

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 安部 紘生

2 論文題目

癌関連線維芽細胞の多様性のがん幹細胞性へ及ぼす影響とその機序の解析
－Desmoplastic Reaction (DR) 分類を基軸として

3 論文の内容の要旨（博士：2,000字程度）

1) 目的

申請者の所属する講座では、癌関連線維芽細胞（cancer-associated fibroblasts: CAFs）を中心とした間質細胞により形成される線維性癌間質反応（desmoplastic reaction: DR）に着目し、大腸癌のDRを形態的特徴により immature、intermediate、mature の3群に分類することで予後予測因子として極めて有用であることを報告してきた。しかしながら、DRの多様性の背景となる分子生物学的機構は明確になっておらず、さらに癌の悪性度に関与する機序についても明らかではない。

腫瘍悪性度には癌の浸潤、転移能や治療抵抗性を高める癌細胞亜分画であるがん幹細胞の存在が関与するとされている。CAFsにはがん幹細胞のニッチを形成する役割があり、DR分類が癌間質の形態学的特徴によって大腸癌の予後を層別化できることから、DRがCAFsを含むがん幹細胞ニッチの多様性を病理組織学的に反映した事象であり、がん幹細胞性と関連するという仮説を立てた。そこで、本研究はDR分類別に分離培養したCAFsが大腸癌のがん幹細胞性に与える影響について明らかにするとともに、その分子生物学的機序を解明することを目的とした。

2) 対象および方法

大腸癌の新鮮凍結標本から腫瘍、癌間質部を選択的に採取し、がん幹細胞関連遺伝子群の発現をDR分類別に網羅的に評価した。まず、大腸癌の切除検体からCAFsを分離・培養し、大腸癌株化細胞とCAFsを共培養することで、CAFsによって癌細胞におけるがん幹細胞性が変化するかを、Sphere formation assay、real-time PCR法、イムノブロット法、ALDEFLOUR assayを用いてDR分類別に評価した。同様に、大腸癌株化細胞とDR分類別の各CAFsを混合してそれぞれマウスの皮下に移植し、生着率の比較からがん幹細胞性の差異をin vivoモデルで検討した。

次に、CAFsが大腸癌のがん幹細胞性に影響を与える機序の候補としてperiostin (POSTN) およびその発現に関連するとされるTGF- β シグナル（特にTGF- β 1）に着目し、DR分類別に培養した各CAFsとこれらの因子の発現について解析した。さらに、CAFsにおけるPOSTNの発現を抑制することでCAFsによるがん幹細胞性への影響に変化が生じるかについて、DR分類別に評価した。

最後に、癌間質におけるインターロイキンの発現に着目し、選択的に採取した癌間質部におけるサイトカインの発現をDR分類別に評価した。また、DR分類別

に培養した各 CAFs からの IL-6 の分泌を ELISA 法で評価するとともに、POSTN の刺激による各 CAFs の IL-6R の発現および IL-6 の分泌における変化を比較した。さらに、CAFs における IL-6/STAT3 シグナルと POSTN の相互作用に着目し、CAFs における IL-6 の活性化と POSTN の関連や、IL-6 中和抗体を用いることによるがん幹細胞性への影響についてイムノブロット法などを用いて評価した。

3) 結 果

選択的な腫瘍部、癌間質部の評価にて、DR が mature な腫瘍と比較して immature な腫瘍ではがん幹細胞性関与の遺伝子群が有意に高発現していた。DR 分類別に培養した CAFs と大腸癌株化細胞との共培養では、mature 由来の CAFs (CAF^{mature}) との共培養と比較して、immature 由来の CAFs (CAF^{immature}) が大腸癌細胞のがん幹細胞性を有意に亢進させた。

DR が immature である癌間質では POSTN が高発現しており、CAF^{mature} と比較して CAF^{immature} では POSTN の分泌が高度であった。さらに CAF^{immature} における POSTN の発現を抑制することで、共培養した大腸癌株化細胞の TGF- β シグナルが抑制され、がん幹細胞性も有意に抑制された。

DR が immature である癌間質では、多種のインターロイキンが高発現していた。CAF^{mature} と比較して CAF^{immature} で IL-6 の分泌が高度であり、POSTN 添加の刺激を受けて CAF^{immature} の IL-6 の分泌が亢進すると共に、CAFs に IL-6R の発現が誘導された。さらに、IL-6 の添加刺激により CAF^{immature} における IL-6/STAT3 シグナルを活性化すると、POSTN の分泌が促進された。

4) 考 察

本研究では DR 分類別に CAFs を分離培養して検討に用いることで、CAF^{immature} が大腸癌のがん幹細胞性を有意に亢進させることが確認され、一方 CAF^{mature} はがん幹細胞性に対してむしろ抑制的に作用している可能性が示された。腫瘍微小環境における POSTN の発現によって TGF- β 1 や Smad2/Smad3 の発現に変化を来すことが確認されたことから、TGF- β シグナルを介して POSTN が大腸癌のがん幹細胞性に影響を及ぼしていると考えられた。CAF^{immature} では POSTN と IL-6/STAT3 シグナルに positive feedback 機構が存在しており、これによって POSTN の分泌が強く促進されることが、CAF^{immature} が大腸癌のがん幹細胞性を亢進させる機序の一つであると考えられた。

5) 結 論

CAFs ががん幹細胞性に及ぼす影響を検討し、これが DR 分類によって異なることを明らかにした。この機序には CAFs における POSTN 発現の多寡が関与しており、CAF^{immature} で高度に発現される POSTN は TGF- β シグナルおよび IL-6/STAT3 シグナルを介してがん幹細胞性を亢進させることが示唆された。

4 キーワード (5 個程度)

「大腸癌」「desmoplastic reaction」「がん幹細胞性」「cancer-associated fibroblasts」「periostin」