

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

安部 紘 生

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

目 次

第 1 章	緒言	1 頁
第 2 章	DR 分類別の CAFs が大腸癌細胞のがん幹細胞性に及ぼす影響	
	第 1 節 背景と目的	5 頁
	第 2 節 対象と方法	6 頁
	第 3 節 結果	14 頁
	第 4 節 考察	19 頁
	第 5 節 小括	21 頁
第 3 章	DR 分類別の CAFs が大腸癌細胞のがん幹細胞性に影響を及ぼす機序	
	第 1 節 背景と目的	22 頁
	第 2 節 対象と方法	23 頁
	第 3 節 結果	28 頁
	第 4 節 考察	34 頁
	第 5 節 小括	36 頁
第 4 章	DR 分類別の CAFs における POSTN と IL-6/STAT3 シグナルの関与	
	第 1 節 背景と目的	38 頁
	第 2 節 対象と方法	38 頁
	第 3 節 結果	42 頁

第4節 考察	45頁
第5節 小括	47頁
第5章 全体の考察	48頁
第6章 結論	50頁
謝辞	51頁
略語一覧	52頁
引用文献	53頁
図表	63頁

第1章 緒言

大腸癌は部位別がん罹患数、死亡数ともに上位に位置しており、国内で患者数は毎年増加している。その中で切除不能な進行大腸癌、再発大腸癌も一定の割合を占めており、これらの治療抵抗性の高い進行・再発大腸癌に対してより有効な治療法の開発が課題となっている。大腸癌治療においては、術後補助化学療法最適化、再発症例に対する手術、化学療法、放射線療法などの集学的治療の適切な選択が予後の改善に重要な役割を果たしている(1, 2)。大腸癌の診療では壁深達度、リンパ節転移、遠隔転移からなる Stage 分類が予後の層別化に用いられているが、近年の抗癌剤の急速な多様化に代表される大腸癌の集学的治療の進歩に伴い、治療方針の選択に資する情報としては Stage 分類のみでは不十分であることが認識されつつある(3-5)。今後、大腸癌の予後をさらに向上させるために、個々の腫瘍の悪性度指標や治療効果予測のためのバイオマーカーの開発に加え、新たな治療標的因子の同定が喫緊の課題となっている。

癌組織は癌細胞と癌間質で構成される。大腸癌領域では簇出に代表される腫瘍先進部の癌細胞の脱分化所見が癌の悪性度をよく反映することが知られている(4)。さらに、近年では癌細胞の周囲を取り巻く癌間質の多様性と、これが腫瘍の浸潤・転移に影響を及ぼす機序が注目されている(6, 7)。癌間質を形成する骨髄由来の免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞や、さらにこれらの間質細胞の間に介在する細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) が活性化した状態で癌細胞周囲に存在することで、個々の癌に特異的な微小環境を形成していると考えられている(6)。その中でも癌細胞が浸潤する際に線維芽細胞を主体とした間質細胞が増生し、膠原線維が領域性をもって蓄積する状態が線維性癌間質反応 (desmoplastic reaction: DR) である(8)。本邦における大腸癌取扱い規約では、線維成分の多寡を基準に髄様型、中間型、硬性型の3つに分類する評価方法が

用いられてきたが(9)、ほとんどの大腸癌は中間型に分類されるため、この評価の臨床的意義は乏しい状況にある。一方、Ueno らは、大腸癌の間質を量的ではなく質的に評価する方法として、腫瘍の発育先進部に特異的に出現する myxoid な間質や keloid-like collagen の存在を指標として DR 形態を immature、intermediate、mature の 3 群に分ける「DR 分類」を提唱している。Stage II, III 大腸癌における DR 分類別の 5 年無再発生存率 (relapse-free survival: RFS) は immature 群で 49~51%、intermediate 群で 72~78%、mature 群で 85~87%と、DR 分類が大腸癌の予後予測因子として極めて有用であり(10, 11)、多施設研究での検討においても予後の層別化が同様に可能であったことが示されている(4)。また、DR 分類は主組織型、壁深達度、リンパ節転移、脈管侵襲といった従来の臨床病理学的因子を凌ぐ、独立した予後予測因子であることが示唆されており(11)、日本臨床腫瘍研究グループによって現在進行中の『「再発リスク因子」を有する Stage II 大腸癌に対する術後補助化学療法の有用性に関するランダム化第 III 相比較試験 (JCOG1805)』では、再発リスクの高い患者を抽出するための選択基準の一つとして DR 分類が使用されている(12)。DR 分類は Hematoxylin-eosin (HE) 染色標本のみで評価可能であるため簡便性に優れており、実臨床における新たな治療指標となることが期待される。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連する機序についても明らかではない。

DR の形成には、ECM の産生と分解が強く関与しており、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAFs) がその中心的な役割を担っていると考えられている(7, 13)。腫瘍微小環境で形成されている複雑な細胞間相互作用において、CAFs が細胞外マトリックス分子、成長因子、蛋白質分解酵素、および免疫調節性サイトカインなどを生成することにより、腫瘍微小環境の調節に重要

な役割を果たしていることが理解されつつあり(14, 15)、CAFが癌治療における標的細胞の一つとなることが期待されている(16-18)。

さらに、CAFにはがん幹細胞 (Cancer stem-like cell) の幹細胞性をサポートするニッチ細胞としての役割が示唆されている。がん幹細胞は、①高い造腫瘍能、②自己複製能、③多分化能を有するがん細胞亜分画と定義され、がん幹細胞がその形質を変化させながら浸潤、転移能や治療抵抗性を高めていると報告されている(19, 20)。これに関連する重要なメカニズムとして、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が挙げられる。EMTは、正常発生において観察される現象で、外胚葉から一部が離脱して未分化性を獲得した後に中胚葉を構成する過程に重要な役割を担う。腫瘍では、EMTの分子機構下に腫瘍細胞が上皮細胞としての特性を失い、間葉系の形質を獲得することで浸潤性を獲得して血管やリンパ管に侵入する。また、脈管に侵入した腫瘍細胞は逆の過程である間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: MET) を通じて、今度は脈管から転移臓器組織に侵入する。これらの過程を通じてがん幹細胞の特性を保持している細胞が転移巣を形成すると考えられている(21, 22)。正常組織では組織幹細胞は様々な支持細胞群からなる微小環境の中で維持されており、この微小環境は「幹細胞ニッチ」と称される。通常、組織幹細胞はニッチの中で静止期にとどまっており、ニッチからのシグナルにより自己複製あるいは分化を開始する。同様に、がん幹細胞もニッチからのシグナルにより自己再生や増殖分化の制御を受けていると考えられ、がん幹細胞とがん幹細胞ニッチの双方が癌の再発、転移、薬剤耐性において主要な役割を果たしている(17, 20)

(図1)。

上述した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はCAF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、がん幹細胞性に関与するという仮説が立てられる。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し、さらにその分子生物学的機序を解明することを目的とした。

第2章 DR 分類別の CAFs が大腸癌細胞のがん幹細胞性に及ぼす影響

第1節 背景と目的

腫瘍を構成する細胞はすべてが均一ではなく、一部の細胞が正常組織の幹細胞同様に自己複製能と多分化能の二つの特徴を有するというがん幹細胞仮説は1960年代に Bruce らによって初めて提唱され(23)、2006年米国癌学会にて、がん幹細胞は「腫瘍内に存在し、自己複製能と腫瘍組織を構成するさまざまな系統のがん細胞を生み出す能力を併せ持つ細胞」と定義された(6, 24)。1997年、急性骨髄性白血病の白血病幹細胞が同定されて以来(25)、乳癌(26)、大腸癌(27)、膀胱癌(28)、神経膠腫(29)等の多種多様ながん種においてがん幹細胞の存在が指摘されてきた。がん幹細胞は CD44、CD133 などの代表的な細胞表面マーカーに加えて Nanog、SOX2、Oct4 などの転写因子の発現によって特徴付けられる(30-35)。複数の研究において、CD44、CD133、Nanog、SOX2、Oct4 などの細胞表面マーカー・転写因子の組み合わせと、*in vitro* におけるスフェロイドの形成によってがん幹細胞の特徴付けが行われている(33, 36-39)。

がん幹細胞が未分化性を維持しつつ、自己複製能と多分化能という2大形質を呈する上で、腫瘍随伴マクロファージや CAFs 等の間質細胞、各種サイトカイン、細胞外マトリックスなどによって構成される腫瘍微小環境の関与は必須であり、これらはニッチと称される(40)。正常造血幹細胞は、骨髄に存在する骨芽細胞によって構成されるニッチからのシグナルによって幹細胞性を維持していることが知られており(41)、同様に、がん幹細胞にも同様のニッチが存在すると考えられ(42)、癌が少数の遺残細胞から再発する現象や原発巣と異なる組織・臓器で少数の細胞から転移巣を形成するメカニズムにはこのがん幹細胞とニッチの関係が重要な役割を果たすと考えられている(43, 44) (図1)。近

年、CAFsには癌の腫瘍形成や増殖・浸潤に抑制的に作用するCAFsと促進的に作用するCAFsが報告されており、その二面性が注目されている(45-47)。DR分類が大腸癌の予後と強い関連を示す背景として、CAFsがニッチを介してがん幹細胞に及ぼす作用がDR分類別に異なるのではないかと仮説をたて、これを証明するため、大腸癌切除検体よりDR分類別に分離培養したCAFsを用いて大腸癌のがん幹細胞性への影響について検討を行った。

第2節 対象と方法

1) 対象症例

2017年3月から2022年3月の間、防衛医科大学校病院にて原発巣切除を施行した深達度pT3以上のpStage II, IIIの大腸腺癌56例（右側結腸癌12例、左側結腸癌21例、直腸癌23例）を対象とし、術直後の切除検体から細胞培養用検体と新鮮凍結標本用検体をそれぞれ採取した。対象症例は男性32人、女性24人であり、平均年齢は61.1歳であった。なお、術前化学療法を施行した症例は本研究から除外した。術前に検体採取候補となる全ての患者に対し、防衛医科大学校倫理委員会から承認を得た文書を用いて同意取得を行った。なお、本研究の研究計画はヘルシンキ宣言に従って作成し、本校の倫理委員会の承認を受けた（承認番号2736・4022）。

2) DR分類の評価

全症例において、通常の病理診断用に作製されたHE標本を用いて、既報のDR分類の評価法に従い(48)、immature、intermediate、matureの3群に分類した。すなわち、均一な両染色あるいは好塩基性の細胞外基質が増量したmyxoidな間質が対物40倍視野全体を占めるものをimmature、基準を満たすmyxoidな

間質が存在しない場合には、好酸性のヒアリン化した幅の広い断片状の膠原線維 (keloid-like collagen) が存在するものを intermediate、myxoid な間質および keloid-like collagen がいずれも存在しないものを mature (一般的に、多層に層化された細かい線維を認めることが多い) と判定した(10, 12) (図 2)。

3) レーザーマイクロダイセクション (laser-microdissection: LMD) を用いて採取した大腸癌組織検体における RNA 発現の網羅的解析

DR 分類別に各 4 例、計 12 例について、手術検体の摘出直後に採取した癌部漿膜下層を含む一割面分の標本を、Tissue-Tek OCT Compound™ (Sakura, Tokyo, Japan) を用いて包埋し、液体窒素で急速凍結した後、-80°C 下に保存した。保存した標本から 10 μm 厚の連続凍結切片を作製し、エタノール加 5% 酢酸で 3 分間固定を行った。RNase free 水で洗浄した後、hematoxylin で 30 秒間染色し、切片を風乾した。LMD6000™ (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて DR 分類別に腫瘍先進部の腫瘍領域および癌間質領域、正常粘膜下組織を選択的に採取した (図 3A)。採取したサンプルを RNAeasy mini kit™ (Qiagen, Tokyo, Japan) を使用して、total RNA を抽出した。Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて RNA 6000 Pico LabChip™ (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) で RNA の精度評価および定量を行った。抽出した total RNA は、nCounter® PanCancer Progression および Immune Profiling パネル (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) (49) を使用して、各サンプルについて 1402 種の遺伝子発現を網羅的に評価した。NanoString nSolver™ 解析ソフトウェアに基づきがん幹細胞性に関連する 45 の遺伝子の正常組織との相対値からがん幹細胞関連スコアを算出した (図 3B, 4, 表 1)。使用したパネルは既報の論文においても、一般的に使用されているものである(50) (51)。

4) 細胞培養（大腸癌細胞および線維芽細胞）

大腸癌株化細胞 HCT-116、HT-29、および SW480 は、それぞれ American Type Culture Collection (ATCC) および Riken BRC cell bank (Riken, Tsukuba, Japan) から購入した。摘出直後の大腸癌手術検体から癌部および非癌部について約 2-3 mm 角の漿膜下層組織をそれぞれ採取し、CAF_s および非癌部線維芽細胞 (non-cancer-associated fibroblasts: NF_s) を培養した (図 5A)。なお、非癌部漿膜下層組織は切除検体の口側断端 (腫瘍から 10cm 以上離れた部位) から採取した。また、腫瘍の heterogeneity を考慮し、癌部に関しては 1 症例あたり 3 カ所の漿膜下組織を採取した。採取した組織を 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および抗生剤 (100 IU/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEMTM) (Wako, Osaka, Japan) 培地上で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。3 回以上継代することで、純度の高い CAF_s と NF_s を抽出し、それぞれ 3-7 継代したものを実験に使用した。DR 分類が immature である症例から培養した CAF_s を CAF_s^{immature} とし、同様に CAF_s^{intermediate}、CAF_s^{mature} とに区分して以降の検討に使用した。

5) Sphere formation assay によるがん幹細胞性の評価

非接着性の 96 well 超低接着プレート (Corning, Corning, NY, USA) を使用して、大腸癌株化細胞 HCT116、HT29、および SW480 を下記に示す完全無血清培地でインキュベートした。1 細胞/well、10 細胞/well、10² 細胞/well、および 10³ 細胞/well の大腸癌株化細胞を各濃度 24 well ずつに播種し、インキュベーション開始から 1 週間後に Sphere を形成している well 数の総計を評価した。

なお、Sphere の形成は直径 100 μ m 以上のコロニーが存在することと定義した。DR 分類別の線維芽細胞が大腸癌株化細胞のがん幹細胞性に及ぼす影響を評価するため、DR 分類別の 10³ 個の各 CAFs または NFs と 1、10、10²、および 10³ 個の大腸癌株化細胞をそれぞれ共培養し、上記と同様に Sphere を形成する well 数を評価した。培養中に各濃度（大腸癌株化細胞の濃度勾配：10 倍）において Sphere を形成した well 数からがん幹細胞の割合を定量化して算出される Cancer stemness frequency を、ELDA Web system [ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis for stem cell research (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>)]によって解析した(52)。

無血清培地の組成：

DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific)

20 ng/mL basic fibroblast growth factor (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

20 ng/mL epidermal growth factor (R&D Systems)

Penicillin-Streptomycin 1% (Thermo Fisher Scientific)

N2 supplement 1% (Thermo Fisher Scientific)

Sodium pyruvate 1% (Thermo Fisher Scientific)

6) 培養細胞におけるがん幹細胞性関連遺伝子の発現解析

がん幹細胞性関連遺伝子（CD44、CD133、Nanog、SOX2、Oct3/4）の発現を評価するために、DR 分類別の各 CAFs または NFs と大腸癌株化細胞（HCT-116、HT-29、SW480）をそれぞれ 1:1 の比率（各 5.0 \times 10⁴ 個）で 7 日間共培養した。また、Control として大腸癌株化細胞を単独で培養した。培養細胞に ISOGEN IITM (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を加えてホモジナイズし、製品プロト

コルに従って total RNA の抽出を行った。単鎖 cDNA の合成は、抽出した total RNA を鋳型として Prime Script RT-reagent KitTM (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて行った。

作製した cDNA を鋳型として Thermal Cycler Dice Real-Time System TP800TM (Takara Bio) および SYBR Premix Ex Taq IITM (Takara Bio)を用いて CD44、CD133、Nanog、SOX2、および Oct3/4 の mRNA 発現を半定量的に解析した。リアルタイム PCR に用いたプライマー (Perfect Real Time Support SystemTM, Takara Bio) と PCR プロトコルは下記の通りである。

CD44 増幅産物サイズ 85 bp

Forward primer: 5'-TGTGCTTAACAGGCAATGCTTC-3'

Reverse primer: 5'-CTGTCTAAGCCCAGCCCTGA-3'

CD133 増幅産物サイズ 184 bp

Forward primer: 5'-AGTGGCATCGTGCAAACCTG-3'

Reverse primer: 5'-CTCCGAATCCATTCGACGATA-3'

Nanog 増幅産物サイズ 72 bp

Forward primer: 5'-CTGAGATGCCTCACACGGAGA-3'

Reverse primer: 5'-CAGGGCTGTCCTGAATAAGCAGA-3'

SOX2 増幅産物サイズ 82 bp

Forward primer: 5'-GTGAGCGCCCTGCAGTACAA-3'

Reverse primer: 5'-GCGAGTAGGACATGCTGTAGGTG-3'

Oct3/4 (POU5F1) 増幅産物サイズ 73 bp

Forward primer: 5'-GCTGGATGTCAGGGCTCTTTG-3'

Reverse primer: 5'-TTCAAGAGATTTATCGAGCACCTTC-3'

GAPDH 増幅産物サイズ 138 bp

Forward primer: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

Reverse primer: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

PCR プロトコル :

(初期変性) 95°C、30 秒

(アニーリング・伸長) 95°C、5 秒 → 60°C、30 秒 (40 サイクル)

全ての反応は二重反復試験で行い、平均値をもって結果とした。PCR の反応終了後に融解曲線分析にて増幅産物の特異性を確認した。mRNA の相対的発現量は内因性標準遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) により発現を補正し、Multiplate RQ™ (Takara Bio) ソフトウェアを用いて $\Delta\Delta$ Ct 法で評価した。

7) イムノブロット法によるがん幹細胞性関連蛋白質の発現解析

がん幹細胞性関連蛋白質 (Nanog、SOX2、Oct4) の発現を評価するために、DR 分類別の各 CAFs または NFs と大腸癌株化細胞 (HCT-116、HT-29、SW480) をそれぞれ 1:1 の比率 (各 5.0×10^4 個) で 7 日間共培養した。また、Control として大腸癌株化細胞を単独で培養した。

培養したサンプルにそれぞれ 2×sodium dodecyl sulfate (SDS) -sample buffer および還元剤を加え、Bioruptor[®] (BM Equipment, Tokyo, Japan) で破碎し、12,000 rpm で 10 分間遠心した後、100°C で 5 分間インキュベートした。各試料 80µl 中の蛋白質を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12.5% アクリルアミドゲル) により分離し polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (GE Healthcare, Tokyo, Japan) に転写した。PVDF 膜に Block-Ace[™] (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を添加し、2 時間室温で攪拌した後にマウス抗 Nanog 抗体 (5 µg/mL, #1E6C4; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、ラビット抗 SOX2 抗体 (5 µg/mL, ab97959; Abcam, Cambridge, UK)、ラビット抗 Oct4 抗体 (5 µg/mL, #2840S; Cell Signaling Technology) およびマウス抗 GAPDH 抗体 (1 µg/mL, ab125247; Abcam) とそれぞれ 4°C で一晩インキュベートした。一次抗体との反応後に 0.1% の Tween[®]-20 を含む PBS (PBS-T) で 10 分間、計 3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) 抗体 (DAKO, Grostrup, Denmark) と室温で 2 時間反応させた。標的とした免疫反応性バンドの検出については、PBS-T にてメンブランを 10 分間、計 5 回洗浄し、ECL 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を加えて 5 分間反応させた後、Image Quant LAS 4000 システム[™] (GE Healthcare Japan) により評価し、抗 GAPDH 抗体のバンドを Control として定量化した。蛋白質の発現は、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて解析した。

8) ALDEFLUOR assay による Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 1 活性細胞の評価

ALDH1 は各種組織幹細胞に広く発現しており、がん幹細胞でも高度に活性化していることが報告されている(53)。大腸癌株化細胞単独または DR 分類別の各 CAFs と共培養したものについて、ALDEFLUOR assay kit (Stem Cell Technologies, Durham, NC, USA) を用いて ALDH1 活性を定量化した。評価対象

の細胞を、ALDH1 基質である BODIPY®-amino acetaldehyde (BAAA) 1.5 mM を加えたバッファーで 37°C, 60 分インキュベートし反応させることで、BODIPY®-amino acetate (BAA) が産生され蛍光発色する ALDH1 高活性の細胞をフローサイトメトリーによって分離した。なお、ALDH1 に特異的な阻害剤である diethylaminobenzaldehyde (DEAB) を用いて Negative Control とした。フローサイトメーターとして FACS Aria II™ (BD Bioscience, New Bedford, MA, USA) を使用し、Negative Control に対する fluorescein isothiocyanate (FITC) 陽性細胞の割合を ALDH1 高活性細胞の割合とした。

9) マウスを用いた腫瘍異種移植による tumor formation assay

動物実験における全ての手順は、防衛医科大学校における実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。(組換え DNA 実験従事者承認番号：522、動物実験倫理審査承認番号：18005)

in vivo における腫瘍形成能を評価するために、ルシフェラーゼと Venus 融合蛋白質 (ffLuc-cp156) を恒常的に発現する大腸癌株化細胞 (HCT-116^{ffLuc-cp156} および HT-29^{ffLuc-cp156}) を次の要領で作製した。

HCT-116 および HT-29 と lentivirus 上清 (ffLuc-cp156) を 48 時間共培養して核酸導入を行ったのち継代を繰り返し、ffLuc-cp156 陽性細胞 (HCT-116^{ffLuc-cp156} または HT-29^{ffLuc-cp156}) を、Cell Sorter SH800STM (SONY, Tokyo, Japan) を用いて分離した。得られた細胞の 95%以上が緑色蛍光蛋白質 (GFP, green fluorescent protein) 陽性であることを確認した(54)。

作製した HCT-116^{ffLuc-cp156} または HT-29^{ffLuc-cp156} 細胞 (それぞれ 1×10^2 個、 1×10^3 個、および 1×10^4 個ずつ) と DR 分類別に培養した CAFs^{mature} または CAFs^{immature} (1×10^4 個) を 50 μ l の PBS に懸濁し、BALB/cSlc-nu/nu マウス (オ

ス, 5~6 週齢, SLC, Shizuoka, Japan) の背部皮下に懸濁した細胞を注入移植した。In Vivo Imaging System (IVIS)-100 (Xenogen Corporation, Alameda, CA, USA) を用いた生物発光イメージングにて、移植細胞の生着を毎週監視し、平均光子数 (Total Flux) の測定を行った(55)。大腸癌株化細胞のみの移植を Control とした。各移植細胞をそれぞれマウス 3 匹の背部左右に 1 ヶ所ずつ、計 6 ヶ所に移植した。最終的な腫瘍の生着の有無を移植後 14 日目に判断し、移植の 28 日後に 5%イソフルランの吸入にて対象マウスを犠死させた。Sphere formation assay と同様に Cancer stemness frequency を、ELDA Web system によって解析した。

10) 統計学的解析

独立した連続変数における 2 群間の比較には、Student's t 検定または Mann-Whitney U 検定を使用した。3 群以上の比較には、Kruskal-Wallis 検定を使用した。Kruskal-Wallis 検定にて有意差が示された場合には Steel-Dwass 検定を用いて多重比較を行った。2 群間の関連は、カイ二乗検定で検討し、母集団が少なく期待値が 5 未満となる場合には Fisher の直接確率法を使用した。p 値 < 0.05 を有意とし、各統計計算は JMP® Pro 14 ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

第 3 節 結果

1) DR 分類別の RNA 発現の網羅的な評価におけるがん幹細胞関連スコアおよび EMT 関連遺伝子との関連

LMD を用いて採取した mRNA 発現の網羅的解析による腫瘍領域のがん幹細胞関連スコアの中央値は、mature 群で -1.6 (範囲: -2.9~-0.8)、intermediate 群で -0.5 (-3.6~0.6)、immature 群で 1.6 (0.6~6.9) であり、immature 群で mature

群や intermediate 群よりも有意に高かった (vs mature 群 $p < 0.01$ 、vs intermediate 群 $p < 0.05$) (図 3B)。また、癌間質領域における同スコアの中央値は、mature 群で-1.6 (-4.5~3.2)、intermediate 群で-0.3 (-1.9~0.3)、immature 群で 1.7 (1.0~2.7) であり、intermediate 群より immature 群で有意に高かったが ($p < 0.05$)、癌間質領域においては、mature 群と immature 群に有意差は認めなかった。がん幹細胞性に関与すると報告されている EMT 関連遺伝子の発現を検討したところ、TWIST1、TWIST2、および CDH2 を含む 20 以上の EMT 関連遺伝子が immature 群で高発現している遺伝子として検出された (図 4)。さらに、がん幹細胞性に関連する代表的な遺伝子である SOX2 は、腫瘍領域、癌間質領域ともに mature 群に比較して immature 群で高発現していた。

2) DR 分類別の CAFs 培養細胞による大腸癌株化細胞のがん幹細胞性への影響 (in vitro における検討)

原発巣の DR 分類別の CAFs 培養に成功した 45 例 (mature、intermediate、immature それぞれ 15 症例) の CAFs を実験に使用した。CAFs の性質を確認するため、定性 PCR により、線維芽細胞マーカーの α -smooth muscle actin (α SMA)、fibroblast-specific protein-1 (FSP-1)、fibroblast activation protein (FAP) が陽性であることを確認するとともに、単球マーカーの Cluster of differentiation 14 (CD14)、血管内皮マーカーの CD31、リンパ球マーカーの CD45、造血系前駆細胞マーカーの CD34、腸管上皮マーカーの cytokeratin 20 (CK20) が陰性であることを確認した (図 5B)。

in vitro の検討 (以下のア~エの検討) では、大腸癌株化細胞のみでの培養環境下でのサンプルの評価値を基準として (Control 群)、NFs および CAFs 共培養環境下でのサンプルの評価値を相対値で算出し、各 CAFs との共培養群の解

析値について NFs との共培養群を対照群として比較検討を行った。

ア) Sphere formation assay によるがん幹細胞性の評価

Control 群と比較して、CAFs との共培養により形成される Sphere は大きい傾向を示した (図 6A)。NFs との共培養群と比較して CAFs^{intermediate}、CAFs^{immature} との共培養群では Sphere を形成した well 数が有意に増加しており、ELDA の解析による Cancer stemness frequency の平均値 (±SD) は、NFs、CAFs^{mature}、CAFs^{intermediate}、CAFs^{immature} 共培養群において、HCT116 ではそれぞれ 2.9 ± 1.2 、 2.3 ± 1.0 、 5.5 ± 3.9 、 10.2 ± 8.1 、HT29 ではそれぞれ 2.6 ± 2.0 、 3.1 ± 1.9 、 5.4 ± 4.7 、 6.2 ± 4.2 、SW480 ではそれぞれ 1.9 ± 0.7 、 2.2 ± 2.1 、 4.0 ± 2.4 、 8.5 ± 4.6 であり、いずれも CAFs^{intermediate}、CAFs^{immature} との共培養群で有意に高頻度であった (各 15 例、全て $p < 0.01$) (図 6B)。一方、CAFs^{mature} の共培養群では NFs の共培養群と有意な差を認めなかった。

イ) リアルタイム PCR によるがん幹細胞性関連遺伝子発現の評価

DR 分類別の CAFs または NFs と大腸癌株化細胞 (HCT116) の共培養下における培養細胞群のがん幹細胞性関連遺伝子 (CD44、CD133、Nanog、SOX2、Oct3/4) の mRNA 発現を評価した。大腸癌株化細胞のみの培養環境下でのサンプルの評価値を基準とすると、各がん幹細胞性関連遺伝子の発現はいずれの遺伝子も CAFs^{immature}、CAFs^{intermediate}、CAFs^{mature} との共培養群の順でより高度な発現を示し、特に、CAFs^{immature} との共培養で、CD44 は 8.8 ± 3.4 倍、CD133 は 7.6 ± 5.7 倍、Nanog は 7.7 ± 3.0 倍、SOX2 は 3.0 ± 1.7 倍、Oct3/4 は 10.5 ± 4.2 倍 (いずれも平均値±SD) であり、NFs との共培養群と比較してすべての遺伝子

が有意に高発現していた（全て $p < 0.01$ ）（図 7）。CAF^{mature} との共培養では、NFs との共培養群と比較して遺伝子の発現が低下する傾向を認めたが、有意差は認めなかった。また、他の大腸癌株化細胞（HT-29、SW480）を使用しても同様の傾向を認めた。HT-29 の検討においては、CAF^{intermediate} との共培養においても NFs との共培養群と比較して CD133 を除くすべての遺伝子の発現が有意に高発現していた。

