH, Swartz MA. An in vitro airway wall model of remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;285:L427-433; 2003.
24. Choe MM, Tomei AA, Swartz MA. Physiological 3d tissue model of the airway wall and mucosa. *Nat Protoc*;1:357-362; 2006.
25. Vaughan MB, Ramirez RD, Wright WE, Minna JD, Shay JW. A three-dimensional model of differentiation of immortalized human bronchial epithelial cells. *Differentiation*;74:141-148; 2006.
26. Bachert C, Maspero J. Efficacy of second-generation antihistamines in patients with allergic rhinitis and comorbid asthma. *J Asthma*;48:965-973; 2011.
27. Garbuzenko E, Berkman N, Puxeddu I, Kramer M, Nagler A, Levi-Schaffer F. Mast cells induce activation of human lung fibroblasts in vitro. *Experimental lung research*;30:705-721; 2004.

28. Hirota N, Risse PA, Novali M, McGovern T, Al-Alwan L, McCuaig S, Proud D, Hayden P, Hamid Q, Martin JG. Histamine may induce airway remodeling through release of epidermal growth factor receptor ligands from bronchial epithelial cells. *FASEB J*; 2012.
29. Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem*;337:77-81; 2010.
30. Kunzmann S, Schmidt-Weber C, Zingg JM, Azzi A, Kramer BW, Blaser K, Akdis CA, Speer CP. Connective tissue growth factor expression is regulated by histamine in lung fibroblasts: Potential role of histamine in airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*;119:1398-1407; 2007.
31. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y, Mano H, Group ALKLCs. Eml4-alk mutations in lung cancer that confer resistance to alk inhibitors. *The New England journal of medicine*;363:1734-1739; 2010.

32. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T, North-East Japan Study G. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated egfr. *The New England journal of medicine*;362:2380-2388; 2010.
33. Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*;4:806-813; 2004.
34. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Briloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol*;171:1608-1618; 2007.
35. Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: Do myofibroblasts come also from epithelial cells via emt? *J Cell Biochem*;101:830-839; 2007.

36. Direkze NC, HodiVala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res*;64:8492-8495; 2004.
37. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*;67:10123-10128; 2007.
38. Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, Zhu CQ, Pintilie M, Ramnarine VR, Ibrahimov E, Radulovich N, Leung L, Barczyk M, Panchal D, To C, Yun JJ, Der S, Shepherd FA, Jurisica I, Tsao MS. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*;108:7160-7165; 2011.
39. Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherjee S, Duncan VE, Page GP, Frost AR. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron*;2:9-21; 2009.

40. Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*;29:1732-1740; 2010.
41. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin EW, de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene*;23:7366-7377; 2004.
42. Zhang C, Fu L, Fu J, Hu L, Yang H, Rong TH, Li Y, Liu H, Fu SB, Zeng YX, Guan XY. Fibroblast growth factor receptor 2-positive fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res*;15:4017-4027; 2009.
43. Anderberg C, Pietras K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle*;8:1461-1462; 2009.
44. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast

heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*;5:1640-1646; 2006.

45. Dolznig H, Rupp C, Puri C, Haslinger C, Schweifer N, Wieser E, Kerjaschki D, Garin-Chesa P. Modeling colon adenocarcinomas in vitro a 3d co-culture system induces cancer-relevant pathways upon tumor cell and stromal fibroblast interaction. *Am J Pathol*;179:487-501; 2011.

46. Commandeur S, Ho SH, de Gruijl FR, Willemze R, Tensen CP, El Ghalbzouri A. Functional characterization of cancer-associated fibroblasts of human cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol*;20:737-742; 2011.

47. Pageau SC, Sazonova OV, Wong JY, Soto AM, Sonnenschein C. The effect of stromal components on the modulation of the phenotype of human bronchial epithelial cells in 3d culture. *Biomaterials*;32:7169-7180; 2011.

48. Massagué J. Tgfbeta in cancer. *Cell*;134:215-230; 2008.

49. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: Tgfbeta: The molecular jekyll

and hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*;6:506-520; 2006.

50. Ikushima H, Miyazono K. Tgfbeta signalling: A complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*;10:415-424; 2010.

51. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*;119:1420-1428; 2009.

52. Kong F, Jirtle RL, Huang DH, Clough RW, Anscher MS. Plasma transforming growth factor-beta1 level before radiotherapy correlates with long term outcome of patients with lung carcinoma. *Cancer*;86:1712-1719; 1999.

53. Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*;91:964-971; 2001.

54. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of tgf-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*;3:1011-1022; 2004.

55. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the tgfbeta signalling pathway in disease. *Nature reviews Drug discovery*;11:790-811; 2012.
56. Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for rna interference-based therapies. *Nature reviews Genetics*;12:329-340; 2011.
57. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular cell*;16:861-865; 2004.
58. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular cell*;9:1327-1333; 2002.
59. Naldini L, Blomer U, Gallyat P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*;272:263-267; 1996.

