

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791272

研究課題名（和文） 大腸癌の増殖を支持する癌付随線維芽細胞における FOXF2 遺伝子の役割

研究課題名（英文） Role of the FOXF2 gene in the cancer activated fibroblasts that support proliferation of colon cancer cells

研究代表者

Sultana Nishat (Sultana Nishat)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：80529503

研究成果の概要（和文）： 大腸癌細胞を、野生型マウスやFoxf2ノックアウトマウスの腸管線維芽細胞と混合移植すると移植率と腫瘍サイズが増大した。DNAマイクロアレイ解析の結果、Foxf2 KOマウスIEFと共移植した間質RNAの発現に比し、正常マウスIEFと共移植した間質RNAの発現が大きなもの23個あった。それらのうち、まずWnt5aに注目し、証明実験を行い、線維芽細胞の癌細胞増殖支持作用の1つはWnt5aを介して行われていること示した。

研究成果の概要（英文）： When colon cancer cells HT29 were transplanted with intestinal embryonic fibroblasts (IEFs) from the Foxf2^{-/-} and wild-type mice, the efficiency and tumor size were highest in cotransplantation with the wild-type IEFs, higher in that with the Foxf2^{-/-} IEFs compared to that without fibroblasts. I isolated RNAs from IEFs from the Foxf2^{-/-} and wild-type mice and applied to DNA microarray analysis. I found 23 genes were significantly higher in the wild-type compared to the Foxf2^{-/-} mice. I chose one gene named Wnt5a and demonstrated that the Wnt5a-expressing fibroblasts increased the efficiency and tumor size of HT29 cell transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：癌付随線維芽細胞、大腸癌、Foxf2 遺伝子、増殖、腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は癌細胞だけの集団ではなく、まわ

りに多数の非癌細胞や細胞外基質といった間質にとり囲まれている。間質内にある細胞と

しては、線維芽細胞、筋線維芽細胞、白血球、内皮細胞や骨髄由来細胞がある。これら全体が協調的に働き、複雑な「腫瘍微小環境」を形成している。

当時の研究により、発癌は近傍に存在する腫瘍微小環境からのシグナルの組み合わせに依存していることが示唆されている。間質はいろいろな様式で癌細胞の生存や浸潤を支えている。正常組織では、間質はバリアーとして腫瘍細胞の拡大を抑制する働きをする。しかしながら、癌が進行すると、間質は癌細胞や他の細胞からのシグナルに反応して、むしろ癌細胞の成長を助けるように変わってしまう。つまり、間質は正常組織や良性腫瘍には抑制的に、悪性腫瘍（癌）には促進的に作用することになる。

腫瘍の発生や悪性腫瘍への進展には持続的な癌細胞と間質細胞の協調的な相互支援が必要である。腫瘍内では、組織の正常構造は破壊され、間質内の筋線維芽細胞などの間葉系細胞により細胞外基質は変化させられてしまう。このように、腫瘍の周囲にあって癌細胞を支援する間質のことを腫瘍付随間質あるいは癌付随線維芽細胞という。

2. 研究の目的

Foxf2 遺伝子が癌付随線維芽細胞で働いている基礎データに基づき、Foxf2 遺伝子の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

野生型マウス（胎生期 18.5 日）と Foxf2^{-/-}マウス（胎生期 18.5 日）の腸管膜から線維芽細胞を集め、RNA を抽出し、DNA マイクロアレイにて全遺伝子の発現パターンを解析する。また、できて来た腫瘍周囲の間質からも RNA を抽出し DNA マイクロアレイで全遺伝子の発現パターンを解析する。

4. 研究成果

予備実験の結果、大腸癌 HT29 細胞をヌードマウスに移植する際、正常マウス胎仔腸管間質線維芽細胞 (Intestinal embryonic fibroblast; IEF) と共に移植すると、Foxf2 K0 マウス胎仔 IEF と共に移植した場合より、顕著な癌細胞増殖支持作用があることが明らかになった。

平成22年度は、Shhを分泌していることが知られている癌細胞を用いて癌移植の実験を行

なった。大腸癌細胞 HT29 単独、HT29 癌細胞と胎生 18.5 日の Foxf2^{-/-}マウス胎仔の腸線維芽細胞 (intestinal embryonic fibroblast, IEF) を混合したもの、HT29 癌細胞と胎生 18.5 日の野生型マウス胎仔の IEF を混合したものをヌードマウス皮下に移植した。10 週後の腫瘍サイズは、癌細胞単独移植に比し、Foxf2^{-/-}IEF を混合移植した場合 1.4 倍、野生型 IEF を混合移植した場合 3.0 倍であった。また、前立腺癌細胞 LNCaP を用いて同様な移植をヌードマウス皮下に行なった場合、癌細胞単独では腫瘍は形成されず、Foxf2^{-/-}IEF を混合移植した場合は 8 匹中 2 匹に平均 22mm² の腫瘍が形成され、野生型 IEF を混合移植した場合は 8 匹中 8 匹に平均 346mm² の腫瘍が形成された。つまり、癌付随線維芽細胞の機能の一つは Foxf2 遺伝子により担われていると解釈できる。