ウ) イムノブロット法によるがん幹細胞性関連蛋白質の発現の評価

DR 分類別の各 CAFs または NFs と大腸癌株化細胞（HCT116）の共培養におけるがん幹細胞性に関与する Nanog、SOX2、Oct4 の蛋白質の発現を、大腸癌株化細胞のみの培養環境下でのサンプルの評価値を基準として評価した。NFs との共培養群で Nanog は 3.6 ± 1.5 倍、SOX2 は 7.5 ± 1.4 倍、Oct4 2.2 ± 1.6 倍（いずれも平均値 \pm SD）であった。CAF^{intermediate} との共培養群で Nanog は 6.1 ± 4.6 倍、SOX2 は 18.8 ± 4.2 倍、Oct4 7.0 ± 3.8 倍であり、CAF^{immature} との共培養群では Nanog は 11.9 ± 7.8 倍、SOX2 は 35.2 ± 8.9 倍、Oct4 は 8.5 ± 6.2 倍であった。NFs との共培養群と比較した場合、CAF^{intermediate} と CAF^{immature} との共培養群において、これらのがん幹細胞性関連蛋白質が有意に高発現していた（全て $p < 0.01$ ）（図 8）。一方、CAF^{mature} との共培養群では Nanog は 2.1 ± 0.5 倍、SOX2 は 3.6 ± 0.5 倍、Oct4 は 1.3 ± 0.5 倍であり、いずれも NFs との共培養群と比較してがん幹細胞性に関連する蛋白質の発現が有意に低かった。

以上の結果については、他の大腸癌株化細胞（HT-29、SW480）を使用しても同様の傾向を認めた。

エ) ALDEFLUOR assay による高 ALDH1 活性細胞集団の評価

各共培養のサンプルの解析に先立って、大腸癌株化細胞、NFs、DR 分類別の各 CAFs のみの細胞分布を確認し、大腸癌株化細胞の細胞分布に沿ってゲーティングしてから、各共培養サンプルの ALDH1 活性を評価した (図 9A)。大腸癌株化細胞 HCT116 の検討における ALDH1 活性の高い細胞群比率 (平均値 ± SD) は、NFs、CAF_s^{mature}、CAF_s^{intermediate}、CAF_s^{immature} 共培養群でそれぞれ 8.4 ± 1.7%、7.6 ± 3.0%、12.5 ± 1.8%、18.1 ± 3.4% であり、NFs との共培養群と比較して CAF_s^{intermediate}、CAF_s^{immature} との共培養群では ALDH1 活性の高い細胞群比率が有意に高かったが (CAF_s^{intermediate} 共培養群: $p < 0.05$ 、CAF_s^{immature} 共培養群: $p < 0.01$) (図 9B)、CAF_s^{mature} との共培養群では有意差を認めなかった。また、HT29、SW480 を用いた検討でも、同様に CAF_s^{intermediate}、CAF_s^{immature} との共培養群では ALDH1 活性の高い細胞群比率が有意に高かった。

3) DR 分類別の CAFs 培養細胞による大腸癌株化細胞のがん幹細胞性への影響 (in vivo における検討)

DR 分類別に培養した CAF_s^{mature} または CAF_s^{immature} と蛍光発色させた大腸癌株化細胞 HCT-116^{fluc-cp156} との共培養細胞のマウス皮下異種移植モデルにおける検討では、移植より 14 日後に IVIS Imaging System により測定された発光強度 (total flux: 平均値) は、移植細胞数 10^2 、 10^3 、 10^4 の順に CAF_s^{mature} 共培養群でそれぞれ 1.0×10^5 、 2.0×10^5 、 2.1×10^7 であるのに対して、CAF_s^{immature} 共培養群ではそれぞれ 1.9×10^6 、 6.0×10^6 、 5.4×10^8 であり、CAF_s^{immature} 共培養群で有意に発光強度 (生着率) が高かった (図 10A)。ELDA により算出される Cancer stemness frequency も HCT116 単独移植群 (Control 群) で 0.017、CAF_s^{mature} 共培養群で 0.18、CAF_s^{immature} 共培養群で 1.8 であり、CAF_s^{immature} 共培

養群で有意に高度であった (図 10B)。また、HT-29^{fluc-cp156} を用いた共培養細胞のマウス皮下異種移植モデルにおいても、同様に CAFs^{immature} 共培養群で有意に Cancer stemness frequency が高度であった。

第 4 節 考察

癌間質を形成する CAFs は膠原線維等の細胞外マトリックスを産生する主たる細胞であり、癌細胞や腫瘍随伴マクロファージを含めた間質細胞とシグナル伝達を行って、腫瘍動態を制御している。しかし、CAFs の生物学的機能には多様性があることが分かってきており、CAFs の特性が異なればその分子生物学的機能・特性も異なると考えられている(7, 56, 57)。近年では、腫瘍の増殖、遊走、浸潤を促進する CAFs だけではなく、それらの機能に対して抑制的に作用する CAFs も報告されている(14)。DR 分類は腫瘍浸潤先進部の癌間質を形態学的に評価する分類法であるが、その評価基準である myxoid な間質や keloid-like collagen の形成に CAFs が中心的な役割を担っていると考えられるため、DR 分類が異なる CAFs ではそれぞれ異なる機能を有していることが推測される。本検討により、DR 分類別に培養された各 CAFs が機能的に異なる集団であることが示された。

CAFs が腫瘍の形成、浸潤、遊走等に促進的に機能することは多数報告されており、肺癌や乳癌において CAFs が癌のがん幹細胞性の誘導に与える影響にも注目が集まっている(19, 58)。一方、前述の通り腫瘍の浸潤や増殖に抑制的に作用する CAFs の存在も報告されていることから(45-47)、がん幹細胞性に及ぼす影響にも多様性があると考えられる。本研究では、DR が immature である大腸癌患者が予後不良である理由として、immature 症例の腫瘍微小環境においては、腫瘍細胞に有利ながん幹細胞性変化があると仮説を立てた。そして、DR

分類別に分離培養した CAFs^{immature} が CAFs^{mature} に比較して大腸癌株化細胞のがん幹細胞性を著しく促進させることを複数の検討で明らかにした。これらの結果は、CAF^s^{immature} が大腸癌細胞の浸潤、転移能や治療抵抗性に関与していることを示唆している。

DR 分類の指標となる keloid-like collagen と myxoid な間質は、腫瘍の浸潤先進部に特異的に観察される形態学的特徴であり、腫瘍の浸潤・増殖の過程における一過性の間質細胞の表現型と考えられる。すなわち、腫瘍進展に抑制的な CAFs が mature な間質を形成し、促進的な CAFs が intermediate や immature な間質を形成すると考えられる。本検討では、CAF^s^{immature} が大腸癌株化細胞のがん幹細胞性を促進することが再現性をもって示された。一方、CAF^s^{mature} については、がん幹細胞性関連蛋白質の評価から、NFs に比較してむしろがん幹細胞性を抑制している可能性が示唆された。しかしながら、がん幹細胞性関連蛋白質以外を評価項目とした検討では、がん幹細胞性の促進作用は認めないものの、抑制的な作用も確認できておらず、マウスを用いた腫瘍異種移植による tumor formation assay の検討を含めて、CAF^s^{mature} ががん幹細胞性を抑制するか否かについては今後の研究課題であると考えられる。

本研究にはいくつかの限界が存在する。第 1 に、今回の検討に使用した CAFs は DR 分類別に大腸癌手術検体から採取しているが、腫瘍先進部の DR には多様性があるため、厳密に DR 分類の判定に一致した癌間質部の CAFs を採取・培養できていたかの確証はない。第 2 に、本研究における大腸癌株化細胞の異種移植モデルは、増殖や浸潤といった通常の大腸癌の生物学的な発育過程を反映しているものではない。ヒト由来の CAFs をマウス生体内へ異種移植した場合、マウスの生体内で CAFs が長期間生存することは難しいことが知られており、今回の異種移植モデルの結果は、DR 分類別に培養された CAFs が大

腸癌株化細胞の増殖や生物学的特性永続的に作用するとは考えにくい。それでも、CAF_s がマウス生体内における大腸癌株化細胞の生着に一定の役割を果たし、マウス内での腫瘍の増殖に影響を与えたことは確実と考えられた。第3に、本検討のほぼすべての実験系では CAF_s と大腸癌株化細胞を共培養したまま検討に用いているため、がん幹細胞性の関連遺伝子や蛋白質がいずれの細胞に由来するのかが確定できていない。このため、大腸癌株化細胞のがん幹細胞性に対して CAF_s が及ぼす影響を正確に捉えられていない可能性がある。これを解決すべく、大腸癌株化細胞と CAF_s を共培養した後にマグネットソーティング等で特定の細胞を分離・抽出を試みたが、細胞へのダメージが大きく死細胞が増加したため、サンプルを適切に解析できなかった。このため、フローサイトメーターを用いた ALDEFUOR assay により腫瘍細胞分画に特異的な評価を追加することで、がん幹細胞性の変化が実際に大腸癌株化細胞で生じていることを確認した。

第5節 小括

CAF_s と共培養した大腸癌株化細胞のがん幹細胞性は、CAF_s を採取した大腸癌の DR 分類によって異なった変化を示していた。CAF_s^{immature} は CAF_s^{mature} と比較して大腸癌株化細胞のがん幹細胞性を有意に亢進させ、DR が immature である症例の腫瘍悪性度に関与している可能性が示された。

第3章 DR 分類別の CAFs が大腸癌細胞のがん幹細胞性に影響を及ぼす機序

第1節 背景と目的

第2章において、DR 分類別に CAFs を分離培養し大腸癌株化細胞と共培養を行った場合、CAF^{mature} に比較して CAF^{immature} との共培養において大腸癌株化細胞のがん幹細胞性が有意に亢進することを見出した。一方、CAFs が大腸癌のがん幹細胞性に影響を及ぼし、その影響が DR 分類別に異なることに関する機序については明らかではない。がん幹細胞のニッチと考えられている間葉系細胞は、トランスフォーミング成長因子 β (Transforming Growth Factor- β : TGF- β)、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor: EGF) 等の細胞増殖因子や、腫瘍壊死因子 α (Tumor Necrosis Factor α)、インターロイキン (IL-1 β 、IL-6、IL-8) 等の炎症性サイトカインを分泌することにより、がん幹細胞の増殖や分化に必要なシグナル経路を活性化もしくは制御していると考えられている(16, 40, 59)。

その中でも、CAFs は様々な液性因子の分泌により癌細胞の浸潤や転移を促している(60-63)。また、癌細胞の浸潤において重要な現象である EMT は、がん幹細胞性と密接な関係にあるとされている(64, 65)。当講座では、過去に ECM の構成要素である Periostin (POSTN) の発現量が DR 分類と密接な関係性を持つことを見出している(66)。POSTN は歯・骨の形成に関与する蛋白質として同定され、別名は骨芽細胞特異因子 2 (Osteoblast-specific Factor-2) として知られており(67)、細胞外マトリックス蛋白質とマトリセルラー蛋白質としての特徴を合わせ持っており、アレルギー疾患を中心とした慢性炎症性疾患や、組織の線維化を伴う疾患に関与しているとして研究が進められてきた(68)。さらに、悪性腫瘍との関連について着目されており、癌間質中の CAFs から産生されて間

質の線維化に関与するだけでなく、様々な腫瘍において癌細胞の増殖、遊走、浸潤等にかかわっているとの報告がなされており(69-71)、近年がん幹細胞性への関与も示唆されている(72, 73)。また、POSTNはTGF- β シグナルを介してCAFsから分泌が誘導されるとの報告もあることから(74-76)、CAF^s_{immature}が大腸癌株化細胞のがん幹細胞性を亢進させる機序に関与している可能性が高いと推測した。本検討では、POSTNおよびPOSTNの発現やがん幹細胞性に関与するとされるTGF- β シグナルに着目し、DR分類別の各CAFsにおけるPOSTNの発現、POSTNとTGF- β シグナルとの相互作用を評価することで、DR分類とがん幹細胞性が関連する分子生物学的背景の一端を解明することを目的とした。

第2節 対象と方法

1) 対象症例

第2章と同じpT3以深の大腸癌症例56例を対象とした。

2) POSTNの免疫染色

腫瘍先進部を含む代表断面のホルマリン固定パラフィン包埋標本を4 μ m厚に薄切し、以下の通り免疫染色を行った。キシレンによる脱パラフィンおよび濃度勾配をつけたエタノールを用いて親水処理した後に、オートクレーブにて121°C、15分間の抗原賦活を行った。5%過酸化水素水に10分間浸透して内因性ペルオキシダーゼの阻害を行ったのち、スキムミルクにて非特異的反応を抑制した。一次抗体反応として100倍希釈したラビット抗POSTN抗体(ab14041, Abcam)を用いて4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体はEnvisionTM + system anti-goat (DAKO)を使用して室温で2時間反応させた。次

いで 0.1% diaminobenzidine (DAB) 溶液で 10 分間の発色を施し、最後に hematoxylin で 2 分間の核染色を加えた。

3) POSTN の蛍光二重免疫染色

薄切したホルマリン固定パラフィン包埋切片を 100 倍希釈ラビット抗 POSTN モノクローナル抗体 (ab14041, Abcam) に加え、100 倍希釈マウス抗 CD68 モノクローナル抗体 (clone PG-M1, M0876; DAKO)、100 倍希釈マウス抗 FSP-1 モノクローナル抗体 (ab218511; Abcam)、もしくは 100 倍希釈マウス抗 α SMA モノクローナル抗体 (clone 1A4; Dako) を用いて蛍光二重免疫染色を行った。

一次抗体反応までの手順は上述の免疫染色と同様の手順で行い、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗ラビット IgG 抗体 (ab150077, Abcam)、Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG 抗体 (ab150116, Abcam) を使用し、1 時間常温で反応させた後、DAPI 溶液 (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, Paris, France) を用いて核染色を行った。免疫蛍光顕微鏡 Leica SP8 共焦点顕微鏡 (Leica Microsystems) を用いて評価した。

4) 細胞培養 (大腸癌細胞および線維芽細胞)

第 2 章第 2 節 4) に記載した培養細胞を使用した。

5) リアルタイム定量 PCR による遺伝子発現解析

第 2 章で作製した cDNA を鋳型として Thermal Cycler Dice Real-Time System TP800TM (Takara Bio) および SYBR Premix Ex Taq IITM (Takara Bio) を用いて CD44、CD133、Nanog、SOX2、Oct3/4、POSTN および TGF- β 1 の各 mRNA 発現を半定量的に評価した。リアルタイム PCR に用いた POSTN および TGF- β 1

のプライマー (Perfect Real Time Support System™, Takara Bio) は下記の通りである。なお、CD44、CD133、Nanog、SOX2、Oct3/4、GAPDH のプライマー、PCR プロトコル、解析方法は第 2 章第 2 節 6) と同様である。

POSTN 増幅産物サイズ 146 bp

Forward primer: 5'-CGAGATCATCAAGCCAGCAGAG-3'

Reverse primer: 5'-TGGTTGGCACAAATAATGTCCAG-3'

TGF-β1 増幅産物サイズ 130 bp

Forward primer: 5'-AGCGACTCGCCAGAGTGGTTA-3'

Reverse primer: 5'-GCAGTGTGTTATCCCTGCTGTCA-3'

6) イムノブロット法による各種蛋白質の発現解析

大腸癌株化細胞、CAFs、NFs、培養上清、および共培養を施行したサンプルにおけるがん幹細胞関連蛋白質発現および TGF-β シグナルに関わる Smad2/3 の活性を評価するため、第 2 章第 2 節 7) と同様の手法で評価した。大腸癌株化細胞における Smad2/3 のリン酸化は、ラビット抗 Smad2 抗体 (5 μg/mL, #D43B4; Cell Signaling Technology)、ラビット抗 Phospho-Smad2 抗体 (5 μg/mL, Ser465/467, #138D4; Cell Signaling Technology)、ラビット抗 Smad3 抗体 (5 μg/mL, #C67H9; Cell Signaling Technology)、ラビット抗 Phospho-Smad3 抗体 (5 μg/mL, Ser423/425, #C25A9; Cell Signaling Technology) を用いて評価した。

TGF-β シグナルの阻害に関する検討では、TGF-βR1 阻害薬である SB431542 (Merck, Darmstadt, Germany) を終濃度 0.5 μM および 1 μM となるように培地に添加し、SB431542 の存在下または非存在下で大腸癌株化細胞と CAFs^{immature}

を 24 時間共培養したサンプルを使用した。

7) LMD を用いて採取した大腸癌組織検体の癌間質における RNA 発現の網羅的解析

第 2 章第 2 節 3) において採取した癌間質組織の RNA 発現（正常組織との相対値）を nCounter® PanCancer Progression および Immune Profiling パネルによって網羅的に解析し、その結果から Nanostring nSolver™ 解析ソフトウェアにて TGF- β シグナルに関連する 49 の遺伝子群（表 2）の発現に基づき TGF- β シグナルスコアを算出した。

8) Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法による TGF- β 1 の測定

無血清培地における大腸癌株化細胞と DR 分類別の各 CAFs との共培養上清およびそれぞれの単独培養上清を細胞培養開始から 48 時間後に回収し、培養上清中の TGF- β 1 蛋白質の濃度を ELISA 法にて測定した。TGF- β 1 の濃度測定には TGF- β 1 ELISA キット (DB100B; R&D Systems) を用いて、発色強度を iMark microplate reader (Bio-Rad) で測定した。

9) POSTN の発現抑制が in vitro 実験系でのがん幹細胞性亢進状態に与える影響の評価

POSTN small interfering RNA (siRNA) として 3 種類の lentivirus vector（いずれも Merck）ならびに非標的 siRNA vector (mock) (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を準備した。予備実験として各 lentivirus vector による POSTN の発現抑制効果についてイムノブロット法を用いて検討し、抑制効果があることを確認できた 2 種類の siRNA (si1 および si2) を以降の検討に使用した (図 11)。2 種類の

siRNA のコード配列は以下の通りである。

siPOSTN1: 5'-GAUCCAUGGAGAGCCAAUU-3'

siPOSTN2: 5'-GACAACAAAUGGUUAAUU-3'

si mock: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

上記で用意した 2 種の siRNA vector (si1 および si2) または siRNA vector (mock) をそれぞれ CAFs^{immature} にトランスフェクションし、CAF^s_{immature} siPOSTN1、CAF^s_{immature} siPOSTN2 および CAF^s_{immature} mock を作製した。また、CAF^s_{mature} についても同様に各 vector による siRNA 導入を行った。これらを使用し、第 2 章第 2 節 5)~8)と同様の手法で Sphere formation assay、がん幹細胞性関連遺伝子と蛋白質の発現解析、および ALDEFLUOR assay を行って POSTN のノックダウンにより CAFs が大腸癌のがん幹細胞性に及ぼす影響に変化が生じるか否かを評価した。

10) POSTN の発現抑制が in vivo 実験系でのがん幹細胞性亢進状態に与える影響の評価

siRNA vector (si1、si2) または siRNA vector (mock) でトランスフェクションした CAF^s_{mature} または CAF^s_{immature} (1×10^4 個) と HCT-116^{ffLuc-cp156} または HT-29^{ffLuc-cp156} を第 2 章第 2 節 9)と同様の要領でマウスの背部皮下に注入移植した。また、腫瘍細胞の注射後 3 日ごとに、siPOSTN1 および siPOSTN2 with AteloGene Systemic use (Koken, Tokyo, Japan) または si mock with AteloGene (Koken) を腫瘍近傍に注射した。第 2 章第 2 節 9)と同様の手順で移植後 14 日目に IVIS-100 によって生着率 (発光強度) を判定した。移植の 28 日後に 5%イソフルランの吸入にて対象マウスを犠死させ、Cancer stemness frequency を、

ELDA Web system によって解析した。

11) 統計学的手法

第 2 章第 2 節 10) に記載した方法で評価した。

第 3 節 結果

1) DR 分類別の POSTN の発現

ア) DR 分類別の蛍光二重免疫染色による POSTN の発現と局在の検討

DR 分類別の手術検体のパラフィン薄切切片に対し、CAFs のマーカーである α SMA および POSTN の蛍光二重免疫染色を施行したところ、図 12 に示すように、いずれの DR 分類の標本においても POSTN は腫瘍細胞に殆ど発現していなかった。一方、DR が *intermediate* および *immature* の間質では POSTN が広範囲に発現していた (図 12, 13A)。また、POSTN 陽性細胞は CAFs のマーカーである α SMA や FSP-1 と共染色を示したが、腫瘍関連マクロファージのマーカーである CD68 陽性細胞には POSTN の発現を認めなかった (図 13B)。POSTN は間質細胞の中でも CAFs の局在に一致して発現していることが示された。

イ) DR 分類別の CAFs および大腸癌株化細胞における POSTN の発現

DR 分類別に分離培養した各 CAFs から mRNA を抽出し、定量的 PCR により POSTN mRNA の発現を評価したところ、POSTN の発現は CAFs^{mature} で 27.1 ± 24.7 (GAPDH との発現比：平均値 \pm SD)、CAFs^{intermediate} で 30.6 ± 26.6 、CAFs^{immature} で 194.8 ± 109.6 であり、CAFs^{mature} および CAFs^{intermediate} に比較して、CAFs^{immature} で有意に高かった (いずれも $p < 0.05$) (図 14A)。本研究に使用したいずれの大腸癌株化細胞においても POSTN 蛋白質の発現はほぼ認めなかった (図 14B)。一方、DR 分類別の各 CAFs の培養細胞およびその培養上清

の評価では、CAF_s^{immature} > CAF_s^{intermediate} > CAF_s^{mature} の順で POSTN 蛋白質が有意に高発現していた (図 14C)。

2) DR 分類と TGF-β シグナルの関連

ア) DR 分類別の RNA 発現の網羅的な評価における TGF-β シグナル関連遺伝子の発現

LMD により採取された癌間質組織の mRNA 発現の網羅的解析による TGF-β シグナル関連遺伝子の発現に関して、TGF-β シグナルスコアの中央値は mature 群で -2.1 (範囲: -7.4 ~ -0.1)、intermediate 群で 0.8 (-1.0 ~ 3.8)、immature 群で 1.7 (1.4 ~ 2.3) であり、mature 群に比較して immature 群で有意にスコアが高かった (図 15A)。

イ) CAFs および培養上清における TGF-β1 の発現

定量的 PCR にて、DR 分類別に分離培養した各 CAFs における TGF-β1 の発現を評価したところ、TGF-β1 mRNA の発現は CAF_s^{mature} で 0.53 ± 0.06 (GAPDH との発現比: 平均値 ± SD)、CAF_s^{intermediate} で 1.21 ± 0.24 、CAF_s^{immature} で 1.25 ± 0.16 であり、CAF_s^{mature} と比較して CAF_s^{intermediate} および CAF_s^{immature} で有意に高度であった (図 15B)。一方、DR 分類の各 CAFs の培養上清中の TGF-β1 蛋白質の濃度について ELISA で分析したところ、各 CAFs の単独培養上清では有意な差を認めなかった (図 15C)。また、大腸癌株化細胞 HCT116 および HT29 の単独培養上清でも DR 分類別の各 CAFs の単独培養上清でも TGF-β1 の濃度は有意な差を認めなかった。しかしながら、上記の大腸癌株化細胞と DR 分類別の各 CAFs を共培養した培養上清では CAF_s^{mature} との共培養と比較して、CAF_s^{intermediate}、CAF_s^{immature} との共培養で有意に TGF-β1 の濃度が上昇した。

ウ) TGF- β シグナルの阻害が CAFs^{immature} の共培養系におけるがん幹細胞性に与える変化

大腸癌株化細胞と CAFs^{immature} の共培養におけるがん幹細胞性の亢進状態に対し、TGF- β シグナルの阻害が及ぼす影響を調べるため、TGF- β 受容体キナーゼ阻害剤 SB431542 を上記の共培養に添加し、イムノブロット法で TGF- β シグナルにおける Smad2/3 のリン酸化抑制の有無を確認するとともに、がん幹細胞関連蛋白質の発現の変化を検討した。大腸癌株化細胞 HCT116 と CAFs^{immature} との共培養において、SB431542 0.5 μ M および 1 μ M の添加いずれにおいても、TGF- β シグナルにおける Smad2/3 のリン酸化が有意に抑制されていることを確認した (図 16)。大腸癌株化細胞 HT29 についても同様の結果であった。また、がん幹細胞性関連蛋白質の発現は HCT116 と CAFs^{immature} との共培養群では Nanog は 0.59 ± 0.14 (平均値 \pm SD)、SOX2 は 0.22 ± 0.16 、Oct4 は 0.69 ± 0.14 であったが、TGF- β シグナルの阻害 (SB431542 1 μ M の添加) により Nanog は 0.26 ± 0.04 、SOX2 は 0.13 ± 0.05 、Oct4 は 0.21 ± 0.04 となり、いずれも発現レベルが有意に低下した (図 17)。HT29 の検討でも同様の結果が示された。

3) CAFs における POSTN の発現抑制ががん幹細胞性亢進状態に与える影響
— in vitro の検討 —

ア) Sphere formation assay でのがん幹細胞性の変化

大腸癌株化細胞 (HCT-116 および HT-29) と CAFs mock、CAFsiPOSTN1 または siPOSTN2 とを共培養した際の Cancer stemness frequency の変化について、大腸癌細胞株単独培養を Control として評価した。ELDA の解析による Cancer stemness frequency (平均値 \pm SD) は CAFs^{immature} mock、CAFsiPOSTN1、および CAFs^{immature} siPOSTN2 との共培養群において、HCT116 を用いた検討で

はそれぞれ 9.2 ± 4.4 、 3.4 ± 1.7 、 2.9 ± 1.9 、HT29 ではそれぞれ 8.2 ± 2.7 、 4.3 ± 1.9 、 3.7 ± 2.1 であり、いずれの大腸癌株化細胞においても CAFs^{immature} mock 群と比較して、CAF^s^{immature} siPOSTN 群では Cancer stemness frequency が有意に低下した (図 18)。一方、CAF^s^{mature} siPOSTN 群では CAF^s^{mature} mock 群に比べて Cancer stemness frequency に有意な差は認めなかった。

イ) DR 分類別の各 CAFs におけるがん幹細胞性関連遺伝子発現の変化

大腸癌株化細胞 (HCT-116 および HT-29) と CAFs mock、CAF^s siPOSTN1 または siPOSTN2 とを共培養した際のがん幹細胞性関連遺伝子 (CD44、CD133、Nanog、SOX2、Oct3/4) の発現の変化について大腸癌株化細胞のみの培養環境下でのサンプルの評価値を基準として定量的 PCR で評価した。HCT116 における検討では、各がん幹細胞性関連遺伝子の発現は、CAF^s^{immature} mock との共培養において、CD44 は 4.9 ± 1.0 倍、CD133 は 4.0 ± 0.8 倍、Nanog は 3.8 ± 0.3 倍、SOX2 は 1.4 ± 0.1 倍、Oct3/4 は 5.9 ± 1.0 倍 (平均値 \pm SD) であり、CAF^s^{immature} siPOSTN1 との共培養において CD44 は 1.2 ± 0.1 倍、CD133 は 1.0 ± 0.3 倍、Nanog は 1.4 ± 0.1 倍、SOX2 は 0.9 ± 0.2 倍、Oct3/4 は 1.3 ± 0.7 倍、CAF^s^{immature} siPOSTN2 との共培養において CD44 は 0.7 ± 0.4 倍、CD133 は 0.9 ± 0.1 倍、Nanog は 1.5 ± 0.9 倍、SOX2 は 0.8 ± 0.3 倍、Oct3/4 は 1.4 ± 1.1 倍であり、CAF^s^{immature} mock 群と比較して CAF^s^{immature} siPOSTN 群で SOX2 を除くがん幹細胞性関連遺伝子の発現は有意に低下した (図 19)。また、HT29 における検討では CAF^s^{immature} mock 群と比較して、CAF^s^{immature} siPOSTN 群でいずれのがん幹細胞性関連遺伝子の発現も有意に低下した。一方、CAF^s^{mature} siPOSTN 群では CAF^s^{mature} mock 群と比較して、一部を除くがん幹細胞性関連遺伝子の発現に有意な差を認めなかった。