60. De Palma M, Venneri MA, Naldini L. In vivo targeting of tumor endothelial cells by systemic delivery of lentiviral vectors. *Human gene therapy*;14:1193-1206; 2003.
61. Horie M, Saito A, Mikami Y, Ohshima M, Morishita Y, Nakajima J, Kohyama T, Nagase T. Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three-dimensional in vitro co-culture model. *Biochemical and biophysical research communications*;423:158-163; 2012.
62. Shlyonsky V, Soussia IB, Naeije R, Mies F. Opposing effects of bone morphogenetic protein-2 and endothelin-1 on lung fibroblast chloride currents. *Am J Respir Cell Mol Biol*;45:1154-1160; 2011.
63. Petecchia L, Sabatini F, Usai C, Carnevali S, Ognibene M, Vanni C, Eva A, Fabbri LM, Rossi GA, Ricciardolo FL. Mechanisms of bradykinin-induced contraction in human fetal lung fibroblasts. *Eur Respir J*;36:655-664; 2010.
64. Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Ertl RF, Rennard SI. Regulation of fibroblast

proliferation in three-dimensional collagen gel matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*;32:427-433; 1996.

65. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*;260:3440-3450; 1985.

66. Ikebe D, Wang B, Suzuki H, Kato M. Suppression of keratinocyte stratification by a dominant negative junb mutant without blocking cell proliferation. *Genes Cells*;12:197-207; 2007.

67. Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T, Kato M, Komiyama K, Abiko Y, Ito K, Otsuka K, Kappert K. Tgf- β signaling in gingival fibroblast-epithelial interaction. *J Dent Res*;89:1315-1321; 2010.

68. O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol*;128:1153-1162; 2011.

69. Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-apb) is a reliable blocker of store-operated ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of insp3-induced ca^{2+} release. *FASEB J*;16:1145-1150; 2002.

70. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*;59:5002-5011; 1999.

71. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res*;250:273-283; 1999.

72. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*;12:2730-2741; 2001.

73. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP,

Lafitte JJ, Sculier JP. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: Systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*;91:2018-2025; 2004.

74. Wen FQ, Kohyama T, Skold CM, Zhu YK, Liu X, Romberger DJ, Stoner J, Rennard SI. Glucocorticoids modulate tgf-beta production. *Inflammation*;26:279-290; 2002.

75. Jakowlew SB, Mathias A, Chung P, Moody TW. Expression of transforming growth factor beta ligand and receptor messenger rnas in lung cancer cell lines. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*;6:465-476; 1995.

76. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov

JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*;483:603-607; 2012.

77. Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res*;69:2783-2791; 2009.

78. Saito RA, Micke P, Paulsson J, Augsten M, Peña C, Jönsson P, Botling J, Edlund K, Johansson L, Carlsson P, Jirström K, Miyazono K, Ostman A. Forkhead box f1 regulates tumor-promoting properties of cancer-associated fibroblasts in lung cancer. *Cancer Res*;70:2644-2654; 2010.

79. Pelaia G, Renda T, Gallelli L, Vatrella A, Busceti MT, Agati S, Caputi M, Cazzola M, Maselli R, Marsico SA. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Respir*

Med;102:1173-1181; 2008.

80. Zhou X, Wu W, Hu H, Milosevic J, Konishi K, Kaminski N, Wenzel SE. Genomic differences distinguish the myofibroblast phenotype of distal lung fibroblasts from airway fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*;45:1256-1262; 2011.

81. 田中明彦 山, 美濃口健治, 小田成人, 岡田真司, 山本真弓, 足立満. マウス喘息モデルでのエバスチンによるアレルギー性気道炎症の抑制効果. *PROGRESS IN MEDICINE*;26:3329-3333; 2006.

82. Miyamoto K, Iwase M, Nyui M, Arata S, Sakai Y, Gabazza EC, Kimura H, Homma I. Histamine type 1 receptor deficiency reduces airway inflammation in a murine asthma model. *International archives of allergy and immunology*;140:215-222; 2006.

83. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*;449:557-563; 2007.

84. Nemunaitis J, Dillman RO, Schwarzenberger PO, Senzer N, Cunningham C, Cutler J, Tong A, Kumar P, Pappen B, Hamilton C, DeVol E, Maples PB, Liu L, Chamberlin T, Shawler DL, Fakhrai H. Phase ii study of belagenpumatucel-l, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*;24:4721-4730; 2006.

85. Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Suppression of transforming growth factor beta1 in lung alveolar epithelium-derived cells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin rna. *Experimental lung research*;37:175-185; 2011.