

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16203

研究課題名(和文) 治療に向けた胃癌 iCAFs の証明と進行癌の普遍的現象としての幹細胞性誘導の可能性

研究課題名(英文) iCAFs in gastric cancer and their commitment to progression via stemness induction

研究代表者

沼倉 里枝 (Numakura, Satoe)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：20805387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、私は、胃癌間質の線維芽細胞から樹立された細胞株(YS-1)が inflammatory CAFs (iCAFs) のモデル細胞株であることを発見した。YS-1は、胃線維芽細胞株(HGF)よりも、IL-6、LIFの発現が高く、ACTA2(αSMA)の発現は低かった。mRNA-seq解析では、iCAFsと関連のあるシグナル伝達経路がYS-1で亢進していた。この結果は、胃癌にもiCAFsが存在することの傍証ともなる。加えて、YS-1培養上清は、胃低分化腺癌細胞株(NUGC3)や骨髄由来間葉系幹細胞(UBE6T-15)の幹細胞性や分化を変化させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までにiCAFsの細胞株は知られていない。iCAFs研究の多くは、患者やマウス由来のシングルセル解析によるものである。公開データを使わない限り、研究者にとって実験のハードルは高い。この方法単独では、細胞間相互作用の詳細を明らかにするには限界がある。本研究におけるiCAFsの細胞株の発見は、iCAFsの研究を大きく変えるものとなる。YS-1はDish培養でもiCAFsの性質を保持していることから、安定したiCAFsの細胞株として使用できる可能性がある。YS-1に関する知見は、胃癌iCAFsの間接的な存在証明となり、胃癌でもiCAFsをターゲットとした治療の可能性を検討する機会を提供する。

研究成果の概要(英文)：YS-1, derived from gastric cancer stromal fibroblasts, was found to be a cell line of inflammatory cancer associated fibroblasts (iCAFs). Higher expression of IL-6 and LIF and lower expression of ACTA2 (alpha SMA) was observed in YS-1 compared to HGF. In mRNA-seq, iCAFs-associated genes or signaling pathways were enriched in upregulated differentially expressed genes in YS-1. YS-1 conditioned media affected on stemness and differentiation of gastric cancer cells (NUGC3) and bone marrow-derived mesenchymal stem cells (UBE6T-15).

研究分野：病理学

キーワード：iCAFs 胃癌 幹細胞性 細胞の分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Cancer associated fibroblasts (CAFs)は癌の進行に重要とされ、治療ターゲットとして期待されている。しかし、CAFs は一様な細胞集団ではなく、その中から癌の進行に最も影響力のある性質を見つける必要に迫られている。そんな中、膵臓で、星細胞と膵腺癌細胞との3次元共培養により、炎症性サイトカインの産生に特化した CAFs の一群が発見され(引用文献 )、inflammatory CAFs (iCAFs)と名付けられた。その後、シングルセル解析により、膵癌組織に iCAFs が存在することが証明された。胃癌にも iCAFs が存在するかどうかはわかっていない。iCAFs の特徴として IL-6 と LIF の産生が高いことが挙げられる。IL-6 と LIF は炎症性サイトカインであると同時に、幹細胞性に影響を与える因子であることから、胃癌に iCAFs が存在するのであれば、癌細胞に対して幹細胞性を誘導しているのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌でも iCAFs が存在することを示すとともに、iCAFs が幹細胞性誘導を通して胃癌の進行機序に関与する可能性について検討することにある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養上清中の IL-6 蛋白濃度の測定

胃でも既報告(引用文献 )と同じ結果が得られるか調べるため、2種類のヒト胃線維芽細胞株(HGF, YS-1[JCRB細胞バンクより分譲を受けた])とヒト胃腺癌細胞株(MKN-7)を対象とした。マトリゲル内で、MKN-7 単独培養、YS-1 単独培養、HGF 単独培養、YS-1 + MKN-7 共培養、HGF + MKN-7 共培養の各々の組み合わせで4日間培養した(培地のみをコントロールとした)。各培養上清を0.22µmのフィルターを通して-80 で保存した。解凍した培養上清中の IL-6 蛋白濃度を ELISA で測定した。