ウ) イムノブロット法におけるがん幹細胞性関連蛋白質発現および Smad2/3 リン酸化の変化

大腸癌株化細胞 (HCT-116 および HT-29) と CAFs mock、CAFs siPOSTN1 または siPOSTN2 とを共培養した際のがん幹細胞性関連蛋白質 (Nanog、SOX2、Oct4) の発現について評価した。いずれの大腸癌株化細胞の検討においても CAFs^{immature} mock 群と比較して、CAFs^{immature} siPOSTN 群でがん幹細胞性関連蛋白質が有意に低下した (図 20)。一方、CAFs^{mature} siPOSTN 群では mock 群と比較してがん幹細胞性関連蛋白質の発現が概ね低下したが、一部を除いて有意な差を認めなかった。また、TGF- β シグナルにおける Smad2/3 のリン酸化を評価したところ、いずれの大腸癌株化細胞においても、CAFs^{immature} mock 群と比較して CAFs^{immature} siPOSTN 群で Smad2/3 のリン酸化が有意に低下していた。一方、CAFs^{mature} mock 群と CAFs^{mature} siPOSTN 群の比較では、一部を除き、両群に有意差を認めなかった。

エ) ELISA による培養上清の TGF- β 1 蛋白質の濃度の比較

NFs、DR 分類別に培養した各 CAFs を用いて、CAFs^{mature} および CAFs^{immature} における POSTN の発現抑制が、培養上清中 TGF- β 1 蛋白質の濃度に与える変化を ELISA 法で検討した。Control は各大腸癌株化細胞のみの培養上清で検討を行った。TGF- β 1 蛋白質の濃度の平均値 (\pm SD) は、CAFs^{immature} mock、CAFs^{immature} siPOSTN1 および CAFs^{immature} siPOSTN2 との共培養群において、HCT116 の検討ではそれぞれ 1944 ± 341 pg/ml、 491 ± 165 pg/ml、 358 ± 118 pg/ml、HT29 の検討ではそれぞれ 1439 ± 227 pg/ml、 350 ± 110 pg/ml、 220 ± 78 pg/ml であった。いずれの大腸癌株化細胞においても、CAFs^{immature} mock 共培養

群において TGF- β 1 は高濃度であったが、CAF^s_{immature} siPOSTN 共培養群では TGF- β 1 の濃度が有意に低下した (図 21)。一方、CAF^s_{mature} mock 共培養群と比較して CAF^s_{mature} siPOSTN 共培養群で TGF- β 1 の濃度は低下している傾向を認めたものの、両群に有意差を認めなかった。

オ) ALDEFLUOR assay における高 ALDH1 活性細胞集団の変化

大腸癌株化細胞 (HCT-116 および HT-29) と CAF^s mock、CAF^s siPOSTN1 および CAF^s siPOSTN2 とを共培養した際の ALDH1 活性の高い細胞群の比率について検討した。高 ALDH1 活性の細胞群の比率 (平均値 \pm SD) は、HCT116 による検討では CAF^s_{immature} mock、CAF^s_{immature} siPOSTN1、CAF^s_{immature} siPOSTN2 共培養群でそれぞれ 11.4 \pm 2.7%、3.6 \pm 0.2%、4.0 \pm 0.7%、HT29 による検討では 8.5 \pm 2.6%、3.1 \pm 0.4%、3.4 \pm 0.8% であり、いずれの大腸癌株化細胞においても、CAF^s_{immature} mock 共培養群と比較して、CAF^s_{immature} siPOSTN 共培養群では高 ALDH1 活性を示す細胞群の比率が有意に減少した (図 22)。一方で、CAF^s_{mature} mock 群と比較して CAF^s_{mature} siPOSTN 群でも高 ALDH1 活性を示す細胞群が減少する傾向を認めたが、一部を除き両群に有意差を認めなかった。

5) CAFs における POSTN の発現抑制ががん幹細胞性亢進状態に与える影響

— in vivo の検討 —

IVIS Imaging System により測定された発光強度 (total flux: 平均値) は、HCT-116^{ffLuc-cp156} の移植細胞数 10²、10³、10⁴ の順に CAF^s_{immature} mock 共培養群でそれぞれ 1.4 \times 10⁷、5.3 \times 10⁸、1.4 \times 10⁹ であるのに対して、CAF^s_{immature} siPOSTN (siPOSTN1 または siPOSTN2) 共培養群ではそれぞれ 7.9 \times 10⁴、8.8 \times 10⁵、1.9 \times 10⁷ であり、CAF^s_{immature} と混合した HCT-116^{ffLuc-cp156} の生着細胞量

は、CAF_sに対する POSTN の発現抑制によって有意に低下した (図 23A)。この結果を用いて ELDA から算出された Cancer stemness frequency は、CAF_s^{immature} mock 共培養群で 1.77、CAF_s^{immature} siPOSTN 共培養群で 0.05 であり、CAF_s^{immature} では mock 群に比較して siPOSTN 群で Cancer stemness frequency が有意に低下していることを確認した (図 23B)。

さらに、HT-29^{ffLuc-cp156} 細胞を用いた検討においても、発光強度は移植細胞数 10^2 、 10^3 、 10^4 の順に CAF_s^{immature} mock 共培養群でそれぞれ 3.4×10^6 、 2.5×10^7 、 1.5×10^9 であるのに対して、CAF_s^{immature} siPOSTN 共培養群ではそれぞれ 1.3×10^5 、 4.6×10^6 、 1.9×10^7 であり、CAF_s^{immature} と混合した HT-29^{ffLuc-cp156} の生着細胞量は CAF_s における POSTN の発現抑制によって有意に低下しており、HCT-116^{ffLuc-cp156} の検討と同様の結果が得られた。Cancer stemness frequency においても、HCT-116^{ffLuc-cp156} における検討と同様に有意に低下していることを確認した (図 23B)。

一方、いずれの細胞群においても CAF_s^{mature} では mock 群と siPOSTN 群との間に発光強度 (生着率) および Cancer stemness frequency に関して有意な差を認めなかった。

第 4 節 考察

本検討から、CAF_s^{mature} に比較して CAF_s^{immature} では POSTN および TGF- β 1 が有意に高発現しており、さらにこれらの因子が大腸癌のがん幹細胞性に影響を及ぼしていることが強く示唆された。

当講座における過去の検討にて、DR が mature な間質に比較して DR が immature な間質では POSTN が高発現していることを報告しているが(66)、本研究においても DR 分類別に分離培養した各 CAF_s において POSTN の発現強度が

異なることを確認した。POSTN は、マウスの骨芽細胞に発現している接着蛋白質として同定され(77, 78)、正常な生体組織ではほぼ検出されないが、炎症や悪性腫瘍の組織に高度に誘導されることが判明している(79-81)。POSTN は ECM 中の多機能な蛋白質として、腫瘍微小環境の形成に寄与しており、乳癌では CAFs 由来の POSTN が腫瘍の転移を促進させることが報告されている(82, 83)。また、肺癌においても POSTN ががん幹細胞ニッチの形成に関与しているとされており(58)、がん幹細胞性を変化させる因子として POSTN が注目されている(84, 85)。

POSTN の発現には TGF- β シグナル (特に TGF- β 1) が関与しており、POSTN および TGF- β 1 の相互作用によりがん幹細胞性を亢進させることが、近年、大腸癌以外の癌種で報告されている(74, 75)。TGF- β 受容体複合体のリガンドである TGF- β 1 は TGF- β シグナルを活性化することにより腫瘍形成および転移を促進する等、多くの生物学的プロセスで重要な役割を果たしている(86, 87)。膵臓癌間質における骨髄由来の間葉系幹細胞から分化した正常な線維芽細胞は、TGF- β シグナルに応答して CAFs に移行することが報告されており(88)、腫瘍微小環境における TGF- β シグナルの活性化は CAFs の増殖にも影響を与えている。本検討においても、癌間質の TGF- β シグナルの活性は DR 分類により大きく異なり、DR が immature である癌間質で TGF- β シグナルの活性が有意に高度であるとともに、TGF- β 1 mRNA は CAFs^{immature} で有意に高いことが確認された。

また、TGF- β 1 の分泌には大腸癌細胞と CAFs との直接的な相互作用が必要であることが示され、大腸癌株化細胞と CAFs^{immature} との共培養の検討では、がん幹細胞性の亢進に Smad2/3 のリン酸化が関連しており、CAF^{immature} のがん幹細胞性の亢進に TGF- β シグナルが関与していると考えられた。これに加えて、

CAFs における POSTN の発現抑制ががん幹細胞性に及ぼす影響を評価するために行った今回の *in vitro* および *in vivo* の検討により、CAFs^{immature} による癌細胞のがん幹細胞性の亢進は、POSTN のノックダウンにより有意に抑制され、同時に TGF- β 1/Smad2/Smad3 のシグナルも抑制されることが明らかとなった。

以上より、癌細胞と CAFs との直接的な相互作用により腫瘍および CAFs からの TGF- β 1 の分泌が増強され、TGF- β シグナル (TGF- β 1) を介したがん幹細胞性の亢進に POSTN が重要な役割を果たしていると考えられた。

なお、今回は POSTN や TGF- β 1 などの CAFs から産生される一部の因子に着目したが、間質細胞から分泌されるその他の様々な成長因子、ケモカイン、サイトカイン等も癌細胞の浸潤、遊走、転移の促進において複合的に作用しており、CAFs^{immature} によるがん幹細胞性の亢進においても POSTN や TGF- β 1 以外の液性因子が複雑に関与している可能性が否定できない。がん幹細胞性亢進過程における TGF- β 1/POSTN カスケードの占める役割の大きさを特定できず、今後の検討課題として挙げられる。さらに、癌細胞と CAFs との直接的な相互作用により腫瘍および CAFs からの TGF- β 1 の分泌が上昇することが分かっているが、TGF- β 1 の分泌が亢進している細胞の同定、およびその機序の解明には至っておらず、今後更なる検討が必要である。

第5節 小括

CAFs^{mature} と比較して CAFs^{immature} では POSTN が高発現しており、これが CAFs による大腸癌細胞のがん幹細胞性の促進に関与していることが示唆された。CAFs から分泌された POSTN は TGF- β 1 および Smad2/3 のシグナル伝達を介して大腸癌のがん幹細胞性を促進しており、大腸癌細胞と CAFs^{immature} の直接的な相互作用により TGF- β 1 の分泌が促進されることで、さらにはがん幹細胞

性を亢進させていると考えられた。

第4章 DR 分類別の CAFs における POSTN と IL-6/STAT3 シグナルの関与

第1節 背景と目的

第3章において、CAF_s^{immature} に POSTN が高度に発現しており、これが TGF- β 1 と Smad2/3 のシグナル伝達を介してがん幹細胞性を促進させていることが判明した。過去の当講座における検討でも、DR 分類が *intermediate* または *immature* である癌間質には POSTN が高度に発現することを確認しているが(66)、その要因として DR を構成している主たる細胞である CAFs の特性が大きいと考えられるものの、それ以外にも腫瘍微小環境におけるその他のインターロイキンをはじめとする炎症性サイトカイン等、様々な因子が関連している可能性がある。POSTN の発現は TGF- β により増加するとの報告があるが(77)、Interleukin-4 (IL-4) や Interleukin-13 (IL-13) (89)、bone morphogenic protein-2 (BMP2) (90)などの因子によっても誘導されることが分かっている。さらに、大腸癌領域においても、CAF_s における IL-6/STAT3 シグナルの活性化を介して、POSTN の分泌が促進されるとの報告もあり(73)、CAF_s からの POSTN の分泌には腫瘍微小環境におけるインターロイキンとも重要な関係性を持っていることが推測される。

本検討では、腫瘍微小環境におけるインターロイキンの発現と DR 分類別の各 CAF_s から分泌される POSTN との関連について評価した。

第2節 対象と方法

1) 対象症例

第2章、第3章で対象とした pT3 以深の大腸癌症例 56 例を対象とした。

2) LMD を用いて採取した大腸癌組織検体の癌間質における RNA 発現の網羅的解析

第 2 章第 2 節 3) において採取した癌間質組織の RNA 発現を nCounter® PanCancer Progression および Immune Profiling パネルによって網羅的に解析し、その結果からインターロイキン関連遺伝子の発現を Nanostring nSolver™ 解析ソフトウェアを使用して網羅的な発現解析を行い、インターロイキンに関連する 38 の遺伝子 (表 3) の正常組織との相対値から、インターロイキン関連スコアを算出した。

3) 細胞培養 (大腸癌細胞および線維芽細胞)

第 2 章第 2 節 4) に記載した培養細胞を使用した。

4) リアルタイム定量的 PCR による遺伝子発現解析

第 2 章で作製した cDNA を鋳型として Thermal Cycler Dice Real-Time System TP800™ (Takara Bio) および SYBR Premix Ex Taq II™ (Takara Bio) を用いて各種 IL-4、IL-13、IL-6、IL-6R の mRNA 発現を半定量的に解析した。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー (Perfect Real Time Support System™, Takara Bio) は下記の通りである。なお、GAPDH のプライマー、PCR プロトコル、解析方法は第 2 章第 2 節 6) と同様である。DR 分類別の癌間質における IL-4、IL-13、IL-6 の mRNA 発現は GAPDH を Control とした相対値として、CAFs における IL-6R mRNA の発現は同一症例の NFs での発現の相対値として評価した。

IL-4 増幅産物サイズ 127 bp

Forward primer: 5'-CTCGCCTACAAAGCCCAGAG-3'

Reverse primer: 5'-GTGTCCTTCTCATGGTGGCT-3'

IL-13 増幅産物サイズ 147 bp

Forward primer: 5'-CAGAGGATGCTGAGCGGATT-3'

Reverse primer: 5'-AAACTGGGCCACCTCGATTT-3'

IL-6 増幅産物サイズ 101 bp

Forward primer: 5'-TGCCAGCCTGCTGACGAAG-3'

Reverse primer: 5'-AACAACTCTGAGGTGCCCATGCTAC-3'

IL-6R 増幅産物サイズ 91 bp

Forward primer: 5'-TGTTGACGAGGCCTTTGGTAA-3'

Reverse primer: 5'-CCGTGTGAACTCAGAGCCTGATA-3'

5) CAFs の培養上清中における各インターロイキンおよび POSTN 濃度の測定

DR 分類別の各 CAFs (各群 3 例) の無血清培地における培養上清を、細胞培養開始から 48 時間後に回収した。Quantibody® Human Cytokine Array 4000 Kit.

(Ray Biotech, Peachtree Corners, GA, USA)にて ELISA 法によるサイトカイン濃度の網羅的な評価を行い、培養上清中の各インターロイキンの濃度を測定した。

また、網羅的解析以外の IL-6 および POSTN の濃度の評価に関しては IL-6

ELISA キット (D6050: R&D Systems) および POSTN ELISA キット (EHPOSTN:

Invitrogen) を使用し、iMark microplate reader (Bio-Rad) を用いて発色強度を測定した。

6) POSTN 刺激が CAFs の IL-6 分泌および IL-6R 発現に及ぼす影響の評価

POSTN を添加した刺激が CAFs の培養上清中の IL-6 濃度や CAFs の IL-6R 発現へ及ぼす影響を評価するために、DR 分類別の各 CAFs (各群 5 例) を無血清培地で培養し、終濃度 1 μ M となるように IgG (Control) または recombinant human POSTN (rhPOSTN) (3548-F2; R&D Systems) を培地に添加し、24 時間培養した後、培養上清を回収するとともに、培養細胞をホモジネートして各サンプルを作製した。なお、rhPOSTN の添加による CAFs の IL-6R mRNA の変化に関する検討は、GAPDH との相対値として評価した。

7) IL-6 刺激が CAFs の STAT3 活性および POSTN の分泌に及ぼす影響の評価

IL-6 を添加した刺激が CAFs に与える影響を評価するために、CAF^{mature} および CAF^{immature} (各群 5 例) の培養において、終濃度が 1 μ M となるように rhIL-6 (206-IL; R&D Systems) または IgG (Control) をそれぞれ培地に添加し、rhIL-6 の存在下または非存在下で 24 時間培養した後、培養上清を回収した。回収した培養上清中の POSTN 蛋白質を ELISA 法で評価した。

8) IL-6 の阻害による CAFs のがん幹細胞性に及ぼす影響の変化に関する評価

IL-6 の阻害によって CAFs のがん幹細胞性への影響に変化が生じるかを評価するために、CAF^{mature} および CAF^{immature} (各群 5 例) と IL-6 中和抗体 (Anti NeutraKine® IL-6 neutralization antibody) (69001-1-Ig; Proteintech Group, Rosemont, IL, USA) を用いて検討した。IL-6 中和抗体または IgG (Control) をそれぞれ終濃度が 1 μ M となるように大腸癌株化細胞と CAFs の共培養の培地に添加し、IL-6 中和抗体の存在下または非存在下で、大腸癌株化細胞と CAFs を 7 日間共培養した。培養液の交換、および中和抗体の追加投与を培養開始から 3 日目に行っ

た。7日間の共培養後、培養細胞をホモジネートして、サンプルを作製した。各サンプルについてがん幹細胞性（Nanog、SOX2、Oct4の発現）の変化を免疫ブロット法で評価した。

ウ) 統計学的手法

第2章第2節10)に記載した方法で評価した。

第3節 結果

1) DR分類別の網羅的RNA発現評価におけるインターロイキン関連mRNAの発現

LMDを用いて採取された癌間質領域のmRNA発現の網羅的解析におけるインターロイキン関連スコアの中央値は、mature群で-3.0（範囲：-5.0~-2.1）、intermediate群で-0.3（-6.2~4.0）、immature群で4.0（3.5~4.5）であり、immature群でスコアが有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（図24A）。また、インターロイキン関連mRNAのヒートマップでは多くのインターロイキンがimmature症例を全て含むクラスターで高発現していることが示され、その中にはIL-4、IL-13、IL-6といったPOSTNの分泌に関与しているインターロイキンも含まれていた（図24B）。正常間質部に比較して癌間質部でのIL-4 mRNA発現はmature群で平均12.4倍、intermediate群で20.2倍、immature群で43.2倍であり、mature群やintermediate群と比較してimmature群で有意に高発現していた（図25A）。同様にIL-13 mRNAの発現もmature群で平均13.1倍、intermediate群で28.3倍に対しimmature群で56.5倍であり、immature群で有意に高度であった（図25B）。一方、IL-6 mRNAに関してはmature群で平均23.4倍、intermediate群で62.2倍、immature群で36.9倍であり、他に比較してintermediate群で有意

に高度であった (図 25C)。

2) DR 分類別に培養した各 CAFs の培養上清中のインターロイキン濃度

DR 分類別の各 CAFs における培養上清中の IL-4 濃度は mature 群で平均 1063 ± 118 pg/ml、intermediate 群で 1562 ± 91 pg/ml、immature 群で 1415 ± 26 pg/ml であり、各群に有意な差は認めなかった (図 26A)。同様に、IL-13 濃度も mature 群で平均 1141 ± 115 pg/ml、intermediate 群で 1520 ± 62 pg/ml、immature 群で 1571 ± 116 pg/ml であり、各群間に有意差を認めなかった (図 26B)。一方、IL-6 濃度は mature 群で 296 ± 183 pg/ml、intermediate 群で 869 ± 718 pg/ml、immature 群で 1654 ± 1058 pg/ml であり、すべての群間に有意な差を認めた (全て $p < 0.05$) (図 26C)。

3) DR 分類別の各 CAFs における IL-6R の発現

DR 分類別の CAFs (各群 8 例) における IL-6R mRNA の発現 (同一症例の NFs との発現比) は、mature 群の平均 1.1 倍、intermediate 群の 1.1 倍に比較して immature 群で 1.7 倍と、immature 群で有意に高発現していた (vs mature 群 $p < 0.05$; vs intermediate 群 $p < 0.05$) (図 27A)。また、培養上清中の sIL-6R 濃度も mature 群で 750 ± 183 pg/ml、intermediate 群で 674 ± 135 pg/ml であり、両者に比較して immature 群では 1341 ± 287 pg/ml と有意に高値であった (vs mature 群 $p < 0.01$; vs intermediate 群 $p < 0.01$) (図 27B)。

4) DR 分類別の各 CAFs における rhPOSTN 添加による IL-6 分泌の変化

DR 分類別の各 CAFs の培養上清中の IL-6 濃度は CAFs^{mature} では IgG を添加した Control 群 204 ± 131 pg/ml に対して rhPOSTN 添加群では 493 ± 170 pg/ml、

intermediate 群では Control 群 496 ± 171 pg/ml に対して rhPOSTN 添加群で 910 ± 667 pg/ml であり、いずれも rhPOSTN の添加で IL-6 濃度が上昇する傾向を示したが、有意な差は認めなかった。一方 immature 群では、Control 群 836 ± 144 pg/ml に対して rhPOSTN 添加群では 1895 ± 143 pg/ml であり、rhPOSTN 添加により培養上清中の IL-6 濃度が有意に上昇した ($p < 0.01$) (図 28A)。

5) DR 分類別の各 CAFs における rhPOSTN 添加による IL-6R 発現の変化

DR 分類別の CAFs での IL-6R mRNA 発現は、intermediate 群では IgG を添加した Control 群 261 ± 115 に対して rhPOSTN 添加群で 514 ± 221 、immature 群では Control 群 279 ± 168 に対して rhPOSTN 添加群で 579 ± 200 であり、いずれも POSTN 刺激により IL-6R mRNA 発現が有意に上昇した (intermediate 群 $p < 0.01$; immature 群 $p < 0.01$) (図 28B)。一方、mature 群では IL-6R mRNA の発現は Control 群と rhPOSTN 添加群の間に有意な変化を認めなかった。

6) CAFs^{mature} および CAFs^{immature} における rhIL-6 添加による STAT3 活性および POSTN 分泌の変化

IL-6 刺激によって CAFs^{immature} では IgG を添加した Control 群に比較して STAT3 のリン酸化が有意に亢進した ($p < 0.01$) (図 29)。一方、CAFs^{mature} では rhIL-6 の添加により STAT3 のリン酸化がやや促進されたが、有意差は認めなかった。また、IL-6 刺激によって CAFs^{immature} は Control 群に比較して培養上清中の POSTN の濃度が上昇したのに対して、CAFs^{mature} では Control 群と IL-6 刺激群の間に有意な変化を認めなかった (図 30)。

7) 大腸癌株化細胞と DR 分類別の各 CAFs との共培養における IL-6 阻害による

がん幹細胞性の変化

図 31 に示すように、HCT116 を用いた検討では、CAF_s^{immature} との共培養に対する IL-6 中和抗体の添加により Nanog の発現が有意に抑制されたが ($p = 0.0069$)、SOX2 および Oct4 については発現が抑制される傾向を示したものの、有意差は認めなかった。HT29 を用いた検討では、CAF_s^{immature} との共培養では Nanog、SOX2、Oct4 のいずれのがん幹細胞性関連蛋白質も IL-6 中和抗体を添加することにより発現が有意に抑制された (Nanog $p < 0.0001$; SOX2 $p = 0.0003$; Oct4 $p < 0.0001$)。一方、CAF_s^{mature} との共培養では、HT29 を用いた検討において、IL-6 中和抗体の添加により Nanog、SOX2 の発現が抑制されたが (Nanog $p = 0.017$; SOX2 $p = 0.037$)、Oct4 では有意な変化を認めなかった。

第 4 節 考察

本検討から、CAF_s からのインターロイキンの放出量には DR 分類別に差があり、特に immature である癌間質では POSTN と IL-6 が相互的に positive feedback を来している可能性が示された。

第 3 章の検討において DR が immature である癌間質では POSTN の発現量が高度であることが判明したが、その癌間質には IL-4、IL-13、IL-6 をはじめとして複数のインターロイキンが高発現していることが分かった。喘息や慢性副鼻腔炎のようなアレルギー疾患の分野では IL-4、IL-13 によって POSTN の発現が誘導されることが報告されており(91)、同様に大腸癌でも CAF_s から放出された IL-4、IL-13 により、CAF_s での POSTN の分泌が誘導されていると考えられる。IL-4、IL-13 は他のサイトカインと同様に細胞表面に存在する受容体を介してシグナルを伝達している(92)。IL-4 の受容体には、IL-4R α と Type II IL-4R が存在し、Type II IL-4R は IL-13 の受容体でもあることから IL-13R α 1

とも称されている。これらの受容体に IL-4、IL-13 が結合することにより、主に JAK/STAT 経路を介してシグナル伝達が行われることが知られている(93, 94)。気管支喘息などの疾患では Th2 細胞等から分泌された IL-4、IL-13 が間質に存在する種々の細胞に対して情報伝達することで、線維芽細胞による線維化、血管内皮細胞の接着分子の発現、B 細胞の Ig E 産生などに作用している(93, 95)。本検討では DR が immature である癌間質では IL-4、IL-13 が高度に発現していたが、CAF_s から分泌される IL-4、IL-13 には DR 分類別に有意な差は存在しなかった。このため、DR が immature な癌間質では上記の気管支喘息と同様に Th2 細胞等の免疫細胞から IL-4 や IL-13 が分泌されていると推察された。今回の検討では、免疫細胞と CAF_s との相互作用については評価できておらず、今後は免疫細胞と CAF_s とのクロストークについても検討を重ねていく必要がある。

本検討では、CAF_s における POSTN と IL-6/STAT3 シグナルの関連に着目した。DR が intermediate や immature である間質では IL-6 の mRNA 発現が高度であり、CAF_s^{immature} では IL-6R が高発現していた。このため、IL-6/STAT3 シグナルの活性が POSTN の分泌促進に働くという仮説を立てた。腫瘍の局所に形成される炎症性微小環境では、CAF_s から分泌された POSTN が腫瘍の細胞表面に存在する Integrin α V β 3 や Integrin α V β 5 などのレセプターを介して YAP-TAZ シグナル伝達路を活性化し、癌細胞からの IL-6 分泌が促進される。さらに、CAF_s に存在する IL-6R を介して JAK2-STAT3 シグナル伝達経路を活性化させ、CAF_s からの POSTN の分泌がさらに促進されるという positive feedback 機構の存在が考えられている(73)。本検討の結果から CAF_s^{immature} では、CAF_s^{mature} と比較して IL-6R の発現が高度であり、POSTN 刺激による CAF_s での IL-6R の発現増強についても DR 分類別に差があることが示された。さらに、

CAF_s^{immature}からのIL-6の分泌についても、他のCAF_sに比較してPOSTNの刺激による差異が存在した。これらの新たな知見については過去に報告されておらず、今後さらに検討を重ねることでDR分類型とPOSTNの発現量が関連する機序を明らかにする必要がある。CAF_sから分泌されるIL-6がJAK/STATシグナル伝達経路を介してp53の誘導を抑制することにより癌細胞の増殖や化学療法の治療抵抗性に影響しているという報告は散見されるものの(96-101)、IL-6/STAT3シグナルの経路とPOSTNの関連について検討した報告は僅かである(73, 97)。今回の検討において、CAF_s^{immature}においてPOSTNとIL-6/STAT3シグナルの間にpositive feedback機構が存在しているという仮説は確からしいものとなった。さらに、IL-6中和抗体によりこれらのシグナルを阻害することにより、大腸癌細胞とCAF_sとのクロストークによるがん幹細胞性の亢進を抑制できる可能性も見出せた。一方、本検討はイムノブロット法のみによる解析結果であり、今後2章に示したSphere formation assay、がん幹細胞性関連遺伝子の発現解析、およびALDEFLUOR assayによって再現性の検証を実施する必要がある。

第5節 小括

CAF_s^{immature}ではIL-6分泌が高度であるとともにIL-6Rが高発現しており、同CAF_sにおけるPOSTNとIL-6/STAT3シグナルの相互positive feedback機構の存在が示唆された。IL-6/STAT3シグナルを標的としたPOSTNの抑制により、大腸癌細胞のがん幹細胞性を制御できる可能性が示された。

第5章 全体の考察

癌間質の形態的特徴に基づく大腸癌の DR 分類は有望な新規予後因子として注目されている(4, 11)。本研究では、DR 分類が腫瘍の悪性度と密接に関連する機序の一端を明らかにするために、腫瘍微小環境における大腸癌細胞と間質の主要構成因子である CAFs の相互作用に着目して解析を行った。他癌種では CAFs ががん幹細胞ニッチとして腫瘍のがん幹細胞性を亢進させる作用を有することが報告されているが(13, 102)、本研究では DR 分類別に大腸癌 CAFs を分離培養して検討に用いることで、CAFs ががん幹細胞性に及ぼす影響は一律ではないことを明らかにした。すなわち、CAFs^{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、CAFs^{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唆された。

DR 分類型によって ECM を構成する POSTN の発現量が異なることは既に当講座から報告しているが(66)、本研究では癌間質から培養した CAFs においても POSTN の発現および分泌能が DR 分類別に異なっており、CAFs^{mature} に比較して CAFs^{immature} で POSTN の発現が高度であることを確認した。さらに、他癌種では POSTN の発現および分泌は癌間質中の TGF- β 1 と相互作用を有するとされているが(74, 75)、本研究にて大腸癌においても POSTN によって TGF- β 1 の分泌や Smad2/Smad3 のリン酸化に変化を来すことが確認され、POSTN は TGF- β シグナルを介して大腸癌のがん幹細胞性に影響を及ぼしていると結論した