Foxf2^{-/-}マウスの IEF を用いた場合と、野生型マウスの IEF を用いた場合の腫瘍の病理像を比較した。後者では、腫瘍細胞は大きな細胞塊を形成し、中心部まで腫瘍細胞が認められた。一方、前者では、腫瘍細胞は小さい細胞塊を形成するが、中心部に壊死が認められた。そこで、血管内皮細胞を染色する VECAM 抗体で腫瘍部を染色してみると、後者では多くの血管が認められたが、前者では血管の形成が悪いことが判明した。

平成23年度は、その増殖支持作用に関わる分子の同定を試みた。まず、移植された部位を切除し、コラーゲナーゼ処理をして、浮遊細胞にし、サイズの大きい上皮細胞を除いた。残りの間質と想定される細胞から RNA を抽出した。同様な操作を、Foxf2 K0 マウス胎仔 IEF と共に HT29 細胞を移植した部位にも施し、間質細胞からの RNA を得た。この 2 つの RNA を DNA マイクロアレイにかけて、Foxf2 K0 マウス IEF と共移植した間質 RNA の発現に比し、正常マウス IEF と共移植した間質 RNA の発現が大きなものが 23 個あった。それらのうち、消化管上皮細胞の増殖に関わっている Wnt5a に注目した。まず、定量的 RT-PCR 法で、正常マウス由来の共移植組織間質からの RNA と Foxf2 K0 マウスからのそれを比較した。前者が後者の 20.9 倍であることが判明した。そこで、Wnt5a 発現ベクターをマウス NIH/3T3 細胞に遺伝子導入し、Wnt5a を過剰発現している細胞株を 3 種類得た。

HT29 細胞単独、HT29 細胞プラス正常マウス

IEF、そしてHT29細胞プラスWnt5a過剰細胞をヌードマウスに移植して10週後の腫瘍サイズを計測した、野生型IEFを混合移植した場合は単独移植の3.0倍であり、Wnt5a細胞混合移植の場合は単独移植の8.9倍であった。この結果は、IEF間質細胞の癌細胞増殖支持作用の1つはWnt5aを介して行われていることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Wang B, Hikosaka K, Sultana N, Sharkar MTK, Noritake H, Kimura W, Wu Y-X, Kobayashi Y, Uezato T, Miura N: Liver tumor formation by a mutant retinoblastoma protein in the transgenic mice is caused by an up-regulation of c-Myc target genes. **Biochem Biophys Res Commun** 査読あり、417: 601-606, (2012).

2. Hikosaka K, Noritake H, Kimura W, Sultana N, Sharkar MTK, Tagawa Y, Uezato T, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N: Expression of human factors CD81, claudin-1, scavenger receptor, and occludin in mouse hepatocytes does not confer susceptibility to HCV entry. **Biomed Res** 査読あり、32: 143-150, (2011).

3. Kimura W, Machii M, Xue X-D, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MTK, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, Miura N: Irx11 mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development. **Genesis** 査読あり、49: 2-9 (2011).

[学会発表] (計6件)

1. Sharkar M他: Is11-specific knockout of Sonic hedgehog results in craniofacial and cardiac defects. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日、横浜

2. Sultana N他: Irx3 determines expression of fast and slow connexins in the ventricular conduction system of the mouse heart. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日、横浜

3. 木村航他: Irx3遺伝子はマウス心臓心室刺激伝導系のコネクシンの発現を調節する。第10回心臓血管発生研究会 2011年10月7-8日、郡山

4. Kimura W et al.: Generation of the Tbx1-AmCyan transgenic mice and its application. Keystone Symposia on "Mechanism of cardiac Growth, Death and Regeneration", February 2011, Keystone CO.

5. Kimura W et al.: Irx11 is required for tendon differentiation during mouse musculoskeletal system development. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biology, March 23-26 2011, Dresden Germany

6. 木村航他: Creation of a Tbx1-AmCyan1 transgenic mice and its application to characterize the Tbx1-expressing cells、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/bio2/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Sultana Nishat (Sultana Nishat)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：80529503

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：