#### (2) 培養細胞の HE 染色および免疫組織化学標本の作製

三次元培養した時の位置関係を調べるため、YS-1 と MKN-7 の組み合わせでアルギニン酸三次元培養を行った。10%緩衝ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋して HE 染色を行った。

24 ウェルカルチャープレートを用いて、YS-1 をマトリゲル上(Thin Gel 法)、あるいは、そのまま(細胞外基質なし)で培養した。その後、マトリゲル上で培養したものに対しては、セルリカバリーソリューションにてマトリゲルを溶解し回収した細胞を iPGelII で固めた。細胞外基質なしで培養した細胞については、Trypsin/EDTA 処理にて回収した細胞を iPGelII で固めた。iPGelII でゲル化した細胞は10%緩衝ホルマリンで固定、パラフィン包埋し、HE 染色および免疫組織化学(IL-6, α-SMA)を行った。

#### (3) Real-time PCR での mRNA 発現比較

Dish 培養した YS-1, HGF, UBE6T-15(骨髄由来間葉系幹細胞株), NUGC3(胃癌細胞株)の total RNA を抽出し、cDNA を作製した。各種プライマー(IL-6, ACTA2, LIF, CD44s, CD44v6, CD44v9, NANOG, KLF4, ENG)を用いて real-time PCR を行った。比較は Ct 法で行い、内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

#### (4) mRNA-seq 解析

凍結保存した YS-1, HGF, UBE6T-15 をサンプルとして DNA チップ研究所に提出し、mRNA-seq データを得た。mRNA-seq データに対して、iDEP1.1(\*)を用いて発現変動解析、パスウェイ解析(HALLMARK gene sets (MsigDB). Pathway significance cutoff (FDR):0.25%, p 値<0.05)を行った。尚、発現変動遺伝子は FDR<0.01, |log2 FC| ≥ 1 とした。

(\*)<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-018-2486-6>

#### (5) トランスウェルを用いたマトリゲル上での細胞培養

24 ウェルカルチャープレートにトランスウェルを設置した。トランスウェルにマトリゲル希釈液を入れてゲル化した。その上に、Trypsin/EDTA 処理にて回収した NUGC3 を無血清培地に懸濁して撒いた。ボトムウェル(プレートのウェル)に血清入り培地(YS-1 専用培地、あるいは、YS-1 培養上清)を入れて培養した。顕微鏡下で画像を撮影した。その後、3.7%ホルムアルデヒド、100%メタノールで固定し、ギムザ染色を行った。染色後のトランスウェルを逆さにして乾燥させ、カッターでメンブレンを切り抜いてスライドガラスにのせて封入し、顕微鏡下で写真を撮影した。

#### (6) 浸潤アッセイ

YS-1 培養上清の有無が NUGC3 の浸潤能に影響を与えるかを調べるため、CytoSelect 24-well cell invasion assay kit (Basement Membrane, Colorimetric Format)を用いて、浸潤アッセイを行った。OD 560nmでの吸光度をプレートリーダーで測定し、浸潤能を比較した。

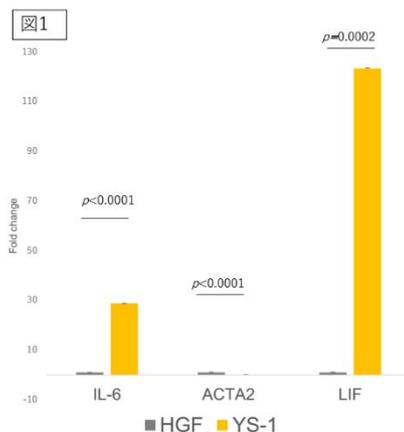
#### (7) 軟寒天培地での足場非依存性コロニー形成アッセイ

YS-1 培養上清が NUGC3 の増殖能に影響を与えるかを調べるため、Cytoselect 96-well cell transformation assay (Soft Agar Colony Formation) kitを用いて、コロニー形成アッセイを行った。蛍光測定(485/528 nmフィルター)にてコロニー形成の比較を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) YS-1 は iCAFs のモデル細胞株である