(図 32) (75)。さらに、腫瘍微小環境におけるインターロイキンと CAFs の関連において、IL-6/STAT3 シグナルを介した POSTN の分泌促進が報告されている(73)。本研究では DR 分類型別に CAFs のインターロイキン分泌を評価し、CAFs^{immature} では IL-6R が高度に発現していると共に IL-6 の分泌能も高いことが確認され、これらは POSTN によって誘導されていることが示唆された。

CAF^s_{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^s_{immature} が大腸癌のがん幹細胞性を亢進させる重要な機序であると考えられた。さらに本研究を通じ、特に CAF^s_{immature} において POSTN や IL-6 の制御によりがん幹細胞性を抑制するスキームが成立することが示唆され、将来的に CAFs を標的とした新規治療のバイオマーカーとして DR 分類を利用できる可能性があると考えた。本研究の成果が、極めて予後不良である immature な癌間質を有する大腸癌症例に対する新たな治療法の開発基盤になることを期待したい。

第6章 結論

DR 分類別の CAFs が大腸癌細胞のがん幹細胞性に与える影響に関して以下のことを明らかにした。

- 1) DR 分類別に腫瘍部、癌間質部を評価することにより、DR が mature な腫瘍と比較して immature な腫瘍ではがん幹細胞性に関与する遺伝子群が有意に高発現していた。さらに、DR 分類別に培養した CAFs と大腸癌のがん幹細胞性との関連を評価したところ、CAF^{mature} に比較して CAF^{immature} が大腸癌細胞のがん幹細胞性を有意に亢進させることを確認し、CAFs ががん幹細胞に及ぼす影響が DR 分類によって異なることが明らかとなった。
- 2) DR が immature な癌間質では POSTN が有意に高発現しており、CAF^{mature} を用いた検討においても CAF^{mature} に比較して CAF^{immature} で POSTN が高度に産生されており、分泌量も多いことが確認された。また、POSTN の発現は、大腸癌と CAFs の相互作用によって誘導され、特に CAF^{immature} で亢進していた。CAF^{immature} では POSTN の高度な分泌により TGF- β 1 および Smad2/3 の動態に及ぼす影響が大きくなっており、TGF- β シグナルを介した機序により大腸癌のがん幹細胞性を亢進している可能性が示された。
- 3) DR が immature な腫瘍では mature な腫瘍に比較して、種々のインターロイキンが高度に発現していた。特に CAF^{immature} では IL-6R が高発現しており、IL-6 の分泌も高度であることを確認した。CAF^{immature} の細胞内では POSTN と IL-6/STAT3 シグナルに positive feedback 機構が存在し、これによって POSTN の分泌が強く促進され、結果的に CAF^{immature} は大腸癌のがん幹細胞性を亢進させると考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の上野秀樹教授に甚大なる感謝の意を表します。また、終始ご教示いただきました防衛医科大学校外科学講座の梶原由規准教授ならびに望月早月講師の両氏に深く感謝いたしますとともに、貴重なご助言を賜りました札幌医科大学第一病理学講座の鳥越俊彦教授および廣橋良彦准教授の両先生、研究にご協力いただきました防衛医科大学校外科学講座の諸先生方に心より感謝いたします。

本研究の主旨は、以下の学会において発表した。

- ・第 28 回 日本消化器関連学会週間 (JDDW) (2020 年 11 月、神戸)
- ・第 75 回 日本消化器外科学会総会 (2020 年 12 月、和歌山)
- ・第 121 回 日本外科学会定期学術集会 (2021 年 4 月、千葉)
- ・第 76 回 日本消化器外科学会総会 (2021 年 7 月、京都)
- ・第 29 回 日本消化器関連学会週間 (JDDW) (2021 年 11 月、神戸)
- ・第 122 回 日本外科学会定期学術集会 (2022 年 4 月、熊本)
- ・第 77 回 日本消化器外科学会総会 (2022 年 7 月、横浜)
- ・第 81 回 日本癌学会総会 (2022 年 9 月、横浜)
- ・第 30 回 日本消化器関連学会週間 (JDDW) (2022 年 10 月、福岡)
- ・第 123 回 日本外科学会定期学術集会 (2023 年 4 月、東京)
- ・第 55 回 日本結合組織学会学術大会 (2023 年 6 月、岡山)
- ・第 78 回 日本消化器外科学会総会 (2023 年 7 月、函館)

略語一覧 (アルファベット順)

ALDH	aldehyde dehydrogenase
CAFs	cancer-associated fibroblasts
DR	desmoplastic reaction
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial mesenchymal transition
ELDA	Extreme Limiting Dilution Analysis for stem cell research
FAP	fibroblast activation protein
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSP-1	fibroblast-specific protein-1
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
HE	hematoxylin-eosin
HRP	horseradish peroxidase
LMD	laser-microdissection
NFs	non-cancer-associated fibroblasts
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SMA	smooth muscle actin
TGF- β	transforming growth factor- β

引用文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(1):16-27.
3. Ueno H, Shinto E, Shimazaki H, Kajiwara Y, Sueyama T, Yamamoto J, Hase K. Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(5):1504-12.
4. Ueno H, Kanemitsu Y, Sekine S, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, Kondo F, Shimazaki H, Kajiwara Y, Okamoto K, Mochizuki S, Tsujimoto H, Shinto E. A Multicenter Study of the Prognostic Value of Desmoplastic Reaction Categorization in Stage II Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol.* 2019;43(8):1015-22.
5. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229-37.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
7. McAllister SS, Weinberg RA. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. *J Clin Oncol.* 2010;28(26):4022-8.
8. Ohlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014;211(8):1503-23.
9. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. Japanese Classification of Colorectal, Appendiceal, and Anal Carcinoma: the 3rd English Edition [Secondary Publication]. *J Anus Rectum Colon.* 2019;3(4):175-95.
10. Ueno H, Kanemitsu Y, Sekine S, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, Kondo F, Shimazaki H, Mochizuki S, Kajiwara Y, Shinto E, Yamamoto J. Desmoplastic Pattern at the Tumor Front Defines Poor-prognosis Subtypes of Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(11):1506-12.
11. Ueno H, Sekine S, Oshiro T, Kanemitsu Y, Hamaguchi T, Shida D, Takashima A, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, Kondo F, Shimazaki H, Mochizuki S, Kajiwara Y, Shinto E, Yamamoto J, Shimada Y. Disentangling the prognostic heterogeneity of stage III colorectal cancer through histologic stromal categorization. *Surgery.* 2018;163(4):777-83.
12. Ueno H, Ishiguro M, Nakatani E, Ishikawa T, Uetake H, Murotani K, Matsui S,

- Teramukai S, Sugai T, Ajioka Y, Maruo H, Kotaka M, Tsujie M, Munemoto Y, Yamaguchi T, Kuroda H, Fukunaga M, Tomita N, Sugihara K. Prognostic value of desmoplastic reaction characterisation in stage II colon cancer: prospective validation in a Phase 3 study (SACURA Trial). *Br J Cancer*. 2021;124(6):1088-97.
13. Hu JL, Wang W, Lan XL, Zeng ZC, Liang YS, Yan YR, Song FY, Wang FF, Zhu XH, Liao WJ, Liao WT, Ding YQ, Liang L. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):91.
14. Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, De Jesus-Acosta A, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses HL, Weaver VM, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 2014;25(6):719-34.
15. Bai YP, Shang K, Chen H, Ding F, Wang Z, Liang C, Xu Y, Sun MH, Li YY. FGF-1/-3/FGFR4 signaling in cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in colon cancer through Erk and MMP-7. *Cancer Sci*. 2015;106(10):1278-87.
16. Herrera M, Herrera A, Dominguez G, Silva J, Garcia V, Garcia JM, Gomez I, Soldevilla B, Munoz C, Provencio M, Campos-Martin Y, Garcia de Herreros A, Casal I, Bonilla F, Pena C. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci*. 2013;104(4):437-44.
17. Wintzell M, Hjerpe E, Avall Lundqvist E, Shoshan M. Protein markers of cancer-associated fibroblasts and tumor-initiating cells reveal subpopulations in freshly isolated ovarian cancer ascites. *BMC Cancer*. 2012;12:359.
18. Wu F, Yang J, Liu J, Wang Y, Mu J, Zeng Q, Deng S, Zhou H. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):218.
19. Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, Wang M, Luo M, Xing Y, Chen F, Huang D, Zhao J, Yang L, Liao D, Su F, Li M, Liu Q, Song E. CD10(+)/GPR77(+) Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*. 2018;172(4):841-56 e16.
20. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells*. 2014;32(1):145-56.
21. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64.

22. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
23. Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*. 1963;199:79-80.
24. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011;17(3):313-9.
25. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-7.
26. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
27. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-10.
28. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313-23.
29. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-8.
30. Mohamed SY, Kaf RM, Ahmed MM, Elwan A, Ashour HR, Ibrahim A. The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2019;50(4):824-37.
31. Hong I, Hong SW, Chang YG, Lee WY, Lee B, Kang YK, Kim YS, Paik IW, Lee H. Expression of the Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Colorectal Cancer: An Immunohistochemical Staining Analysis. *Ann Coloproctol*. 2015;31(3):84-91.
32. Cherciu I, Barbalan A, Pirici D, Margaritescu C, Saftoiu A. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations. *Curr Health Sci J*. 2014;40(3):153-61.
33. Gires O. Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(24):4009-22.
34. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*. 2008;68(11):4311-20.
35. Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW, Zoeller M. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med*. 2008;8(8):784-804.

36. Chen Y, Wang MH, Wu JY, Zhu JY, Xie CF, Li XT, Wu JS, Geng SS, Li YD, Han HY, Zhong CY. DeltaNp63alpha mediates sulforaphane suppressed colorectal cancer stem cell properties through transcriptional regulation of Nanog/Oct4/Sox2. *J Nutr Biochem.* 2022;107:109067.
37. Noroozi Karimabad M, Roostaei F, Mahmoodi M, Hajizadeh MR. Evaluation of the Effect of Orlistat on Expression of OCT4, Nanog, SOX2, and KLF4 Genes in Colorectal Cancer SW40 Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021;22(8):2335-41.
38. Wang C, Xie J, Guo J, Manning HC, Gore JC, Guo N. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2012;28(4):1301-8.
39. Bunger S, Vollbrandt T, Danner S, Bruch HP, Kruse C, Roblick UJ, Habermann JK. Expression profiles of cancer stem cell markers in colorectal cancer cell lines. *J Stem Cells Regen Med.* 2010;6(2):145.
40. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B, Wang TC. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2011;19(2):257-72.
41. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116(6):769-78.
42. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(18):10356-61.
43. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol.* 2010;12(5):468-76.
44. Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1955-62.
45. Yoshimatsu Y, Wakabayashi I, Kimuro S, Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi M, Maishi N, Podyma-Inoue KA, Hida K, Miyazono K, Watabe T. TNF-alpha enhances TGF-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF-beta signal augmentation. *Cancer Sci.* 2020;111(7):2385-99.
46. Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai N, Masamune A, Hara A, Esaki N, Ushida K, Mii S, Shiraki Y, Ando K, Weng L, Ishihara S, Ponik SM, Conklin MW, Haga

- H, Nagasaka A, Miyata T, Matsuyama M, Kobayashi T, Fujii T, Yamada S, Yamaguchi J, Wang T, Woods SL, Worthley D, Shimamura T, Fujishiro M, Hirooka Y, Enomoto A, Takahashi M. Mefflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res.* 2019;79(20):5367-81.
47. Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. Identification of Mefflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep.* 2016;6:22288.
48. Ueno H, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR, Talbot IC. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut.* 2004;53(4):581-6.
49. Cesano A. nCounter[®] PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA). *J Immunother Cancer.* 2015;3:42.
50. Jandova J, Wondrak GT. Genomic GLO1 deletion modulates TXNIP expression, glucose metabolism, and redox homeostasis while accelerating human A375 malignant melanoma tumor growth. *Redox Biol.* 2021;39:101838.
51. D'Angelo A, Kilili H, Chapman R, Generali D, Tinhofer I, Luminari S, Donati B, Ciarrocchi A, Giannini R, Moretto R, Cremolini C, Pietrantonio F, Sobhani N, Bonazza D, Prins R, Song SG, Jeon YK, Pisignano G, Cinelli M, Bagby S, Urrutia AO. Immune-related pan-cancer gene expression signatures of patient survival revealed by NanoString-based analyses. *PLoS One.* 2023;18(1):e0280364.
52. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods.* 2009;347(1-2):70-8.
53. Keymoosi H, Gheytanchi E, Asgari M, Shariftabrizi A, Madjd Z. ALDH1 in combination with CD44 as putative cancer stem cell markers are correlated with poor prognosis in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(5):2013-20.
54. Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(12):906-22.
55. Ao T, Mochizuki S, Kajiwara Y, Yonemura K, Shiraishi T, Nagata K, Shinto E, Okamoto K, Nearchou IP, Shimazaki H, Kishi Y, Okada Y, Ueno H. Cancer-associated fibroblasts at the unfavorable desmoplastic stroma promote colorectal cancer aggressiveness: Potential role of ADAM9. *Int J Cancer.* 2022;150(10):1706-21.
56. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392-

401.

57. Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-- bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(1):67-73.
58. Chen WJ, Ho CC, Chang YL, Chen HY, Lin CA, Ling TY, Yu SL, Yuan SS, Chen YJ, Lin CY, Pan SH, Chou HY, Chen YJ, Chang GC, Chu WC, Lee YM, Lee JY, Lee PJ, Li KC, Chen HW, Yang PC. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun.* 2014;5:3472.
59. Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med.* 2010;16(12):1400-6.
60. Browning L, Patel MR, Horvath EB, Tawara K, Jorcyk CL. IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:6685-93.
61. Sandberg TP, Stuart M, Oosting J, Tollenaar R, Sier CFM, Mesker WE. Increased expression of cancer-associated fibroblast markers at the invasive front and its association with tumor-stroma ratio in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):284.
62. Ji Z, Tian W, Gao W, Zang R, Wang H, Yang G. Cancer-Associated Fibroblast-Derived Interleukin-8 Promotes Ovarian Cancer Cell Stemness and Malignancy Through the Notch3-Mediated Signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:684505.
63. Cai J, Tang H, Xu L, Wang X, Yang C, Ruan S, Guo J, Hu S, Wang Z. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis.* 2012;33(1):20-9.
64. Chen L, Yang F, Chen S, Tai J. Mechanisms on chemotherapy resistance of colorectal cancer stem cells and research progress of reverse transformation: A mini-review. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:995882.
65. Zheng H, Liu H, Li H, Dou W, Wang J, Zhang J, Liu T, Wu Y, Liu Y, Wang X. Characterization of stem cell landscape and identification of stemness-relevant prognostic gene signature to aid immunotherapy in colorectal cancer. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):244.
66. Sueyama T, Kajiwara Y, Mochizuki S, Shimazaki H, Shinto E, Hase K, Ueno H. Periostin as a key molecule defining desmoplastic environment in colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2021;478(5):865-74.
67. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* 1993;294 (Pt 1)(Pt 1):271-8.
68. Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto KI. Periostin in

Allergic Inflammation. *Allergol Int.* 2014;63(2):143-51.

69. Contie S, Voorzanger-Rousselot N, Litvin J, Clezardin P, Garnero P. Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer bone metastases. *Int J Cancer.* 2011;128(2):352-60.

70. Kanno A, Satoh K, Masamune A, Hirota M, Kimura K, Umino J, Hamada S, Satoh A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer.* 2008;122(12):2707-18.

71. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res.* 2002;62(18):5358-64.

72. Han L, Gong S, Wang R, Liu S, Wang B, Chen G, Gong T, Xu W. Knockdown of POSTN Inhibits Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Patients With Steroid-Induced Osteonecrosis. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:606289.

73. Ma H, Wang J, Zhao X, Wu T, Huang Z, Chen D, Liu Y, Ouyang G. Periostin Promotes Colorectal Tumorigenesis through Integrin-FAK-Src Pathway-Mediated YAP/TAZ Activation. *Cell Rep.* 2020;30(3):793-806 e6.

74. Yue H, Li W, Chen R, Wang J, Lu X, Li J. Stromal POSTN induced by TGF-beta1 facilitates the migration and invasion of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2021;160(2):530-8.

75. Chen G, Wang Y, Zhao X, Xie XZ, Zhao JG, Deng T, Chen ZY, Chen HB, Tong YF, Yang Z, Ding XW, Guo PY, Yu HT, Wu LJ, Zhang SN, Zhu QD, Li JJ, Shan YF, Yu FX, Yu ZP, Xia JL. A positive feedback loop between Periostin and TGFbeta1 induces and maintains the stemness of hepatocellular carcinoma cells via AP-2alpha activation. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):218.

76. Qin X, Yan M, Zhang J, Wang X, Shen Z, Lv Z, Li Z, Wei W, Chen W. TGFbeta3-mediated induction of Periostin facilitates head and neck cancer growth and is associated with metastasis. *Sci Rep.* 2016;6:20587.

77. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res.* 1999;14(7):1239-49.

78. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, Arron JR, Holweg CT, Kudo A. The role of periostin in tissue remodeling across health and

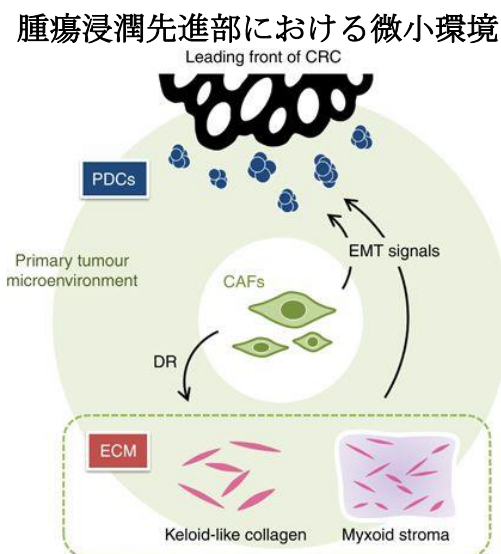
- disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(7):1279-88.
79. Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Ono J, Mitamura Y, Yoshihara T. Periostin in inflammation and allergy. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(23):4293-303.
80. Kudo A. Introductory review: periostin-gene and protein structure. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(23):4259-68.
81. Liu AY, Zheng H, Ouyang G. Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol.* 2014;37:150-6.
82. Wang Z, Xiong S, Mao Y, Chen M, Ma X, Zhou X, Ma Z, Liu F, Huang Z, Luo Q, Ouyang G. Periostin promotes immunosuppressive premetastatic niche formation to facilitate breast tumour metastasis. *J Pathol.* 2016;239(4):484-95.
83. Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, Almeida D, Koller A, Hajjar KA, Stainier DY, Chen EI, Lyden D, Bissell MJ. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):807-17.
84. Wang Z, Ouyang G. Periostin: a bridge between cancer stem cells and their metastatic niche. *Cell Stem Cell.* 2012;10(2):111-2.
85. Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature.* 2011;481(7379):85-9.
86. Yeh HW, Lee SS, Chang CY, Lang YD, Jou YS. A New Switch for TGFbeta in Cancer. *Cancer Res.* 2019;79(15):3797-805.
87. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-15.
88. Wen S, Niu Y, Yeh S, Chang C. BM-MSCs promote prostate cancer progression via the conversion of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Int J Oncol.* 2015;47(2):719-27.
89. Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, McKenzie AN, Nagai H, Hotokebuchi T, Izuhara K. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(1):98-104.
90. Inai K, Norris RA, Hoffman S, Markwald RR, Sugi Y. BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis. *Dev Biol.* 2008;315(2):383-96.
91. Milonski J, Zielinska-Blizniewska H, Majsterek I, Przybylowska-Sygut K, Sitarek P, Korzycka-Zaborowska B, Olszewski J. Expression of POSTN, IL-4, and IL-

- 13 in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *DNA Cell Biol.* 2015;34(5):342-9.
92. Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, Shirakawa T, Deichmann KA, Arima K, Hamasaki N, Hopkin JM. Recent advances in understanding how interleukin 13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2000;48(6):505-12.
93. Izuhara K, Arima K, Yasunaga S. IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002;1(3):263-9.
94. Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med*. 1999;3(1):3-10.
95. Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, Hayashi K, Arima K, Myburgh E, Izuhara K, Brombacher F, Kubo M. IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(10):6158-66.
96. Cheteh EH, Sarne V, Ceder S, Bianchi J, Augsten M, Rundqvist H, Egevad L, Ostman A, Wiman KG. Interleukin-6 derived from cancer-associated fibroblasts attenuates the p53 response to doxorubicin in prostate cancer cells. *Cell Death Discov*. 2020;6:42.
97. Karakasheva TA, Lin EW, Tang Q, Qiao E, Waldron TJ, Soni M, Klein-Szanto AJ, Sahu V, Basu D, Ohashi S, Baba K, Giaccone ZT, Walker SR, Frank DA, Wileyto EP, Long Q, Dunagin MC, Raj A, Diehl JA, Wong KK, Bass AJ, Rustgi AK. IL-6 Mediates Cross-Talk between Tumor Cells and Activated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*. 2018;78(17):4957-70.
98. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):234-48.
99. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*. 2016;37(9):11553-72.
100. Brighenti E, Calabrese C, Liguori G, Giannone FA, Trere D, Montanaro L, Derenzini M. Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: a new pathway connecting inflammation to cancer. *Oncogene*. 2014;33(35):4396-406.
101. Berek JS, Chung C, Kaldi K, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(4):1038-42; discussion 42-3.
102. Nair N, Calle AS, Zahra MH, Prieto-Vila M, Oo AKK, Hurley L, Vaidyanath A, Seno A, Masuda J, Iwasaki Y, Tanaka H, Kasai T, Seno M. A cancer stem cell model as

the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Sci Rep.* 2017;7(1):6838.

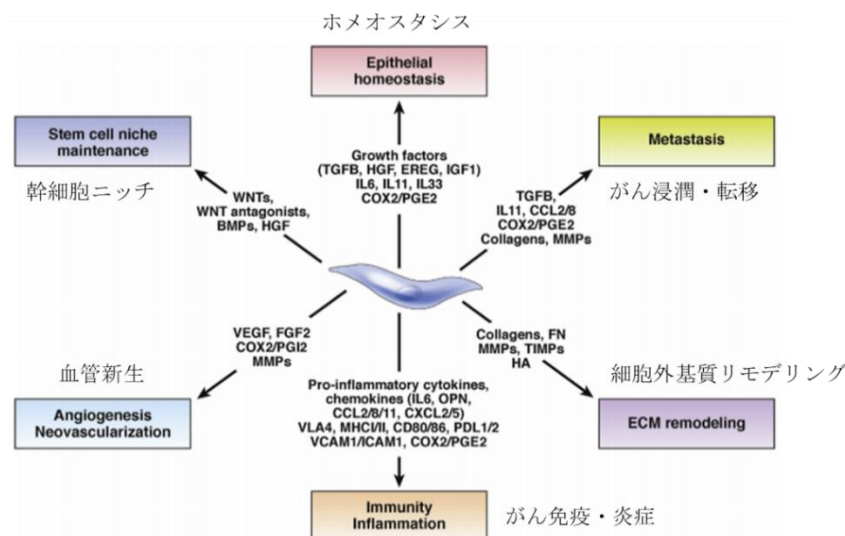
図表

A



Ueno H et al. Br J Cancer (2014) より引用・改変

B



Koliaraki V. et al, Gastroenterology 2017;152:964-979 より引用・改変

図1 癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAFs) の特性

A. 癌の間質 (腫瘍微小環境) を構成する線維芽細胞は CAFs と呼ばれており、keloid-like collagen や myxoid な間質などの DR と poorly differentiated clusters (PDCs) といった EMT に関連していると考えられている。

B. CAFs は癌細胞の増殖や抗癌剤治療への抵抗性を誘導し、さらに抗腫瘍免疫を抑制して癌の悪性度を促進することが知られている。さらに近年では、がん幹細胞のニッチとして重要な役割を果たすことが報告されている。

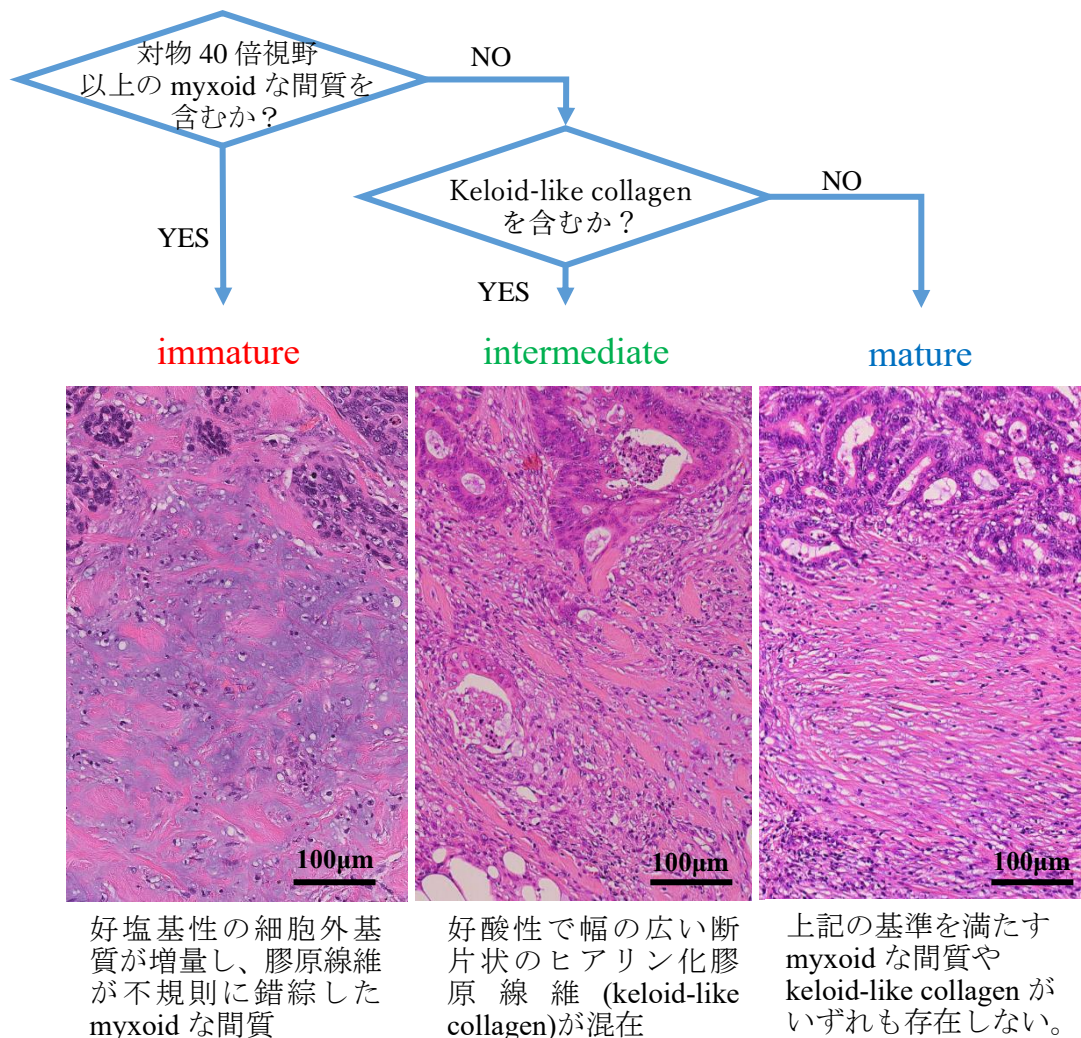
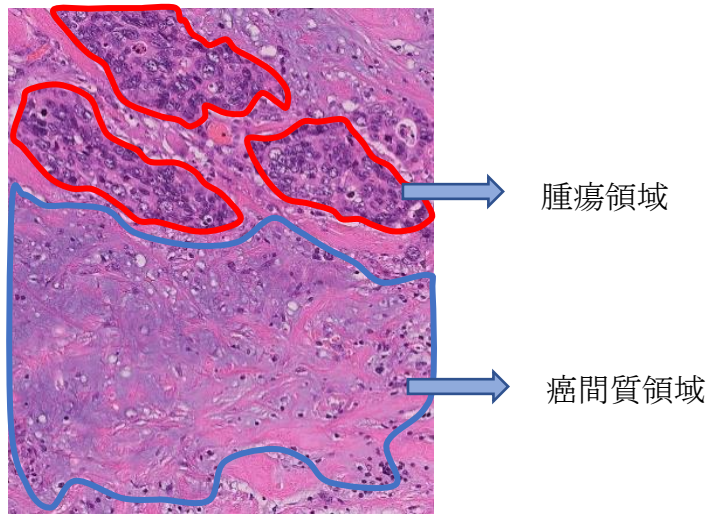