既報告(引用文献)では、膵臓の線維芽細胞(星細胞 pancreatic stellate cells (PSC))と膵腺癌細胞をマトリゲル内で共培養すると、iCAFs の出現を反映して、培養上清中の IL-6 蛋白濃度が増加する。そこで、胃でも同じ結果が得られるか調べるため、2種類のヒト胃線維芽細胞株(HGF, YS-1)とヒト胃腺癌細胞株(MKN-7)を対象とした。マトリゲル内で、MKN-7 単独培養, YS-1 単独培養, HGF 単独培養, YS-1 + MKN-7 共培養, HGF + MKN-7 共培養の条件で培養し、培養上清中の IL-6 蛋白濃度を ELISA で測定した。その結果、いずれの共培養条件でも IL-6 の増加は観察されなかった。一方、胃癌間質の線維芽細胞株である YS-1 は、IL-6 の産生が高い細胞株であることがわかった。YS-1 は HGF と比較して、IL-6 mRNA と LIF mRNA の発現が有意に高く、ACTA2 mRNA の発現が有意に低かった(図1)。mRNA-seq 解析では、HGF と比較して YS-1 で有意に発現増加している遺伝子に、FAP (CAF のマーカー)、IL-6、LIF に加えて、iCAFs で発現が報告されている炎症性サイトカイン関連の遺伝子(CXCL1, CXCL2, CXCL12, HAS2, CCL2, CFD, IL-1, IL-6ST, SERPINF1, NFK)が含まれていた。加えて、YS-1 で有意に発現が増加していた遺伝子がエンリッチされるシグナル伝達経路の中に、iCAFs での亢進が知られるシグナル伝達経路("TNFA SIGNALING VIA NFKB", "EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION", "INTERFERON GAMMA RESPONSE", "IL6 JAK STAT3 SIGNALING")や炎症関連のシグナル伝達経路("INFLAMMATORY RESPONSE", "INTERFERON ALPHA RESPONSE", "COAGULATION", "COMPLEMENT")がランクインしていた。方法(2)- では、マトリゲル溶解後に回収できた YS-1 が非常に少なすぎたために標本にならず、細胞外基質なし(プレート上)で培養した YS-1(以下、"Dish 培養")で、HE 染色および免疫組織化学標本作製することができた。免疫組織化学的に、YS-1 は IL-6 陽性、 $\alpha$ -SMA 弱陽性を示した。



以上から、YS-1 は胃癌 iCAFs の細胞株であると考えられた。この結果は、胃癌にも iCAFs が存在することの傍証となる。これまでの報告(引用文献)によれば、iCAFs の性質(IL-6 高発現、 $\alpha$ -SMA 低発現)はマトリゲル培養から dish 培養に切り替えると失われるとされるが、YS-1 では dish 培養でも、IL-6 高発現、 $\alpha$ -SMA 低発現を示したことから、YS-1 は培養条件によらない安定した iCAFs の細胞株であると言える。

#### (2) iCAFs の由来

本研究では、既報告(引用文献)の結果とは異なり、線維芽細胞と癌細胞を共培養しても iCAFs の出現を示唆する所見は得られなかった。少なくとも、胃では iCAFs の由来は、組織由来の線維芽細胞ではない可能性が高い。mRNA-seq では、HGF よりも YS-1 で、間葉系幹細胞マーカーである THY1, ENG, ISLR, CD44 の発現が高かった。ISLR は HGF では発現がなかったが、YS-1 と UBE6T-15 ではともに発現しており、YS-1 と UBE6T との間に発現変動は認められなかった。ISLR は血管周囲に存在する間葉系幹細胞あるいは線維芽細胞で陽性となることが知られる。アルギニン酸共培養からの標本作製(方法(2)-)は細胞数が少なく困難であったため、YS-1 と癌細胞との位置関係を視覚化することはできなかったが、ISLR の発現は、iCAFs が血管周囲に主に存在するという、これまでの考えを支持する。他の間葉系幹細胞関連遺伝子の発現増加と併せると、YS-1 は、成熟した線維芽細胞よりは、血管周囲に存在する間葉系幹細胞に類似した細胞と考えられる。従って、iCAFs の由来として間葉系幹細胞が候補に挙げられるが、これについては今後詳細な実験を行って検証したい。