図 2 DR 分類の診断アルゴリズム

HE 染色標本にて、固有筋層外における腫瘍先進部の線維性癌間質を弱～中拡大の視野で観察して myxoid な間質や keloid-like collagen の有無を評価し、上記の手順で immature, intermediate, mature に分類する。

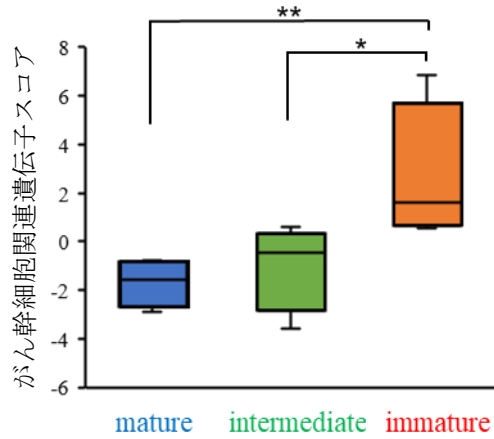
この分類は、個々の大腸癌の線維性癌間質反応の特徴を、量ではなく、質を基準に評価するものである。

A

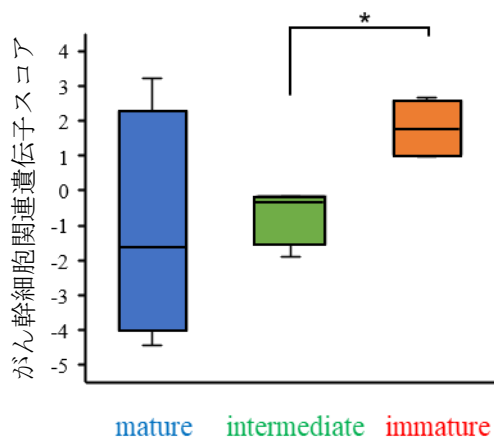


B

腫瘍領域



癌間質領域



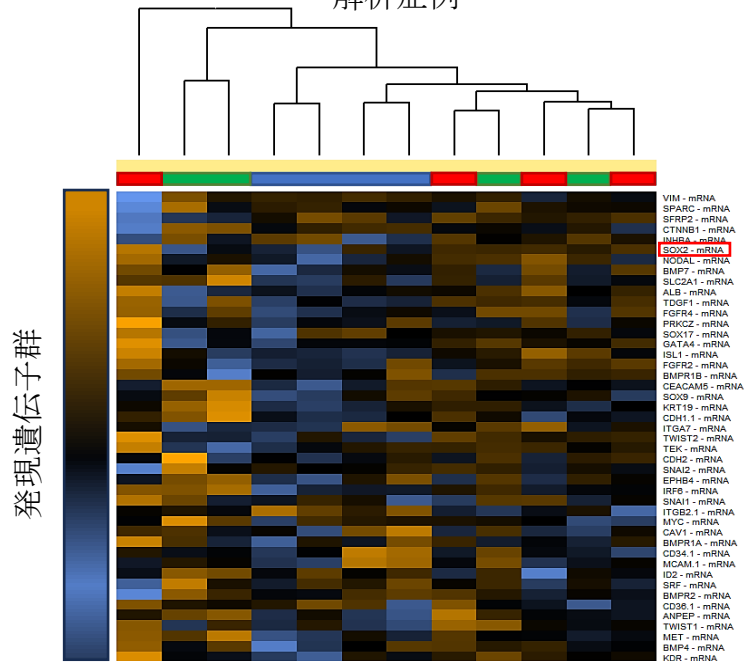
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図3 レーザーマイクロダイセクションを用いて採取した大腸癌組織検体におけるRNA発現の網羅的解析

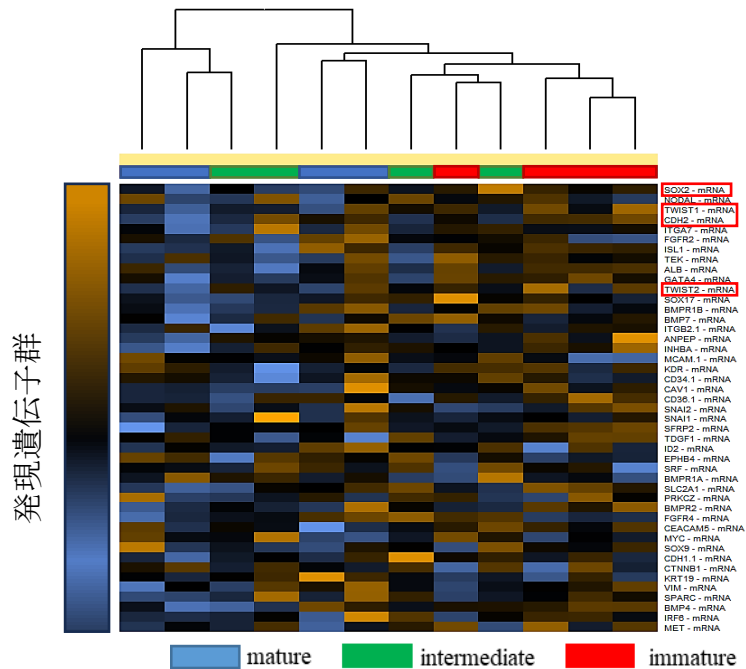
レーザーマイクロダイセクションによる標本採取の例 (A) と DR 分類別のがん幹細胞関連遺伝子スコアの評価 (各4例) (B)

腫瘍領域

解析症例



癌間質領域

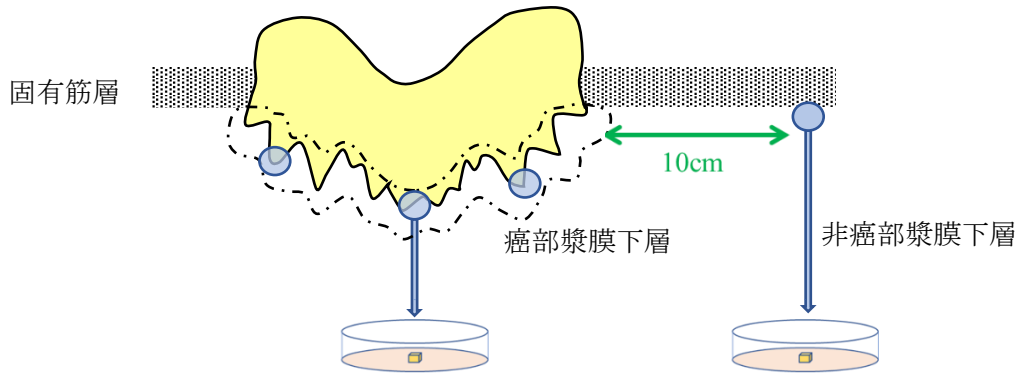


■ mature ■ intermediate ■ immature

図4 レーザーマイクロダイセクションを用いた網羅的 RNA 発現解析における各 DR 分類とがん幹細胞関連遺伝子、EMT 関連遺伝子に関するヒートマップ

DR 分類別に各 4 例について検討を行い、がん幹細胞性に関与すると報告されている EMT 関連遺伝子のうち、TWIST1、TWIST2、CDH2 を含む EMT 関連遺伝子が immature 群で強く発現している。さらに、がん幹細胞性に関連する代表的な遺伝子である SOX2 も、腫瘍領域、癌間質領域ともに mature 群に比較して immature 群で高度に発現している。

A



B

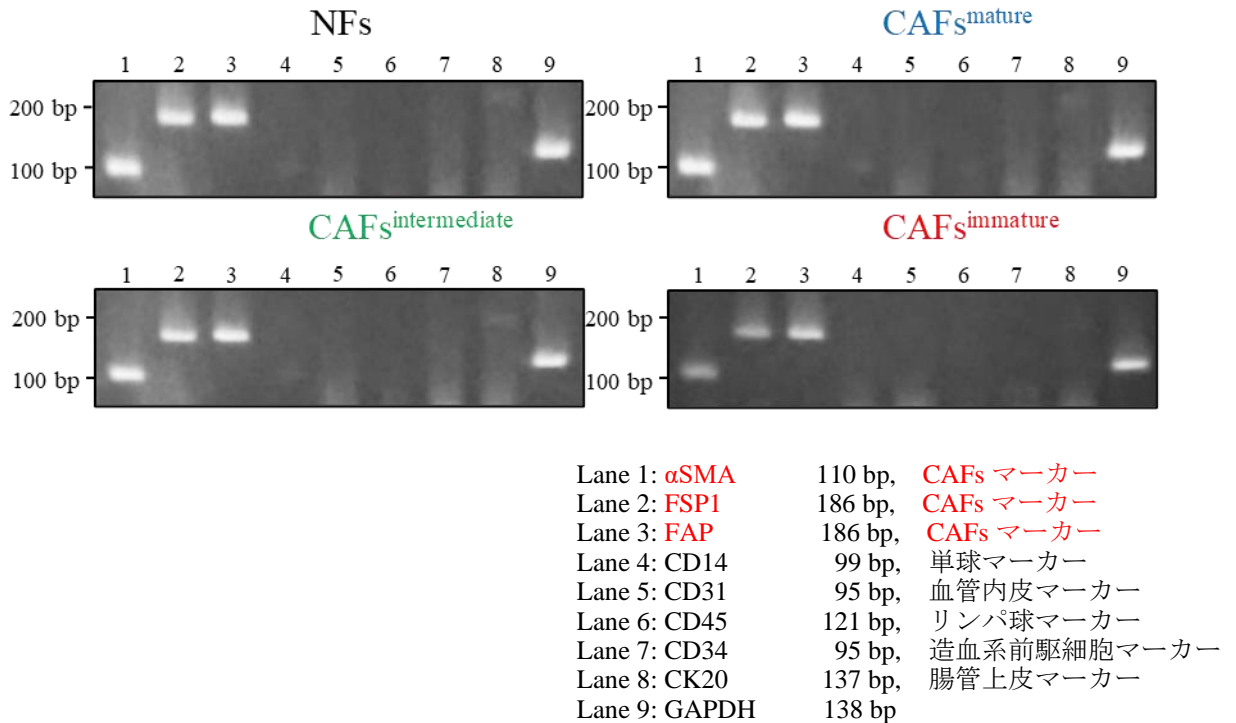


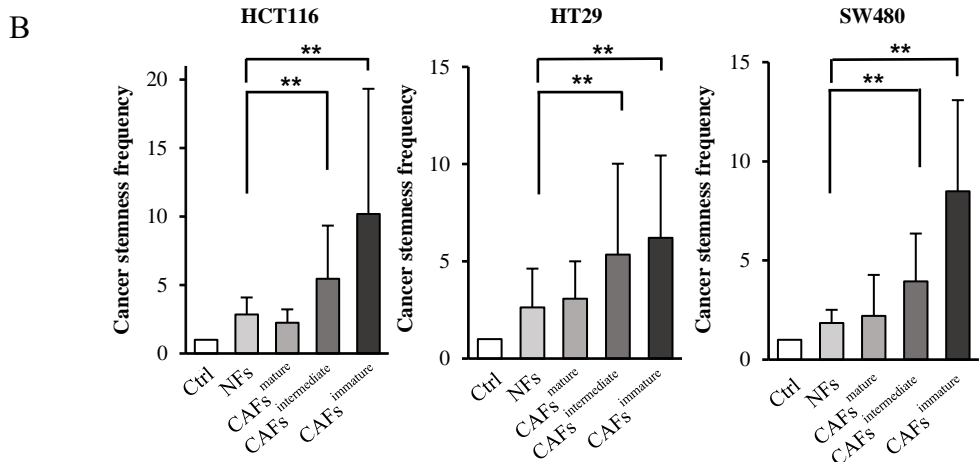
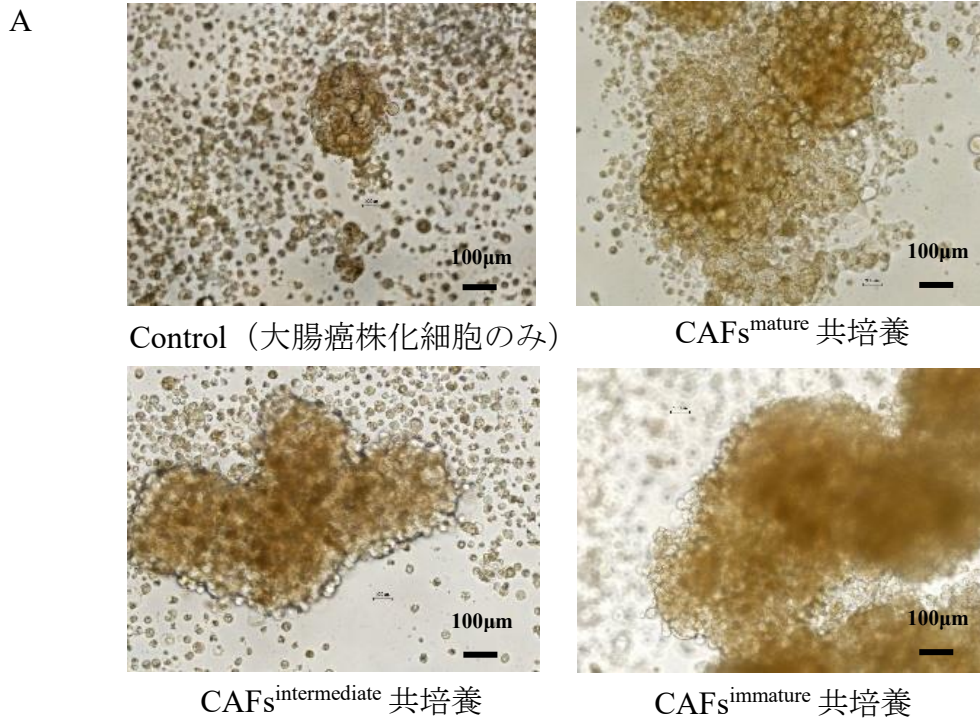
図5 CAFs および NFs の培養

A. CAF および NFs の採取方法

癌部漿膜下層ならびに非癌部漿膜下層から組織を採取し培養した。

B. CAFs における細胞マーカー発現の確認

培養した CAFs について、線維芽細胞マーカーが陽性であることと、血球マーカーや腸管上皮マーカーが陰性であることが確認される。

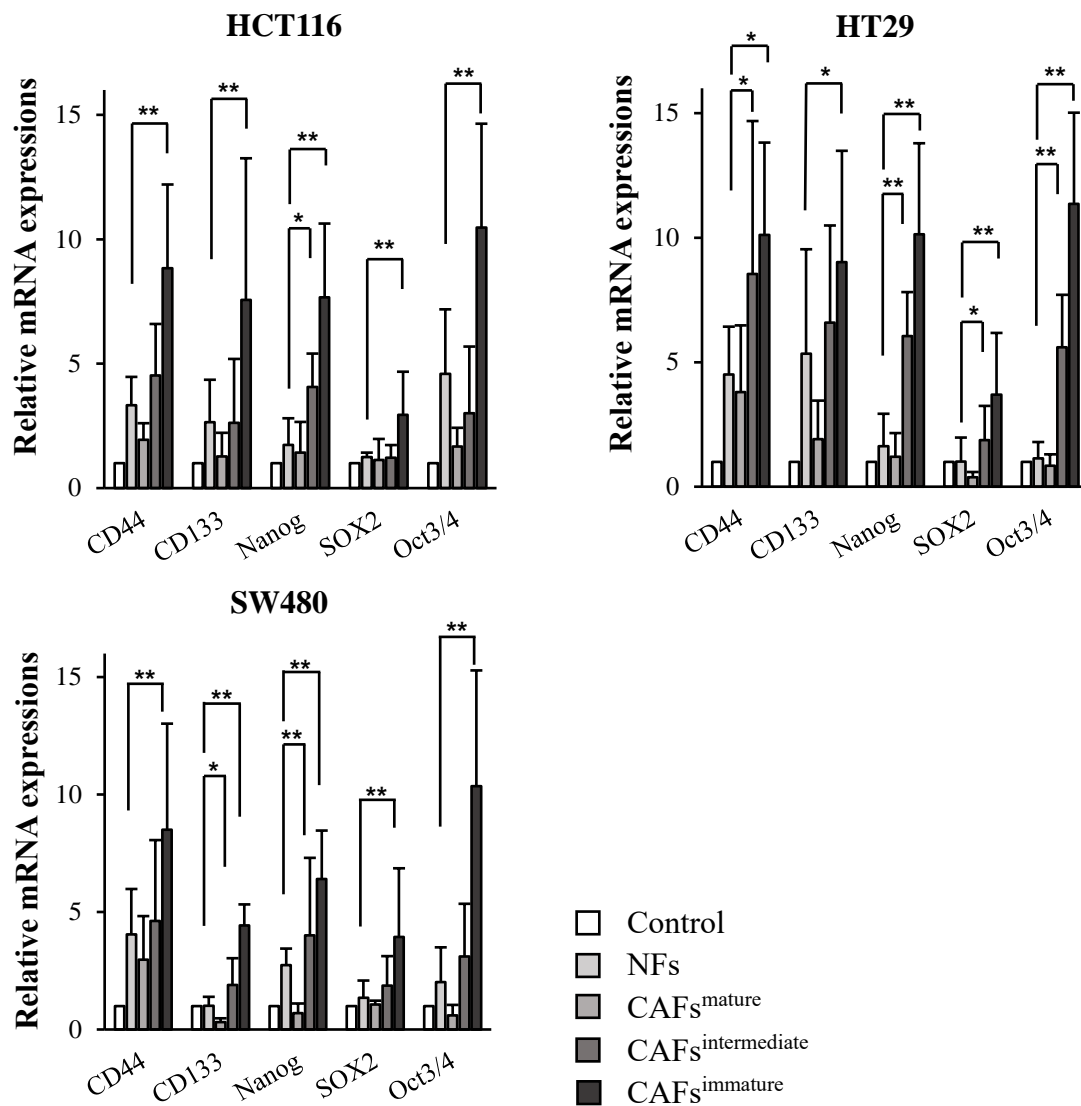


** p < 0.01

図6 DR分類別のCAF^sを用いた共培養における Sphere formation assay

A. 典型的な Sphere 形成像 (bar: 100µm)

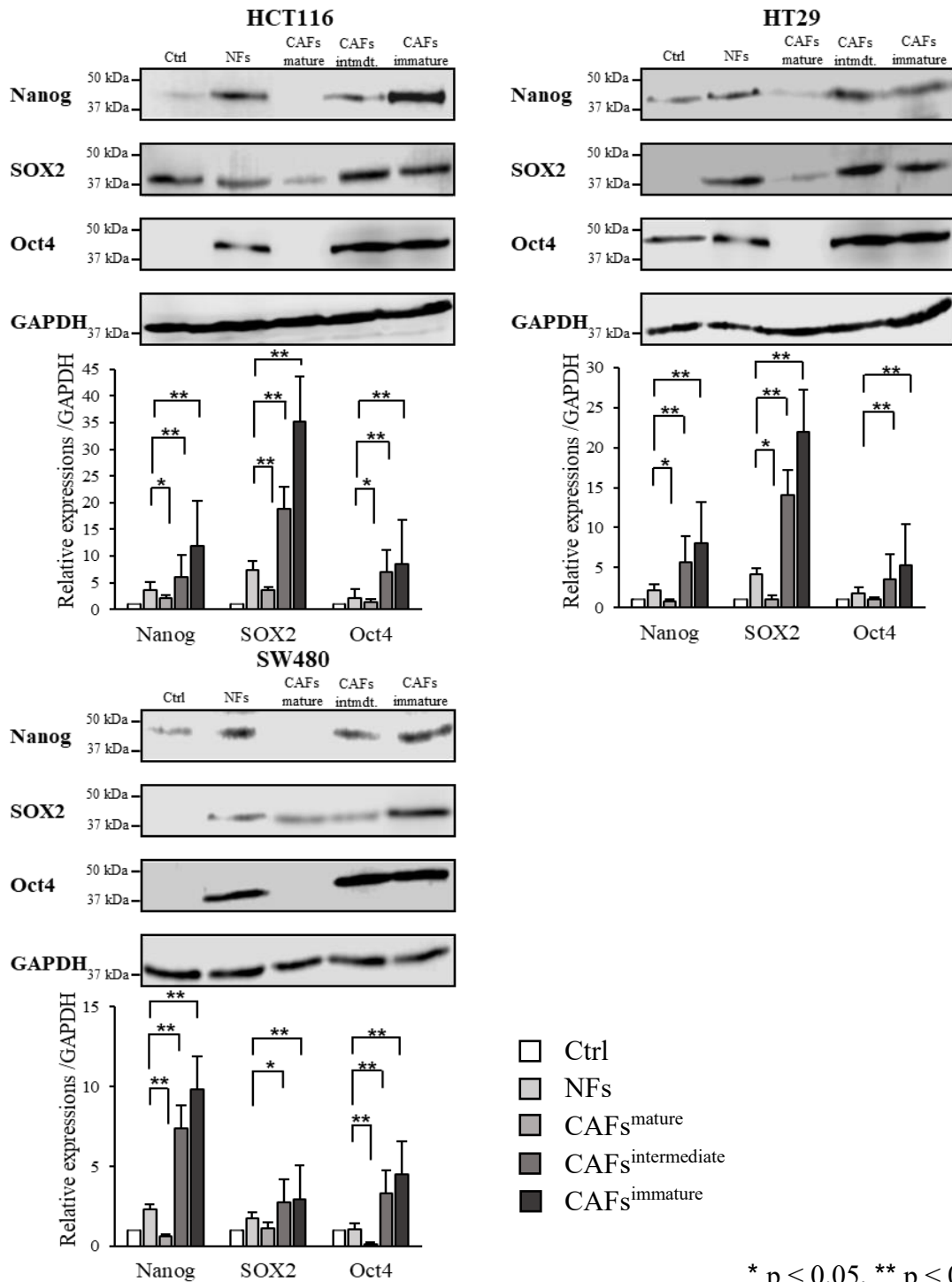
B. Sphere formation assay により算出される Cancer stemness frequency の評価 (各 15 例)。各大腸癌株化細胞は CAF^s^{intermediate}, CAF^s^{immature} との共培養により NFs との共培養に比較して Cancer stemness frequency は有意に増加している。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図7 DR分類別のCAF_sまたはNF_sと大腸癌株化細胞の共培養下における培養細胞群のがん幹細胞性関連遺伝子の発現

DR分類別のCAF_sまたはNF_s（各15例）で評価を行ったところ、NF_sに比較してCAF_s^{immature}は各大腸癌株化細胞と共培養することで、共培養細胞中のがん幹細胞関連遺伝子（CD44, CD133, Nanog, SOX2, Oct3/4）の発現がいずれも有意に増加している。

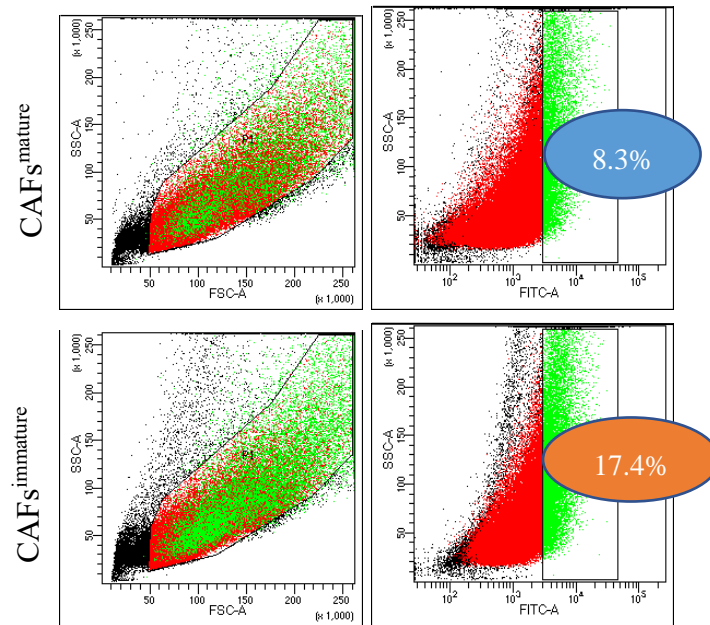


* p < 0.05, ** p < 0.01

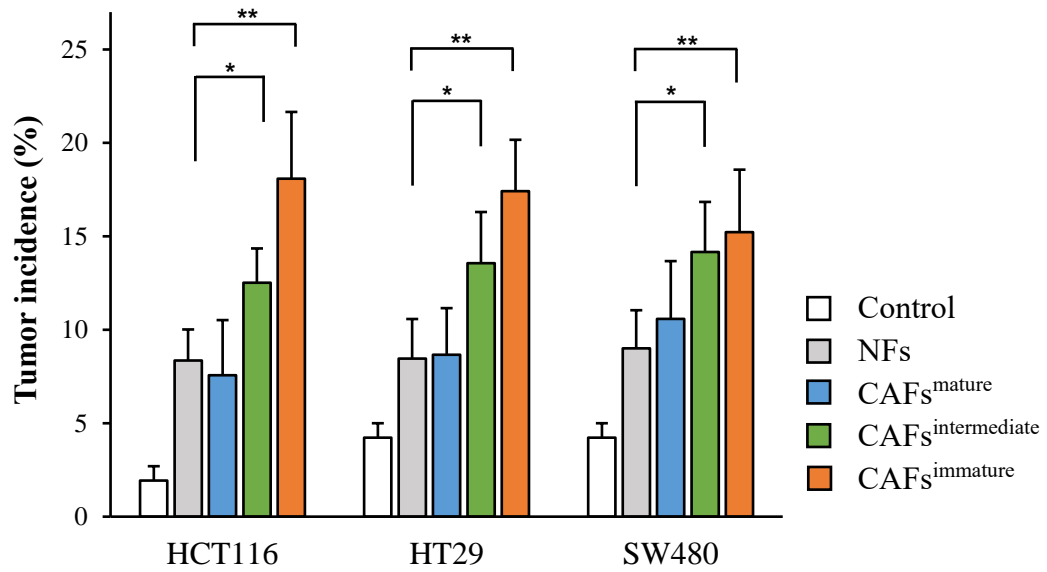
図8 DR分類別のCAF^sまたはNF^sと大腸癌株化細胞の共培養下における培養細胞群のがん幹細胞関連蛋白質の発現

NF^sに比較してCAF^s^{intermediate}, CAF^s^{immature}との各大腸癌株化細胞の共培養群(各15例)では、がん幹細胞関連蛋白質がいずれも有意な高発現を示す。一方で、CAF^s^{mature}との共培養群では、がん幹細胞関連蛋白質(一部の蛋白質を除く)が有意な低発現を示す。

A



B



* p < 0.05, ** p < 0.01

図9 DR分類別のCAFsまたはNFsと大腸癌株化細胞の共培養下における培養細胞群のALDH1活性

A. 大腸癌株化細胞としてGatingされた細胞のうち、ALDH1^{high}の細胞は緑色、ALDH1^{low}の細胞は赤色として検出される。

B. NFsに比較してCAF_s^{intermediate}, CAF_s^{immature}との各大腸癌株化細胞の共培養群では、がん幹細胞の亜分画とされるALDH1活性が高い細胞分画が有意に多い(各15例)。

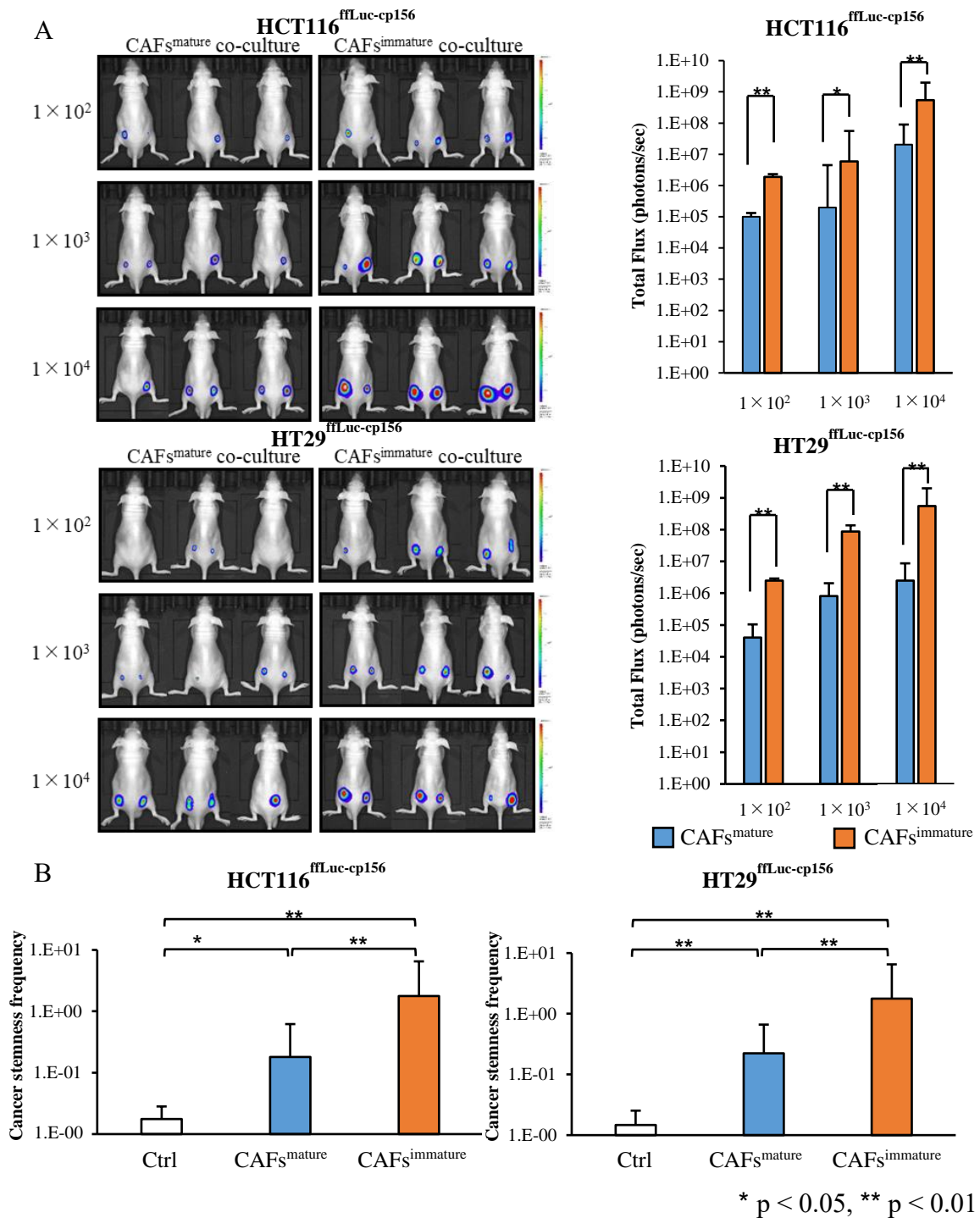


図 10 DR 分類別の CAFs と蛍光発色させた大腸癌株化細胞のマウス皮下混合移植による In vivo tumor formation assay

A. DR 分類別の CAFs と混合移植した際の IVIS による生着率の評価 (各 6 例)

B. Cancer stemness frequency の評価。CAF_s^{mature} に比較して CAF_s^{immature} と共培養した移植細胞は Cancer stemness frequency が有意に高度である。

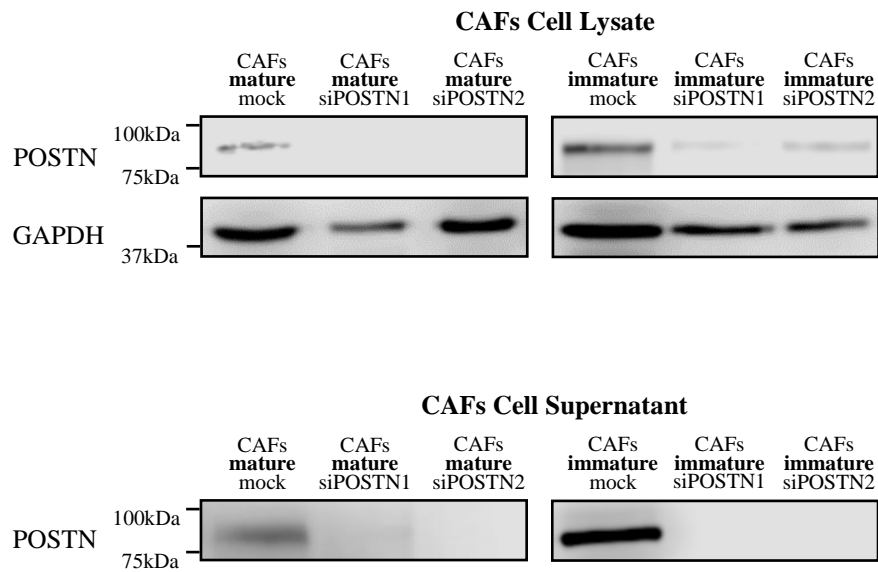


図 11 siRNA vector を用いた POSTN のノックダウンによる CAFs 細胞およびその培養上清における POSTN 蛋白質の発現抑制状況

POSTN を siRNA でノックダウンした CAFs の細胞およびその培養上清において、POSTN の発現と分泌がそれぞれ抑制されていることを確認した。

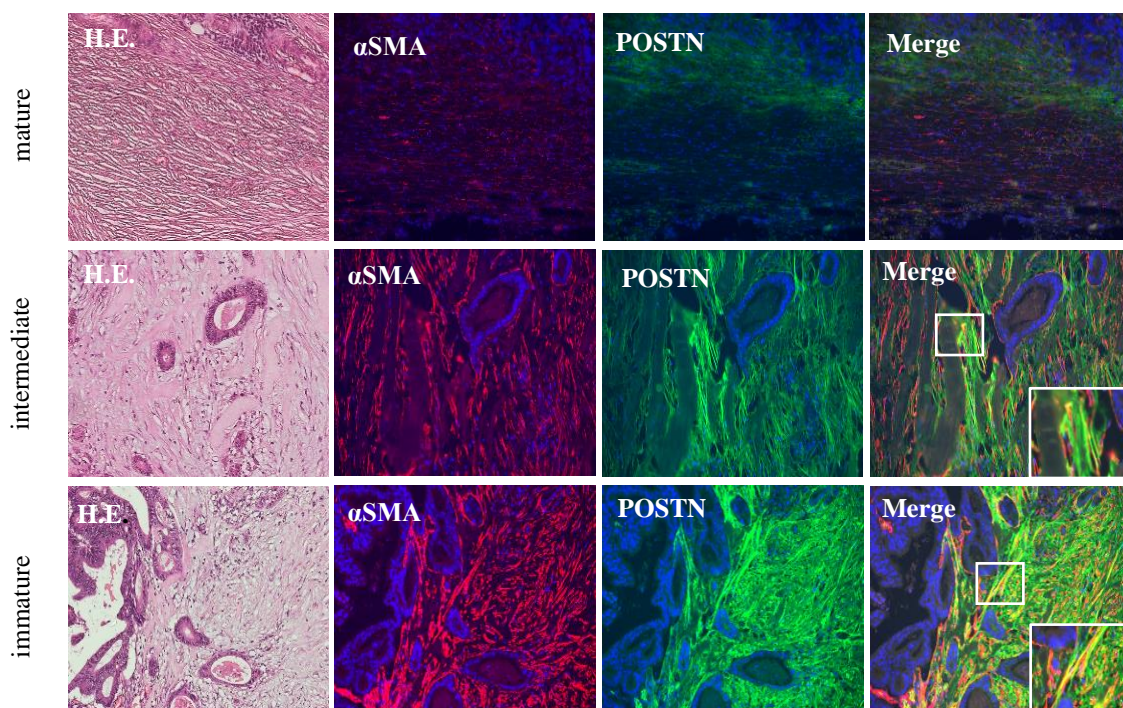


図 12 蛍光二重免疫染色による DR 分類別の POSTN の発現評価

DR 分類別の手術検体のパラフィン薄切切片に対し、CAFs のマーカーである α SMA および POSTN の蛍光二重免疫染色を施行した。いずれの DR 分類の標本においても POSTN は腫瘍細胞に殆ど発現していない。一方、DR が intermediate および immature の間質では POSTN が広範囲に発現している。mature の間質で POSTN は殆ど発現がみられない。

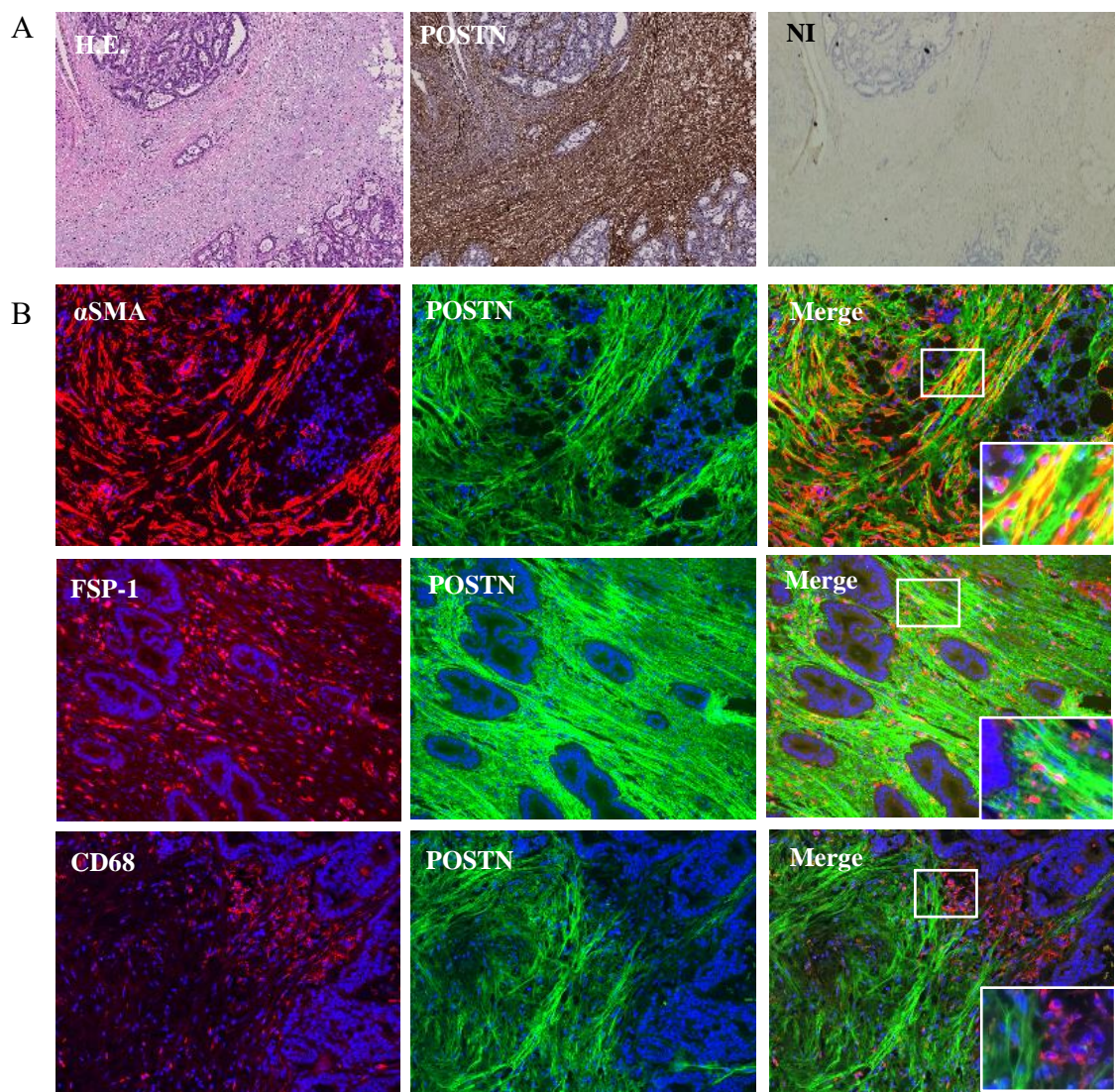


図 13 DR immature の間質における POSTN 発現の局在

A. 免疫化学染色による評価

POSTN は癌間質にびまん性に発現している。

B. 蛍光二重免疫染色による評価

POSTN (緑)は CAFs のマーカーである α SMA (赤)や FSP-1 (赤)と共染色され (黄)、マクロファージのマーカーである CD68 (赤)とは共染色されない。

NI: nonimmune control image, α SMA: alpha-smooth muscle actin,

FSP-1: fibroblast-specific protein-1

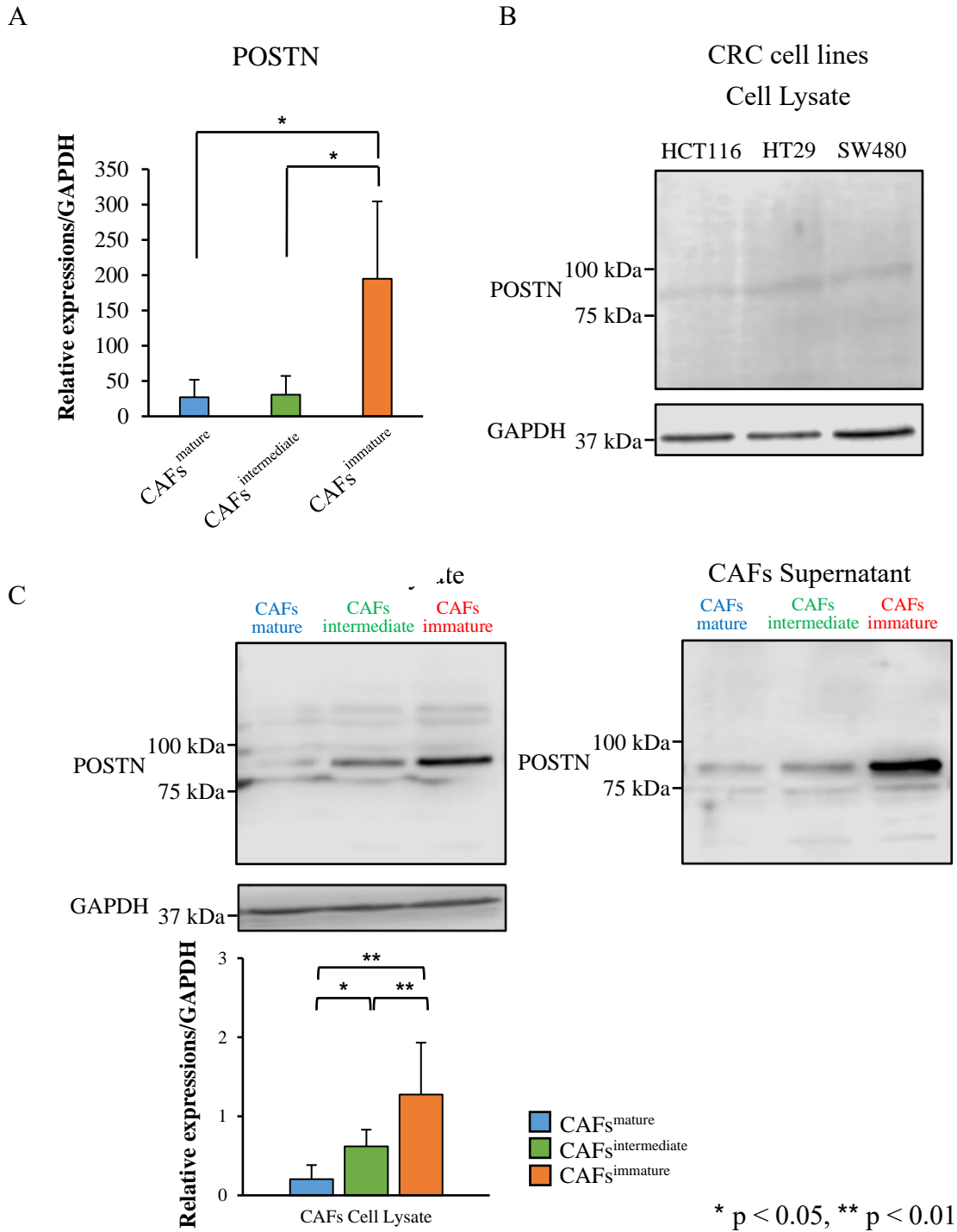
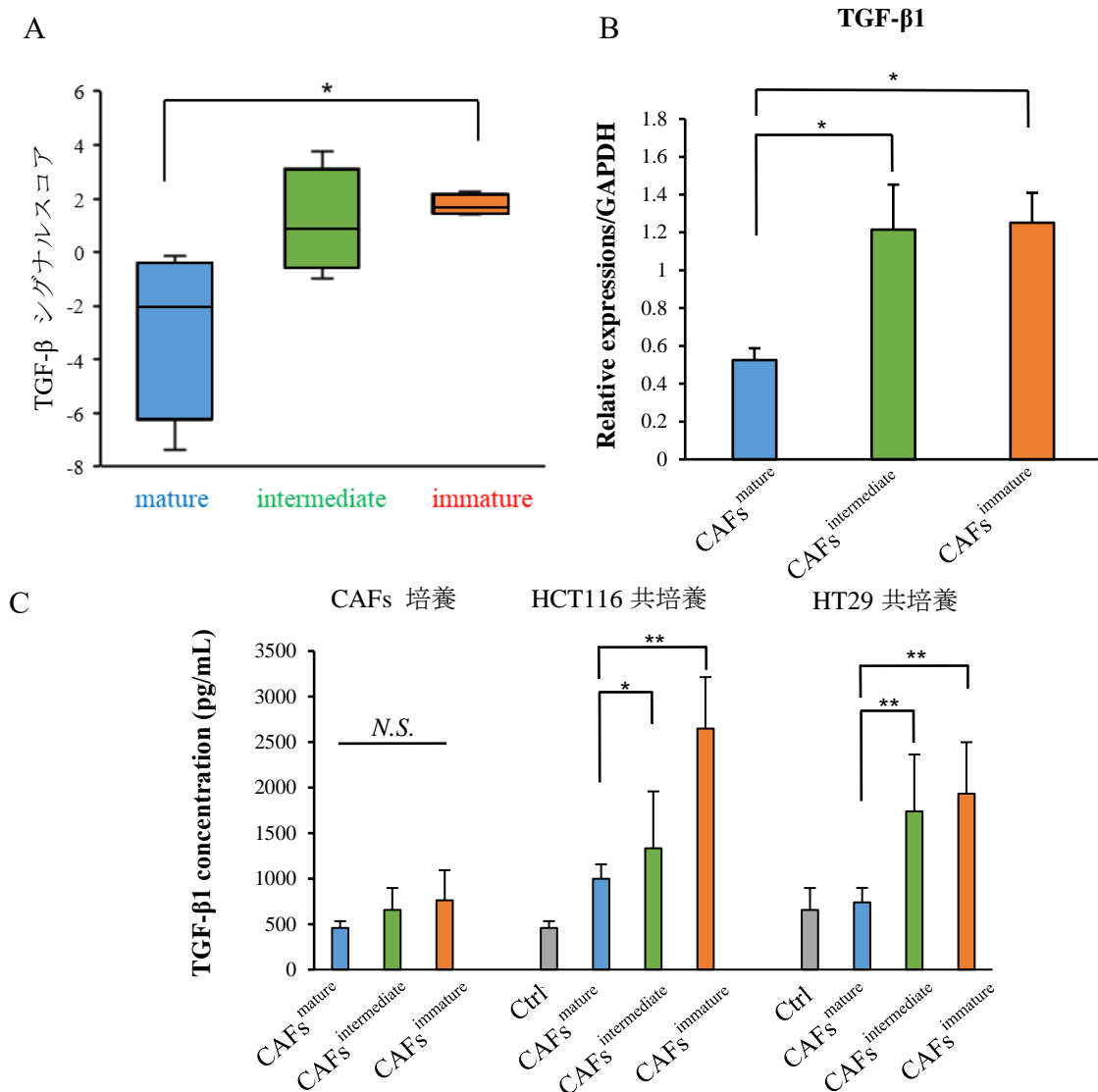


図 14 DR 分類別の CAFs および大腸癌株化細胞における POSTN の発現
 A. POSTN mRNA は CAF_s^{mature} や CAF_s^{intermediate} に比較して CAF_s^{immature} で発現がより高度である (各 5 例)。
 B. 大腸癌株化細胞には POSTN 蛋白質の発現はほぼ認めなかった。
 C. CAF_s^{immature} > CAF_s^{intermediate} > CAF_s^{mature} の順で培養細胞および培養上清中の POSTN 蛋白質が高値を示す (各 5 例)。



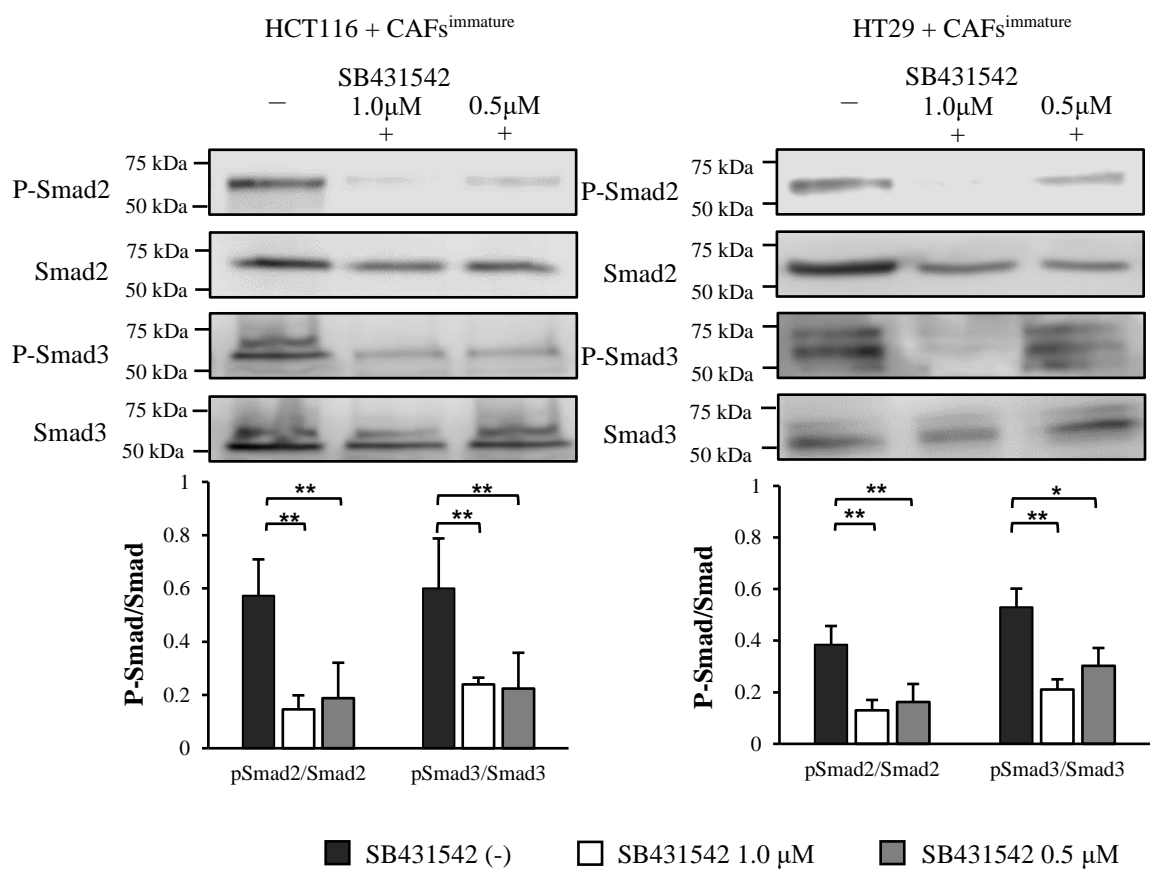
N.S.: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 15 各 DR 分類における TGF-β signaling pathway の評価

A. 癌間質組織の mRNA 発現の網羅的解析における TGF-β signaling pathway 関連遺伝子スコアの評価 (各 4 例)。mature 群と比較して immature 群で TGF-β シグナルスコアは有意に高値である。

B. DR 分類別の各 CAFs における TGF-β1 mRNA 発現 (各 8 例)。CAF_s^{mature} に比較して CAF_s^{intermediate}、CAF_s^{immature} で TGF-β1 が有意に高発現を示す。

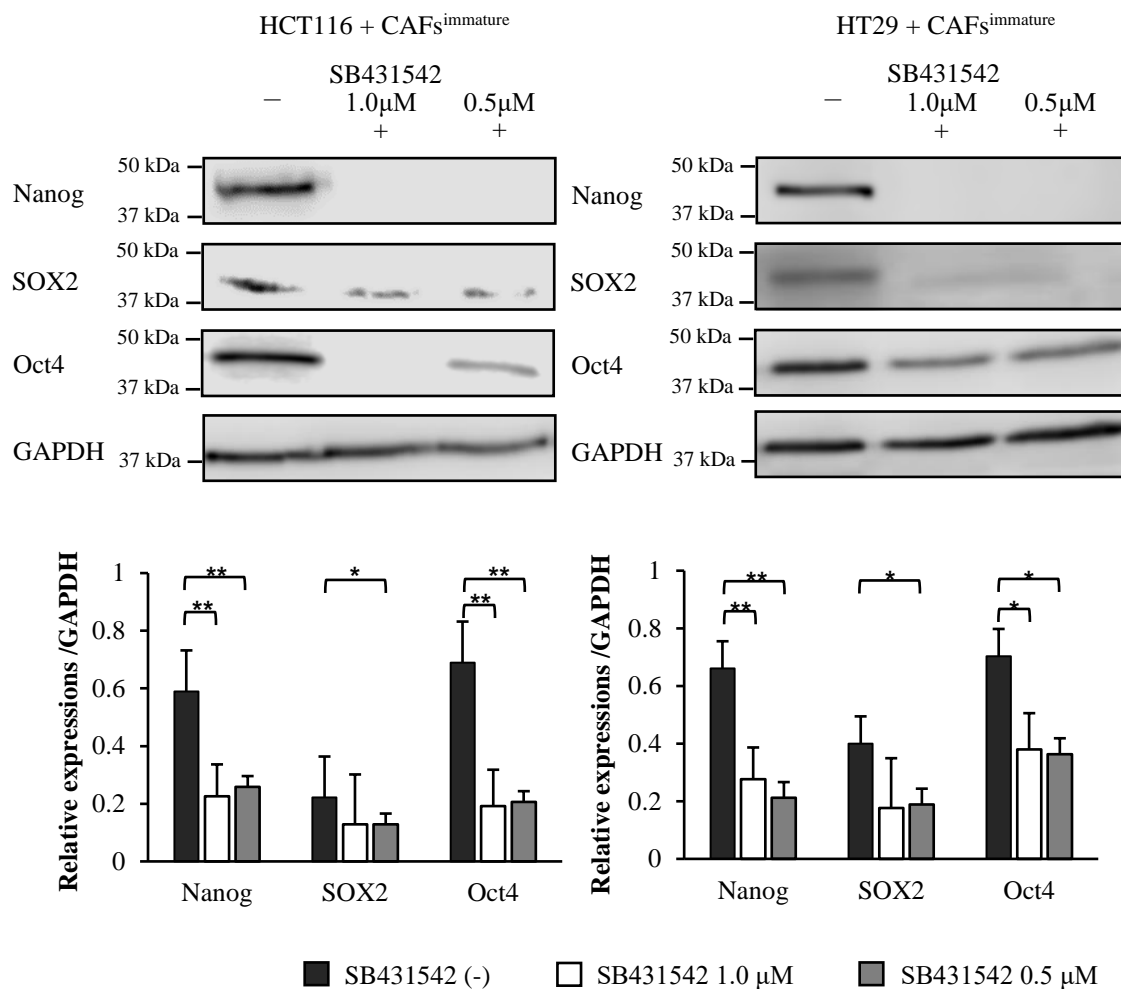
C. DR 分類別の各 CAFs と大腸癌株化細胞との共培養上清中の TGF-β1 蛋白質の濃度 (各 5 例)。各 CAFs または株化細胞単独の培養上清では、濃度差を認めないが、共培養の培養上清では CAF_s^{mature} に比較して CAF_s^{intermediate} および CAF_s^{immature} の共培養群で TGF-β1 の濃度が有意に高値である。