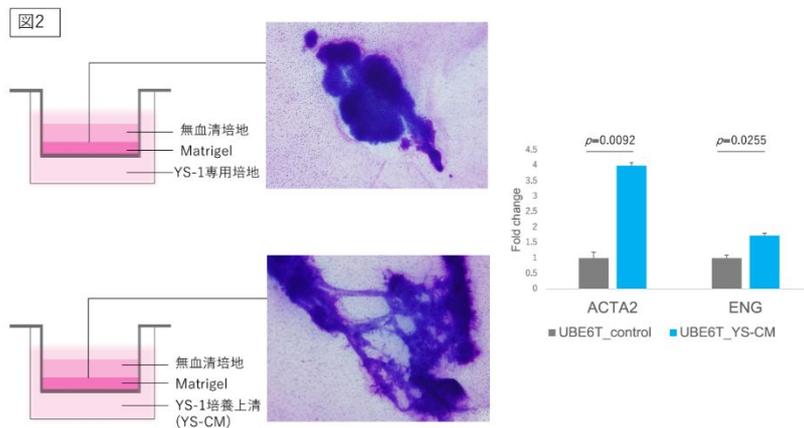
### (3) iCAFsによる幹細胞性誘導

トランスウェル培養において、ボトムウェルにYS-1専用培地を入れたコントロールでは、NUGC3がマトリゲル上で平面的に配列したが、ボトムウェルにYS-1培養上清を加えた条件では、コロニー状の立体的な細胞集塊が形成された。YS-1培養上清ありの条件で培養したNUGC3では、CD44s, NanogのmRNA発現が有意に高く(CD44s:  $p=0.0021$ , Nanog:  $p=0.0076$ ), CD44v6とKLF4のmRNA発現が有意に低かった(CD44v6:  $p=0.0162$ , KLF4:  $p<0.0001$ )。CD44v9のmRNA発現に変化はなかった( $p=0.5430$ )。一方で、YS-1培養上清の有無はNUGC3の足場非依存性のコロニー形成能や浸潤能に影響を及ぼさなかった。

以上から、iCAFsは胃癌細胞の幹細胞性を誘導することが示唆された。この幹細胞性の変化は、癌の悪性度(浸潤能, 足場非依存性増殖)に直接関与するものではなさそうである。

トランスウェル培養において、ボトムウェルにYS-1専用培地を入れたコントロールでは、UBE6T-15がマトリゲル上で、辺縁が比較的平滑な集塊を形成したが、ボトムウェルにYS-1培養上清を加えると、細長い突起を伸ばした紡錘形細胞からなる集塊を形成した。その形態が筋線維芽細胞に類似していることから、YS-1培養上清を加えたUBE6T-15でのACTA2 mRNA発現を調べたところ、YS-1培養上清を加えたUBE6T-15では、ACTA2 mRNA発現が有意に増加していた。加えて、間葉系幹細胞マーカーであるENG mRNAの発現も有意に増加していた(図2)。

以上から、iCAFsは間葉系幹細胞の分化状態に影響を与える可能性が示唆された。YS-1は間葉系幹細胞をENG遺伝子(=CD105)の発現が増加した筋線維芽細胞様の細胞へと変化させたが、この細胞は、我々が過去に胃癌の独立した予後不良因子として報告したCD105陽性CAFs(引用文献)である可能性がある。



#### <引用文献>

Ohlund D et al., Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 214(3):579-596 (2017).

Geng X et al., Cancer-associated fibroblast (CAF) heterogeneity and targeting therapy of CAFs in pancreatic cancer. *Front Cell Dev Biol.* 9:655152 (2021).

Numakura S et al., Mesenchymal stem cell marker expression in gastric cancer stroma. *Anticancer Res.* 39(1);387-393 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沼倉里枝, 加藤雅弘, 宇於崎宏
2. 発表標題 胃癌細胞と線維芽細胞の共培養による変化
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------