* p < 0.05, ** p < 0.01

図 16 大腸癌株化細胞と CAFs^{immature} の共培養における細胞内 Smad2/3 リン酸化の検討

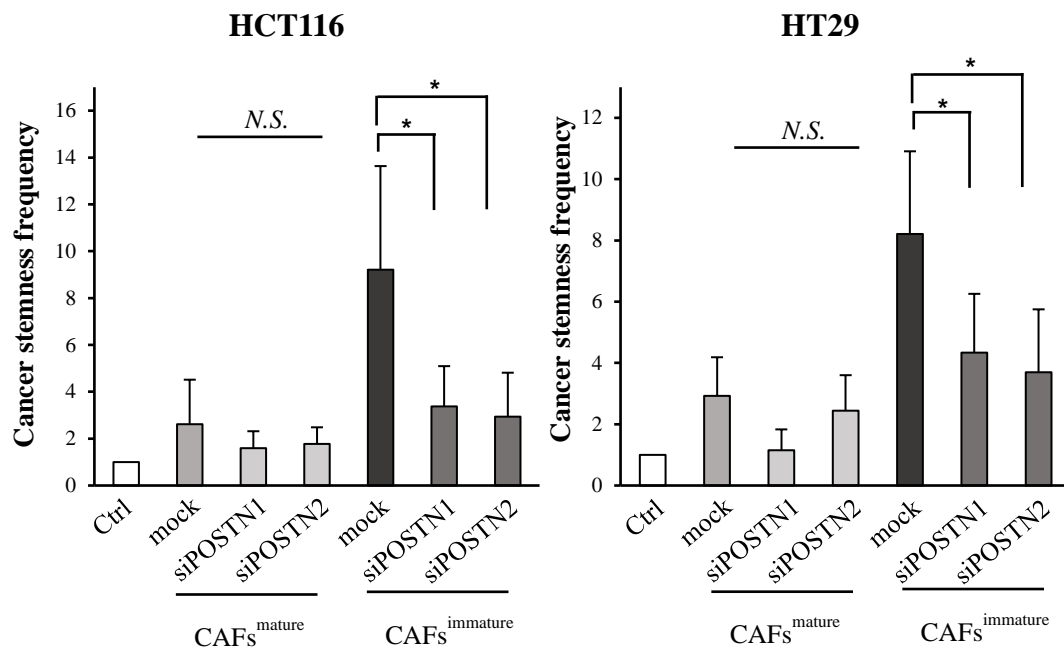
大腸癌株化細胞と CAFs^{immature} との共培養に TGF-β 阻害薬 (SB431542) を添加することで、TGF-β シグナルにおける Smad2/3 リン酸化は有意に抑制される (各 5 例)。



* p < 0.05, ** p < 0.01

図 17 TGF-β シグナルの阻害が大腸癌株化細胞と CAFs^{immature} との共培養におけるがん幹細胞性に与える変化

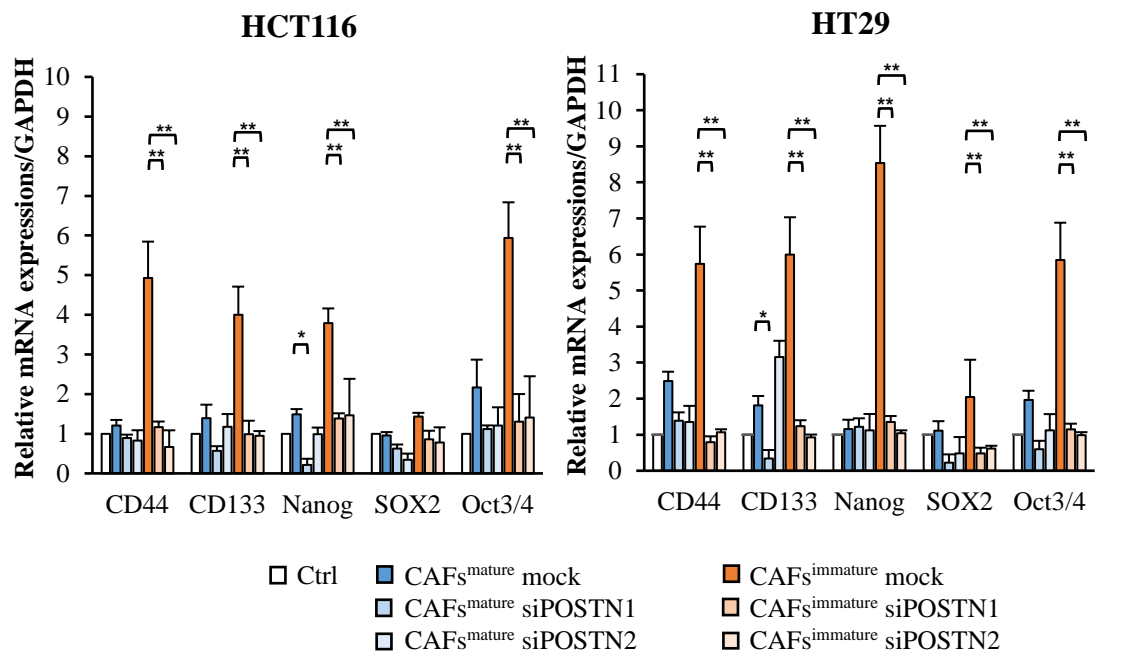
大腸癌株化細胞と CAFs^{immature} との共培養に TGF-β 阻害薬 (SB431542) を添加することで、がん幹細胞関連蛋白質 (Nanog, SOX2, Oct4) の高発現状態が抑制される (各 5 例)。



N.S.: not significant, * $p < 0.05$

図 18 POSTN の発現を抑制した CAFs と大腸癌株化細胞との共培養における Cancer stemness frequency の変化

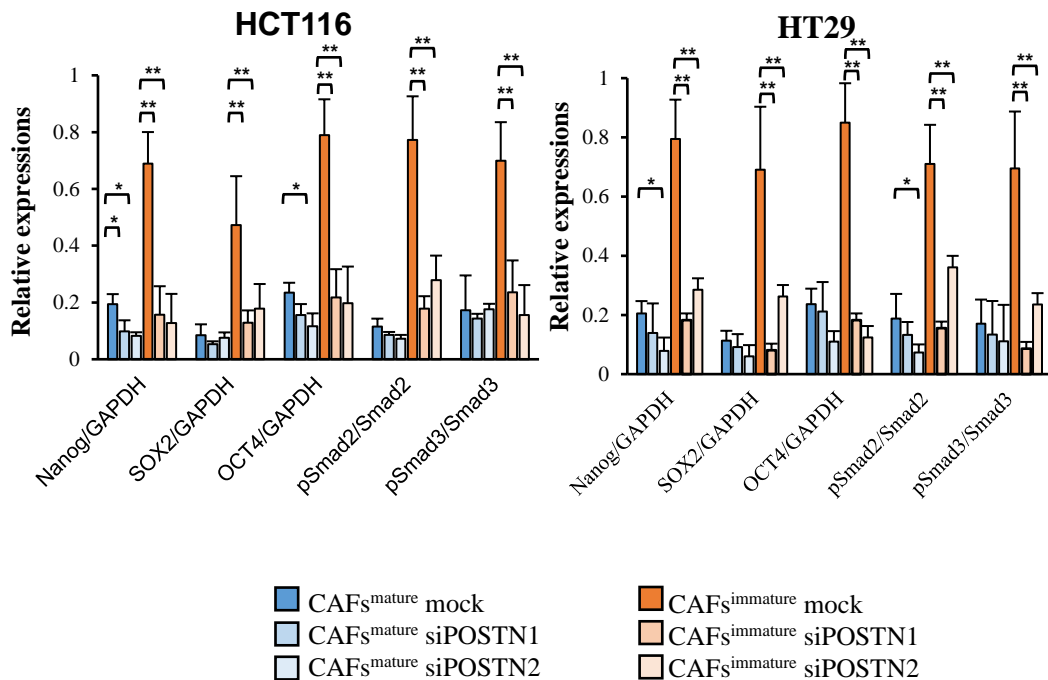
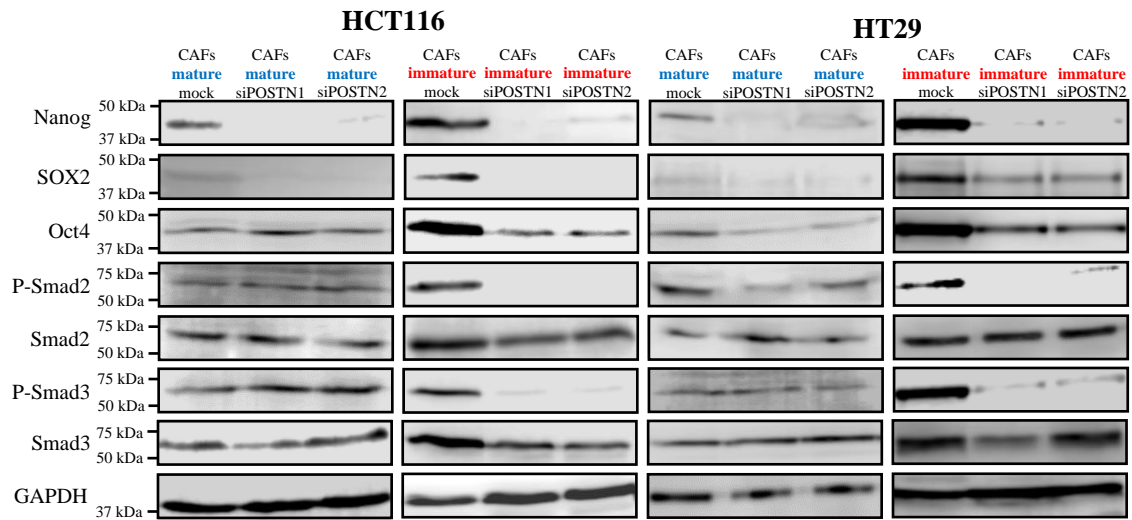
Cancer stemness frequency は、CAF_s^{immature} の共培養では、CAF_s^{immature} mock 群と比較して CAF_s^{immature} siPOSTN 群では Cancer stemness frequency の有意な低下を認める (各 8 例)。



* p < 0.05, ** p < 0.01

図 19 POSTN の発現を抑制した CAFs と大腸癌株化細胞との共培養におけるがん幹細胞関連遺伝子発現の変化

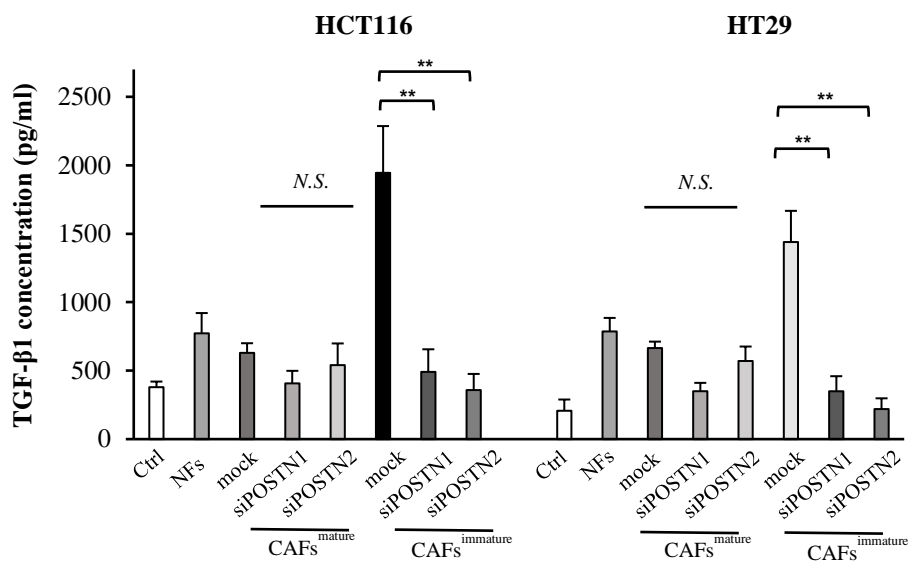
がん幹細胞関連遺伝子 (CD44, CD133, Nanog, SOX2, Oct3/4) の発現 (各 10 例) は、CAF_s^{immature} の共培養において mock 群に比較して siPOSTN 群で有意な遺伝子発現の低下を認める。一方、CAF_s^{mature} の共培養では一部を除き、有意な変化を認めない。



* p < 0.05, ** p < 0.01

図 20 POSTN の発現を抑制した CAFs と大腸癌株化細胞との共培養におけるがん幹細胞関連蛋白質 (Nanog, SOX2, Oct4) の発現および Smad2/3 リン酸化の変化

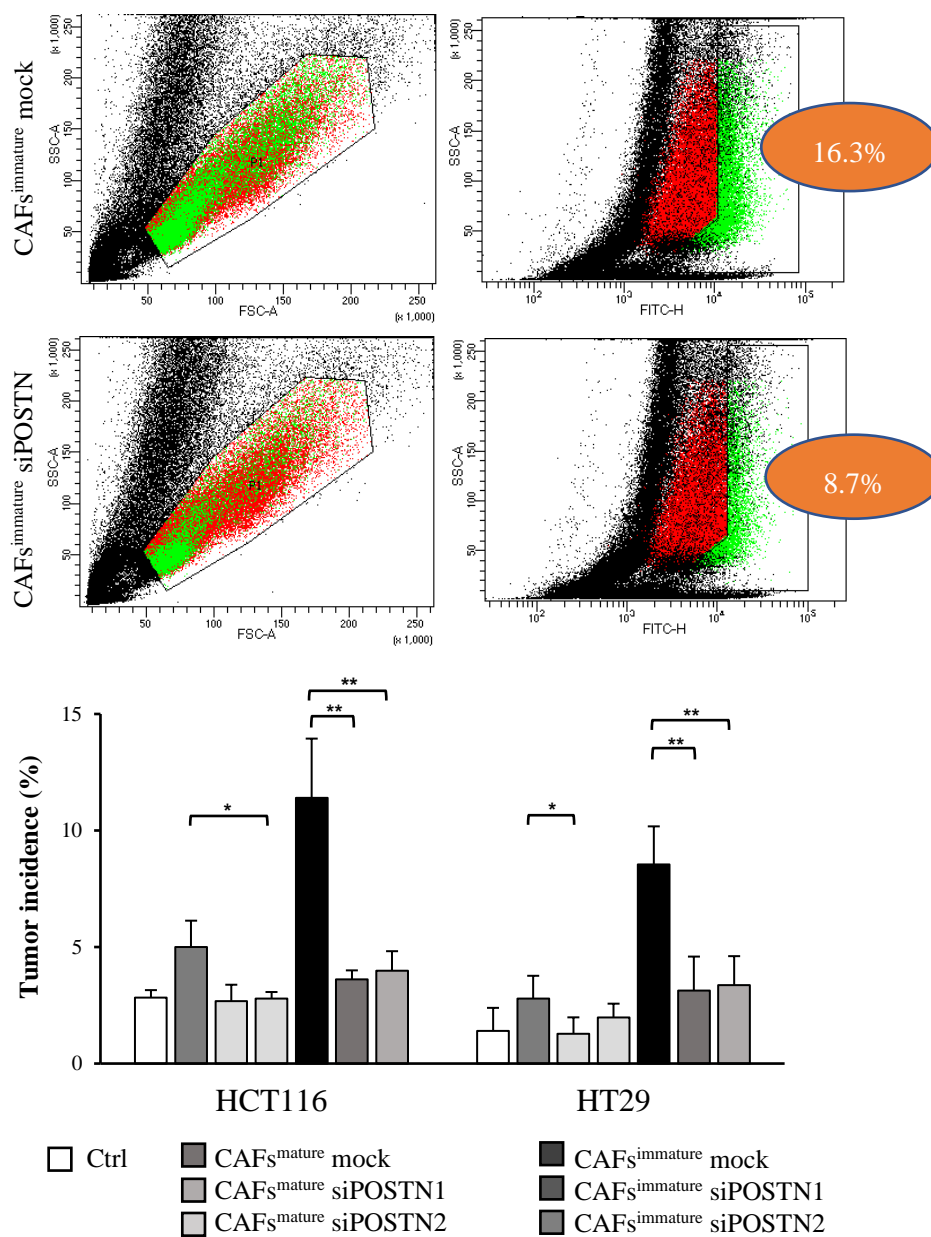
がん幹細胞関連蛋白質の発現 (各 5 例) は、CAF_s^{immature} の共培養では mock 群と比較して siPOSTN 群で有意に減少している。また、細胞内 Smad2/3 リン酸化も siPOSTN 群で有意に抑制される。一方、CAF_s^{mature} の共培養においては、一部を除き、有意な変化を認めなかった。



N.S.: not significant, ** $p < 0.01$

図 21 POSTN の発現を抑制した CAFs と大腸癌株化細胞との共培養における培養上清中の TGF-β1 蛋白質の濃度

培養上清中 TGF-β1 蛋白質の濃度を ELISA で解析したところ (各 5 例)、CAF_s^{immature} の共培養では mock 群に比較して siPOSTN 群で上清中の TGF-β1 濃度が有意な低下を来す。一方、CAF_s^{mature} の共培養においては有意な変化を認めなかった。



* p < 0.05, ** p < 0.01

図 22 POSTN の発現を抑制した CAFs と大腸癌株化細胞との共培養による ALDH 1 活性細胞分画の変化

ALDEFLUOR assay を用いて mock 群と siPOSTN 群の ALDH 1 活性細胞分画の比較を行った (各 5 例)。CAF^s_{immature} の共培養では mock 群に比較して siPOSTN 群で ALDH 1 活性が高い細胞分画が有意に減少している。

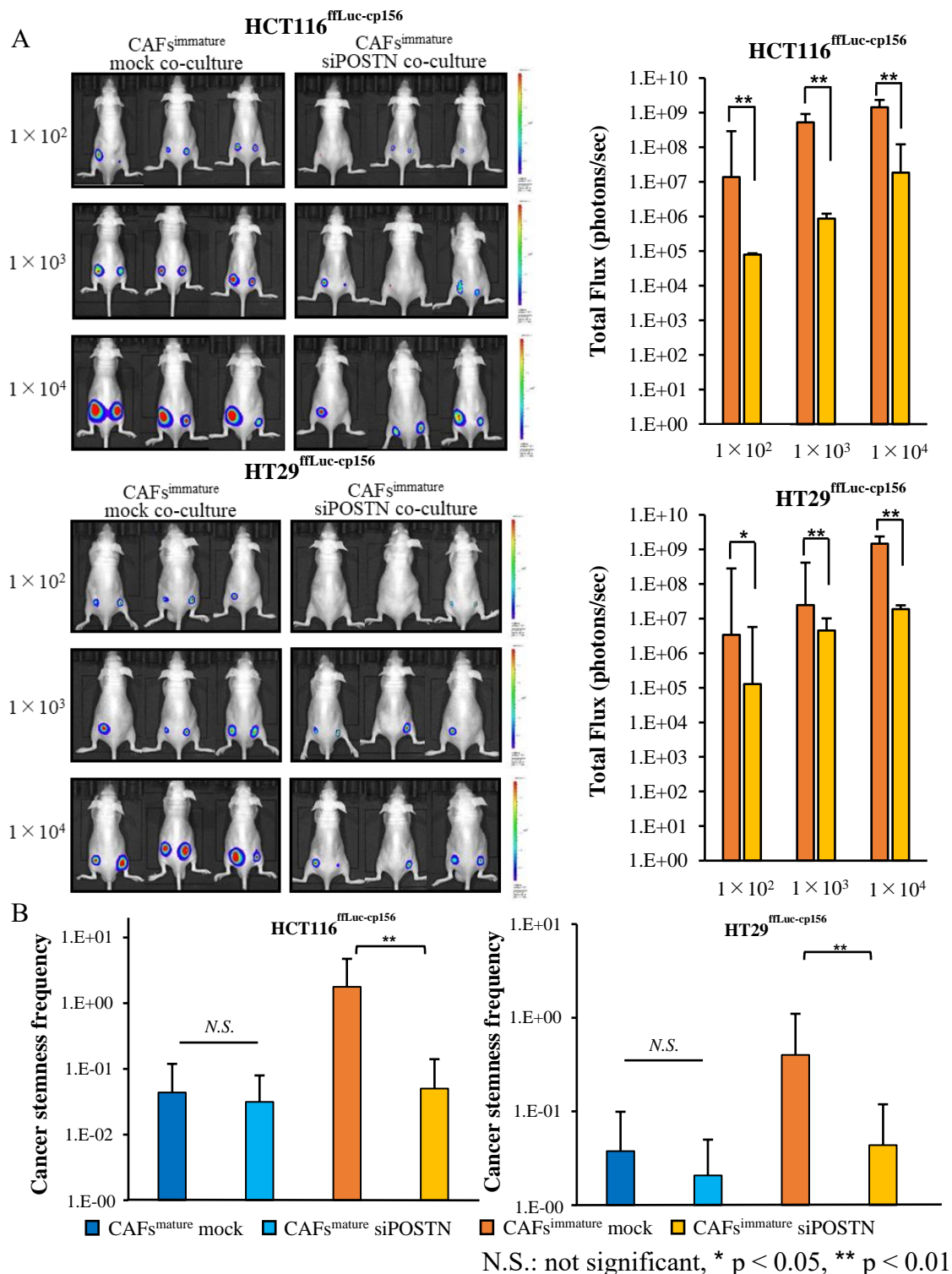


図 23 POSTN の発現を抑制した DR 分類別の CAFs と蛍光発色させた大腸癌株化細胞のマウス皮下混合移植による In vivo tumor formation assay

A. IVIS による生着率 (各 6 例) の評価。

B. Cancer stemness frequency の評価。

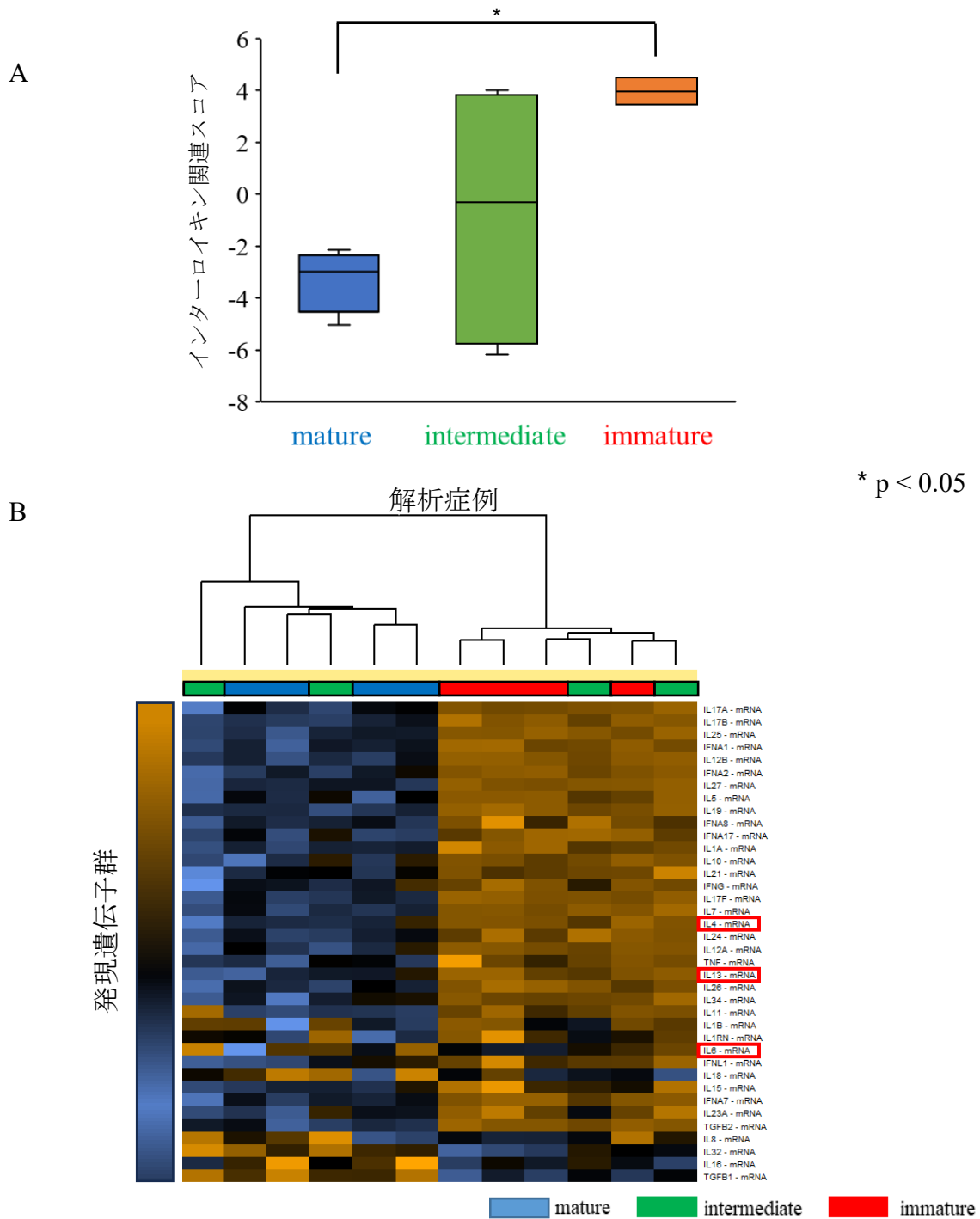


図 24 レーザーマイクロダイセクションを用いて採取した大腸癌間質組織におけるインターロイキンに関連する RNA 発現の網羅的解析

A. DR 分類別の癌間質におけるインターロイキン関連スコアの評価 (各 4 例)

B. インターロイキンに関連する 38 の遺伝子によるヒートマップ。

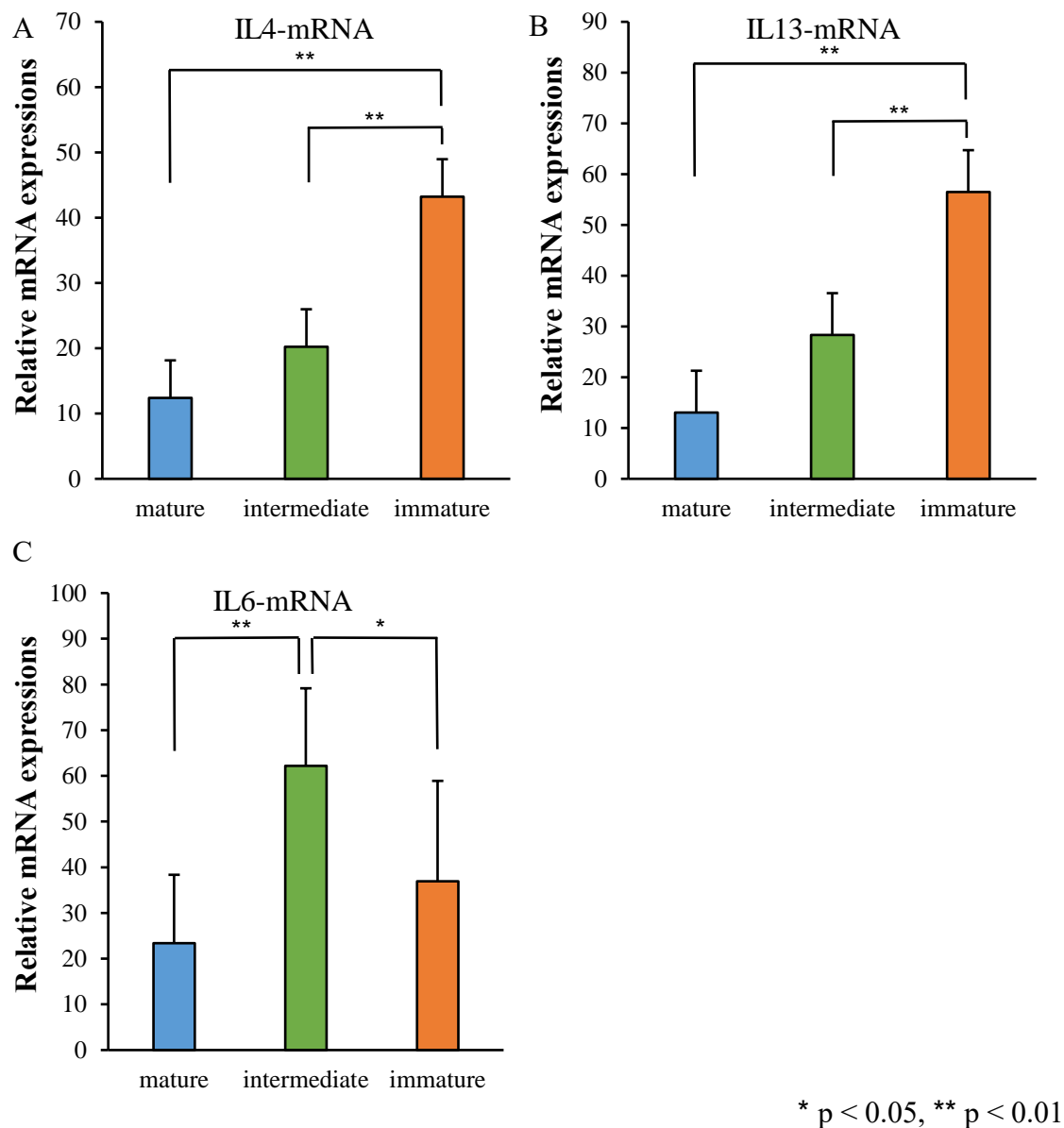
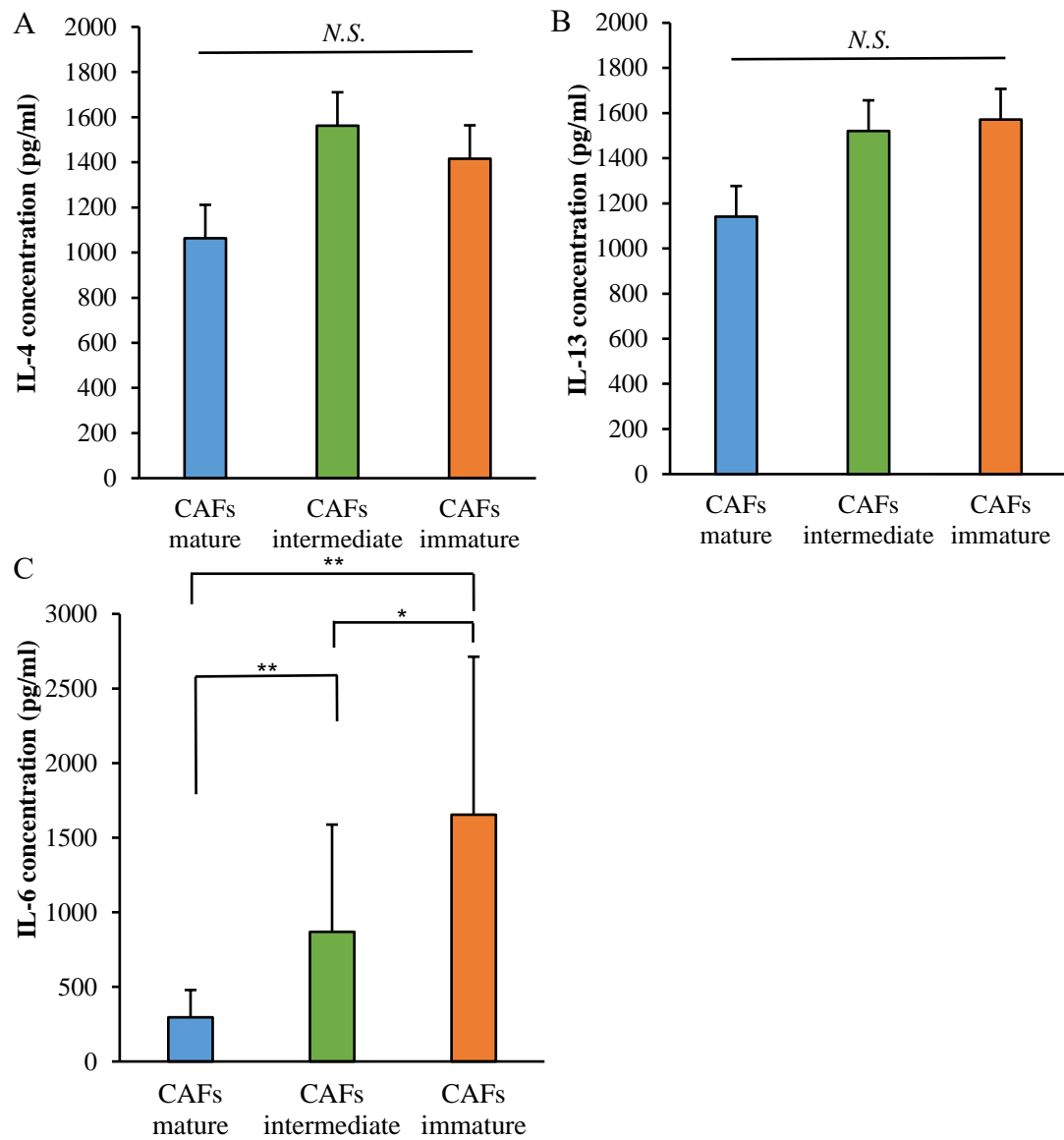


図 25 DR 分類別の癌間質における各インターロイキン mRNA の発現

A. IL-4、B. IL-13、C. IL-6 の発現量を示す。

DR 分類別にレーザーマイクロダイセクションで採取した癌間質（各 4 例）における正常間質との相対値を検討した。IL-4、IL-13 の mRNA の発現は immature な間質で高発現している。一方、IL-6 の mRNA 発現は intermediate な間質で高発現している。

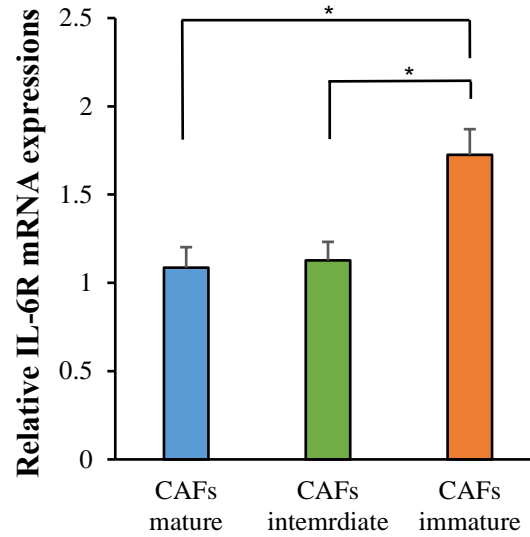


N.S.: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

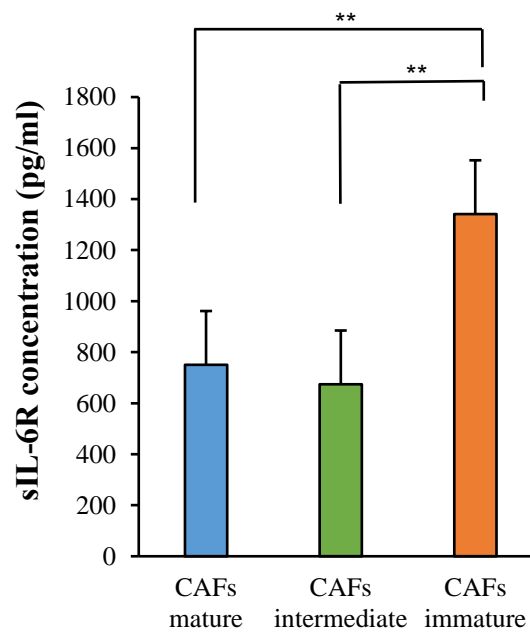
図 26 DR 分類別の各 CAFs の培養上清中における各インターロイキンの濃度

DR 分類別に培養した各 CAFs の上清中 (各 5 例) の IL-4 および IL-13 の濃度には有意な差を認めない。一方、IL-6 濃度は mature 群 < intermediate 群 < immature 群の順で有意に高値を示す。

A



B



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 27 DR 分類別の CAFs における IL-6R mRNA の発現および培養上清中の sIL-6R の濃度

A. DR 分類別の各 CAFs (各 5 例) の検討において、IL-6R mRNA は CAF_s^{immature} で高発現している。

B. DR 分類別に培養した各 CAFs の培養上清 (各 5 例) において sIL-6R の濃度は mature, intermediate 群に比べて immature 群で有意に高値を示す。

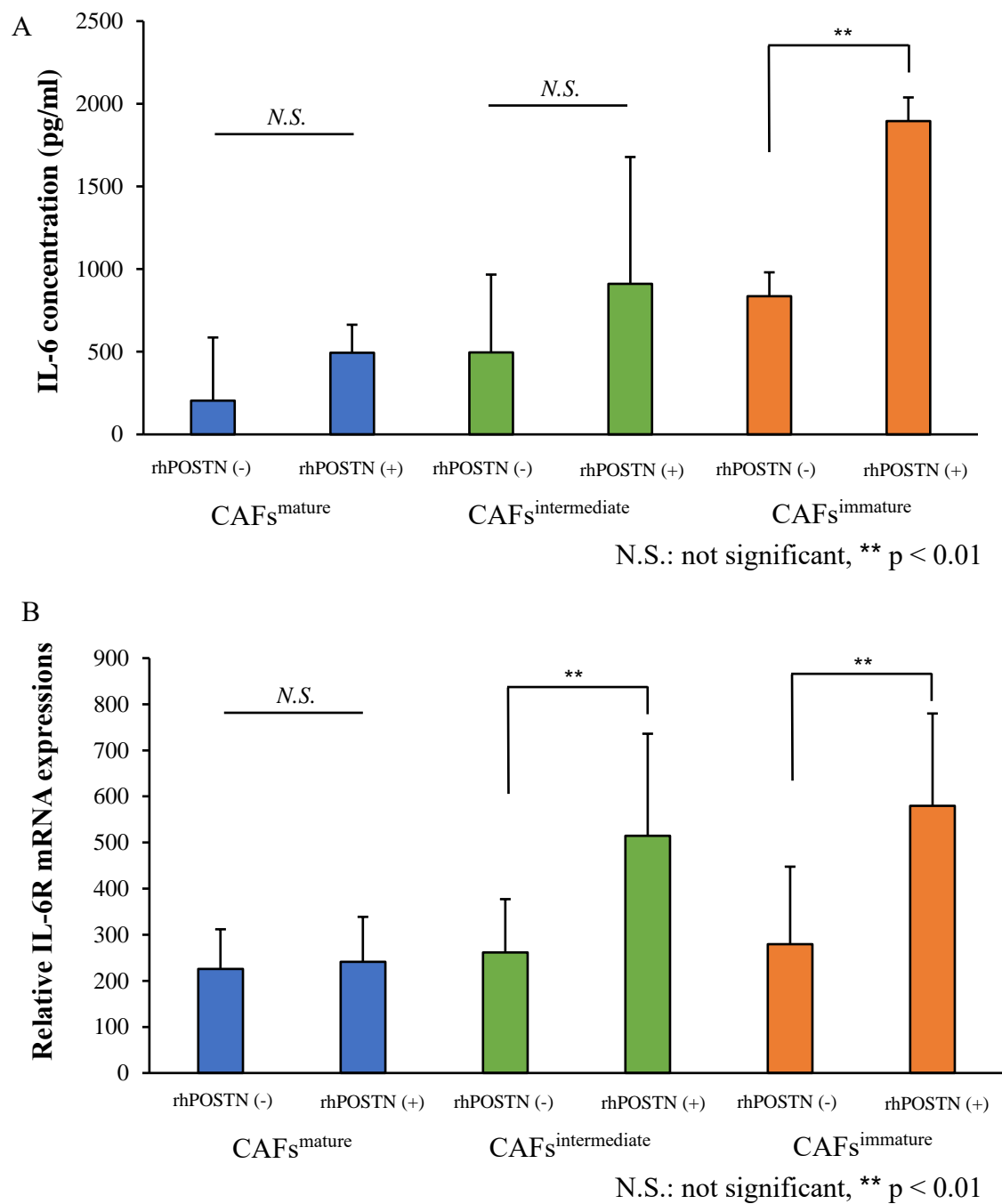
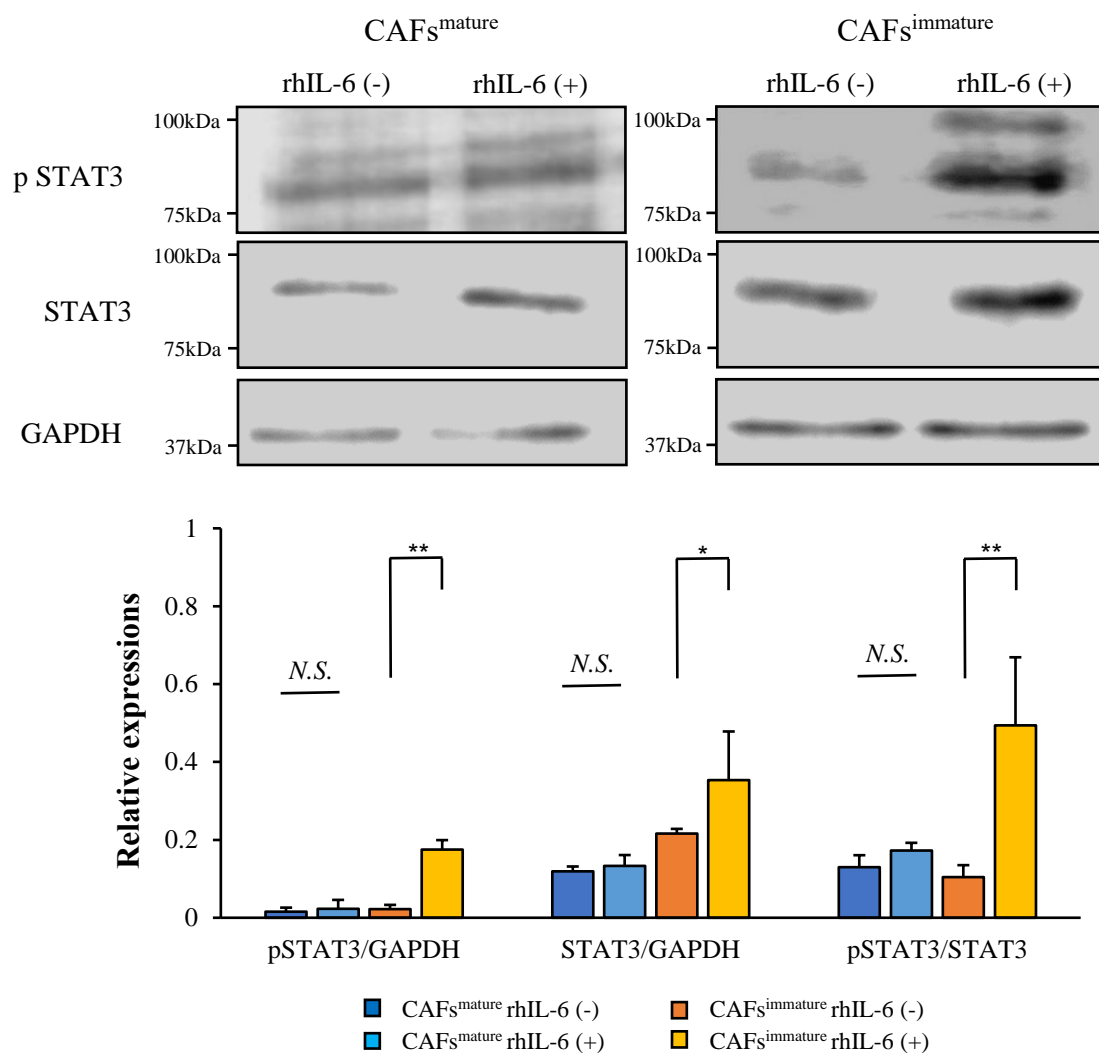


図 28 DR 分類別の各 CAFs における POSTN 刺激が IL-6 分泌および IL-6R 発現に及ぼす影響

A. rhPOSTN 添加により immature 群の CAFs の培養上清中の IL-6 濃度は有意に上昇する (各 5 例)。

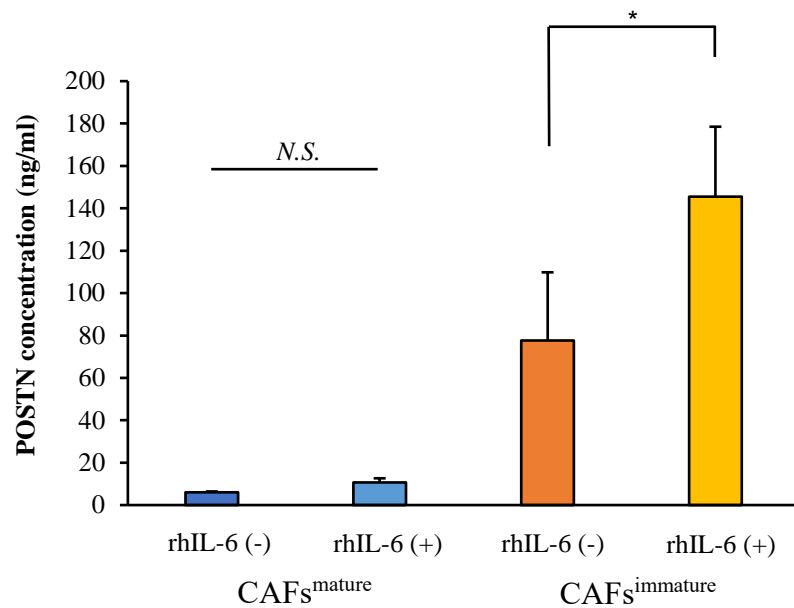
B. rhPOSTN 刺激によって intermediate 群および immature 群の CAFs で IL-6R mRNA の発現が有意に上昇する (各 5 例)。



N.S.: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 29 IL-6 刺激が CAFs^{mature} および CAFs^{immature} の STAT3 活性に及ぼす影響

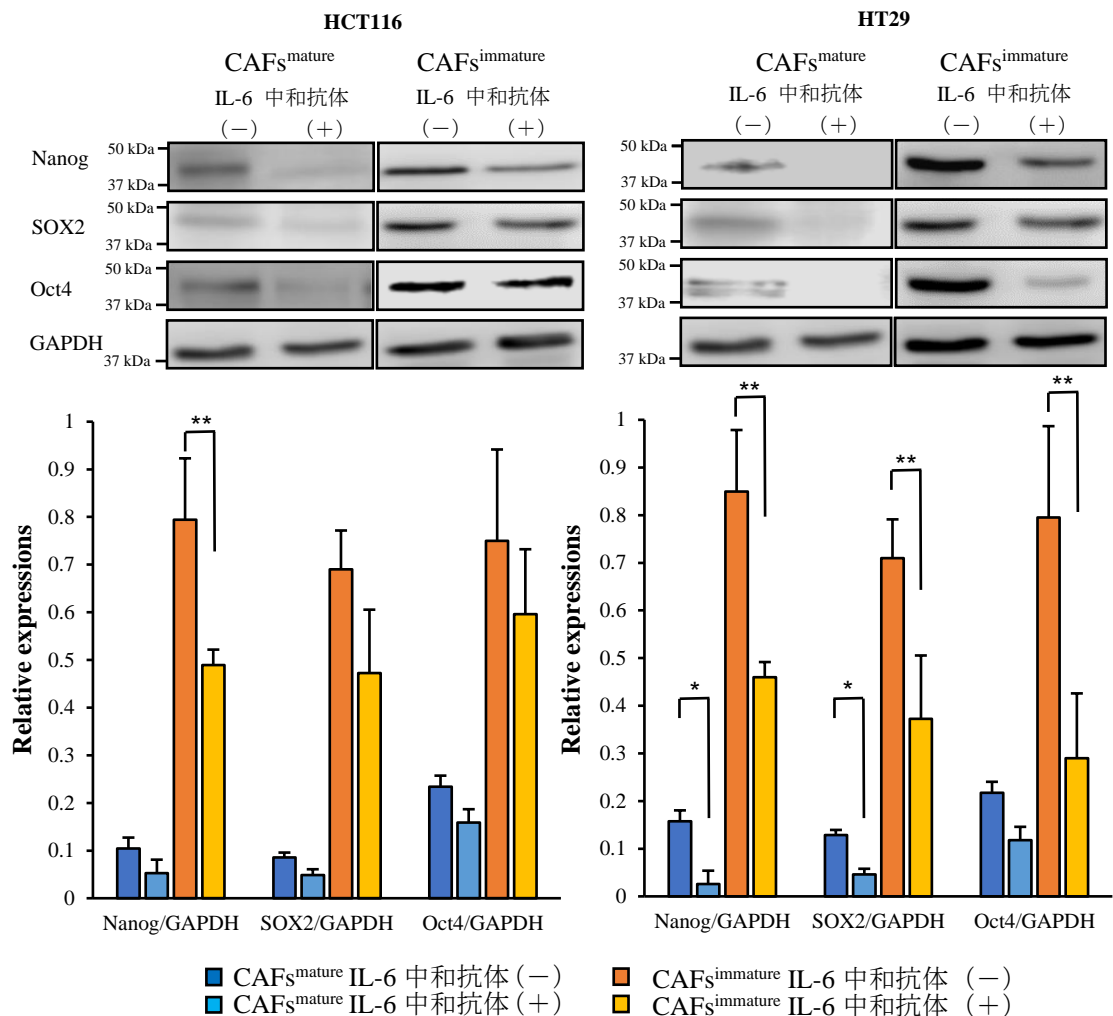
rhIL-6 添加により CAFs^{immature} では IgG を添加した Control に比較して STAT3 のリン酸化が有意に亢進している (各 5 例)。一方で、CAFs^{mature} では rhIL-6 添加による STAT3 シグナルの有意な変化は認められない (各 5 例)。



N.S.: not significant, * $p < 0.05$

図 30 CAF_s^{mature} および CAF_s^{immature} に対する IL-6 刺激による POSTN の分泌の変化

ELISA 法による解析において、rhIL-6 添加による上清中の POSTN の分泌量を比較検討した。CAF_s^{immature} では Control 群に比較して rhIL-6 添加群で POSTN の分泌が有意に亢進している (各 5 例)。一方で、CAF_s^{mature} では rhIL-6 添加による有意な変化は認めない (各 5 例)。



* p < 0.05, ** p < 0.01

図 31 大腸癌株化細胞と DR 分類別の各 CAFs との共培養における IL-6 阻害ががん幹細胞性に及ぼす影響

HCT116 を用いた検討では、CAF_s^{immature} との共培養では IL-6 中和抗体の添加により Nanog の発現が有意に抑制された (各 5 例)。また、HT29 を用いた検討では、CAF_s^{immature} との共培養群において IL-6 中和抗体の添加によって評価したすべてのがん幹細胞性関連蛋白質が有意に抑制された。一方、CAF_s^{mature} との共培養では、HT29 を用いた場合のみ、IL-6 中和抗体の添加により Nanog、SOX2 の発現が抑制された (各 5 例)。

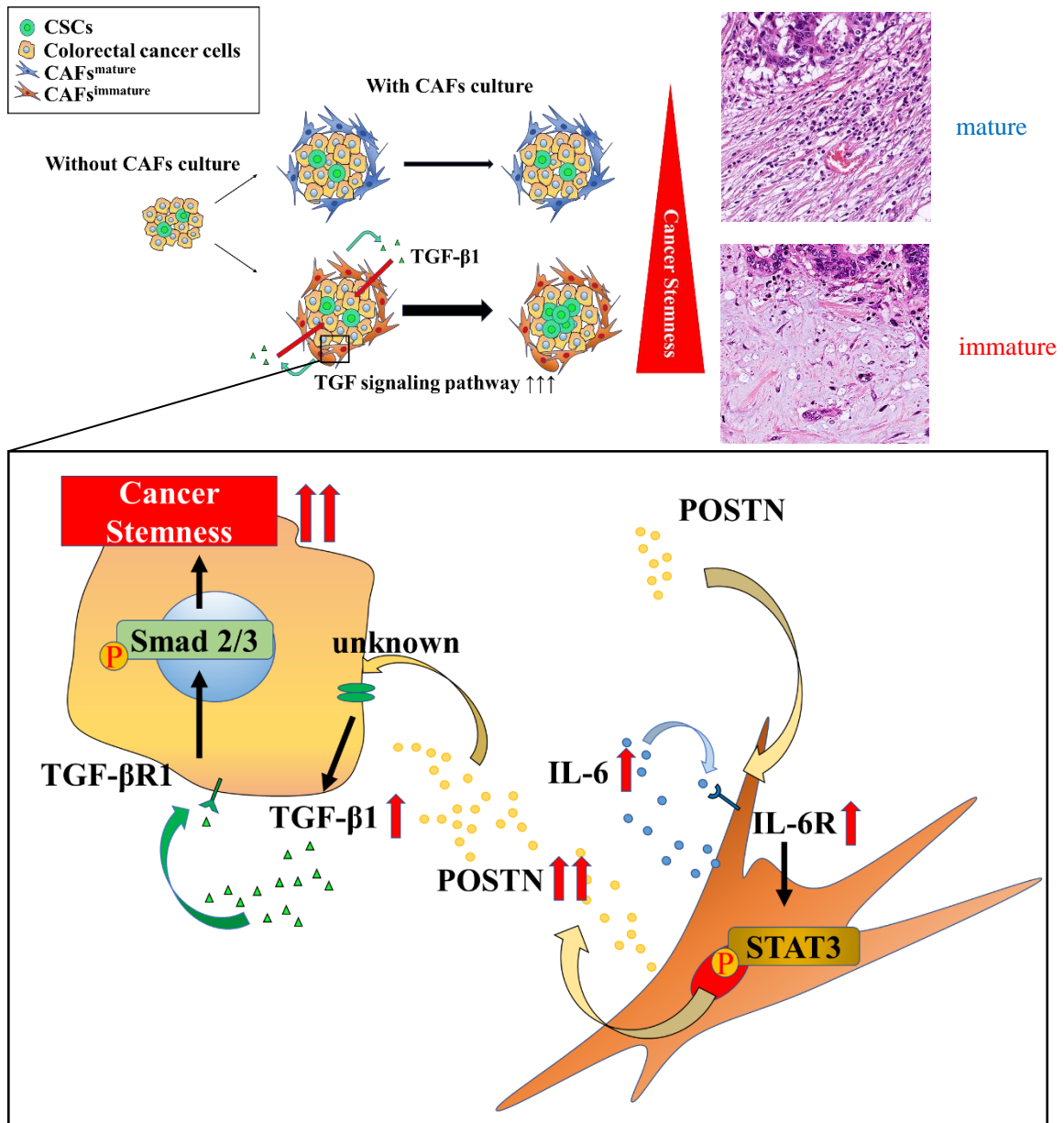


図 32 本研究結果からの仮説

CAF^s_{immature} から分泌された POSTN は大腸癌細胞に結合し、癌細胞の増殖・遊走を促進すると共にがん幹細胞性を亢進させる。

また、CAF^s_{immature} と大腸癌細胞の相互作用により TGF-β1 の分泌が増加し、癌細胞内の Smad2/3 のリン酸化を促進して TGF-β シグナルが活性化することで、がん幹細胞性が亢進していると考えられる。さらに、産生促進された IL-6 が CAFs 上の IL-6R に結合して、STAT3 の活性化を介してさらなる POSTN の産生を促進する positive feedback loop が DR immature 群の間質を有する大腸癌に存在し、これががん幹細胞性をさらに亢進させていると考えられる。

表 1 NanoString nSolver™ 解析ソフトウェアにおいてがん幹細胞性関連スコアの算出に使用した遺伝子群

ALB	FGFR2	PRKCZ
ANPEP	FGFR4	SFRP2
BMP4	GATA4	SLC2A1
BMP7	ID2	SNAI1
BMPR1A	INHBA	SNAI2
BMPR1B	IRF6	SOX17
BMPR2	ISL1	SOX2
CAV1	ITGA7	SOX9
CD34.1	ITGB2.1	SPARC
CD36.1	KDR	SRF
CDH1.1	KRT19	TDGF1
CDH2	MCAM.1	TEK
CEACAM5	MET	TWIST1
CTNNB1	MYC	TWIST2
EPHB4	NODAL	VIM

表 2 NanoString nSolver™ 解析ソフトウェアにおいて TGF-β シグナルスコアの算出に使用した遺伝子群

ACVR1C	BMPR1A	FST	INHBE	RBL1	RPS6KB2	SP1
ACVR1	BMPR1B	GDF5	LEFTY1	RBL2	SMAD1	TFDP1
ACVRL1	BMPR2	GDF6	MYC	RBX1	SMAD4	TGFBR2
AMH	COMP	ID1	NODAL	RHOA	SMAD5	THBS2
BMP4	CREBBP.1	ID2	PITX2	ROCK1	SMAD9	THBS4
BMP5	CUL1	ID4	PPP2CB	ROCK2	SMURF1	ZFYVE16
BMP7	DCN	INHBA	PPP2R1A	RPS6KB1	SMURF2	ZFYVE9

表 3 NanoString nSolver™ 解析ソフトウェアにおいてインターロイキン関連ス
コアの算出に使用した遺伝子群

IFNA17	IL1A
IFNA1	IL1B
IFNA2	IL1RN
IFNA7	IL21
IFNA8	IL23A
IFNG	IL24
IFNL1	IL25
IL10	IL26
IL11	IL27
IL12A	IL32
IL12B	IL34
IL13	IL4
IL15	IL5
IL16	IL6
IL17A	IL7
IL17B	IL8
IL17F	TGFB1
IL18	TGFB2
IL19	TNF