

機関番号：82606
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 年 ～ 2010 年
 課題番号：20590417
 研究課題名（和文） がん組織内に動員される間葉系前駆細胞が、がん進展に及ぼす分子機構の解明
 研究課題名（英文） Mechanism of tumor promoting effect by mesenchymal progenitor cell
 研究代表者
 石井 源一郎（ISHII GENICHIRO）
 独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・室長
 研究者番号：00270869

研究成果の概要（和文）：本研究は、血管外膜由来線維芽細胞および骨髄由来線維芽細胞には、間葉系前駆細胞が含まれていることを明らかにした。また、血管外膜由来線維芽細胞が腫瘍の生着率を亢進することを明らかにした。しかし間葉系前駆細胞の未分化状態は、腫瘍生着率の亢進に寄与していなかった。以上より、腫瘍進展に関わるのは、間葉系前駆細胞の未分化状態ではなく、個々の間葉系前駆細胞が有する形質であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study showed that vascular adventitial fibroblast (VAFs) and bone-marrow derived fibroblast contain mesenchymal progenitor cells. Moreover we clarified that VAFs enhanced tumor formation, although “immature status” of VAFs did not contribute to enhanced tumor formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：実験病理

キーワード：間葉系前駆細胞、がん間質、がん進展

1. 研究開始当初の背景

がんの生物像は多彩であり、がん細胞のみならず、その周囲を様々な種類の間質細胞が充填し、がん組織を形成している。従

ってがんの生物学的特性は、がん細胞、間質細胞を含めた多種類の細胞により規定されるものと考えられる。線維芽細胞は、がん間質内に最も多く存在する間質細胞

であり、がん進展に重要な影響を与えている可能性が報告されてきた。しかしながら、各臓器における線維芽細胞の cDNA プロファイルは明らかに異なっており、線維芽細胞は、起源および生物学的にも不均一な形質を示す細胞集団であることが推察されている。間葉系前駆細胞は、形態学的には通常の線維芽細胞と同様の形態像を示すが、骨、軟骨、脂肪などへの多分化能を有する特殊な線維芽細胞として知られている。近年、Karnoub らは、骨髄支持組織由来の間葉系前駆細胞をヒトがん細胞株と共にマウスの皮下へ移植した結果、腫瘍の転移が促進されたことを報告している (Nature; 2007)。このことは、或る種の線維芽細胞 (間葉系前駆細胞) は、腫瘍進展に促進的な影響を与える可能性を示唆している。

我々は今までに、がん間質に動員される線維芽細胞の起源として、1) 既存組織由来の線維芽細胞 2) 骨髄細胞由来線維芽細胞 3) 血管外膜由来線維芽細胞の存在を、動物モデルあるいはヒト手術検体を用いて提唱してきた。

予備的検討から、ヒト肺がん組織より分離培養した線維芽細胞 (cancer associated fibroblast) には、骨芽細胞、脂肪細胞、筋線維芽細胞への分化能を示す細胞が含まれていた。一方既存組織由来の線維芽細胞には、こうした多分化能を有する細胞を殆ど認めなかった。すなわち、がん間質に動員された線維芽細胞には、間葉系前駆細胞としての性質を有する細胞集団も含まれていることが明らかとなった。以上より、がん間質に動員される間葉系前駆細胞の起源を同定することは、がん細胞と間質細胞が構成する分子間相互作用を解析する上で、極めて重要なテーマと考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん間質に動員された間葉系前駆細胞の起源およびそれらの細胞が、腫瘍進展に関わる分子機構を解明することである。各種臓器間質より線維芽細胞を分離培養し、どの細胞画分にも間葉系前駆細胞が多く含まれているかどうかを検討する。さらには、組織内における間葉系前駆細胞の分布を同定し、これらの細胞が腫瘍進展に与える影響および分子機構を *in vivo* あるいは *in vitro* モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

1) 各種線維芽細胞の分離培養

*既存組織 (肺) 由来線維芽細胞 (non cancer associated fibroblast:NCAF)

*骨髄細胞由来線維芽細胞 (bone marrow derived fibroblast:BM-Fb)

*外膜由来線維芽細胞 (vascular adventitia derived fibroblast:VA-Fb)

*胸膜あるいは中皮由来線維芽細胞

2) 各種線維芽細胞の多分化能の検討

骨芽細胞、脂肪細胞、筋線維芽細胞誘への分化能を検討する。

3) 各種線維芽細胞における cDNA プロファイルの作成

4) 間葉系前駆細胞が、がん細胞増殖に与える効果 (*in vitro*)

線維芽細胞とがん細胞とを共培養し、がん細胞の増殖能 (細胞周期) を FACS により解析する。

5) 間葉系前駆細胞が、がん組織に与える効果 (*in vivo*)

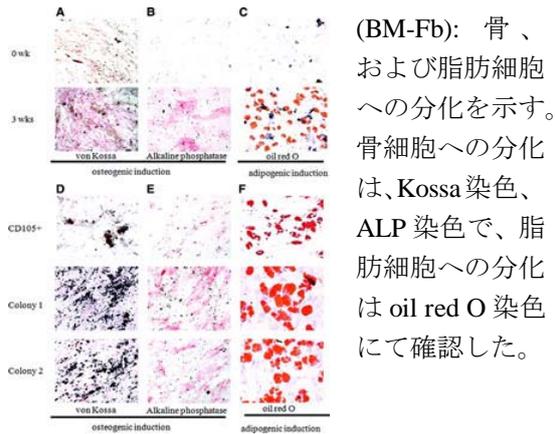
上記線維芽細胞とがん細胞株 (A549) を SCID マウス皮下に移植し、腫瘍の生着率および腫瘍内における局在を検討する。

6) 間葉系前駆細胞が腫瘍進展に与える分子機構の解明

腫瘍進展に関わる原因遺伝子であるかどうかを検討するために、間葉系前駆細胞に遺伝子を過剰発現あるいは、RNAi を用いて遺伝子機能を阻害する。

4. 研究成果

1) 各種線維芽細胞の分化能を検討した結果、BM-Fb, VA-Fb に間葉系前駆細胞が多く含まれていることが判明した。(下図)



(BM-Fb): 骨、および脂肪細胞への分化を示す。骨細胞への分化は、Kossa 染色、ALP 染色で、脂肪細胞への分化は oil red O 染色にて確認した。



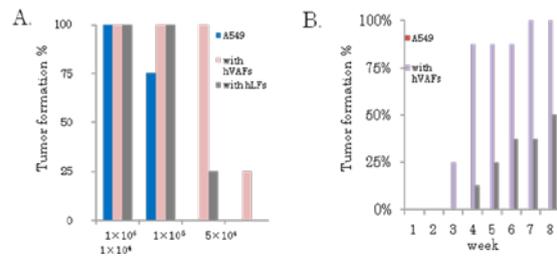
Oil Red O Von Kossa ALP

(Ad-Fb)

骨細胞への分化は、Kossa 染色、ALP 染色で、脂肪細胞への分化は oil red O 染色にて確認した。

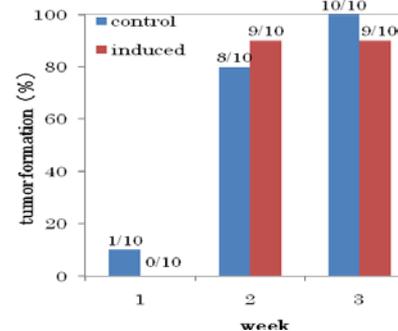
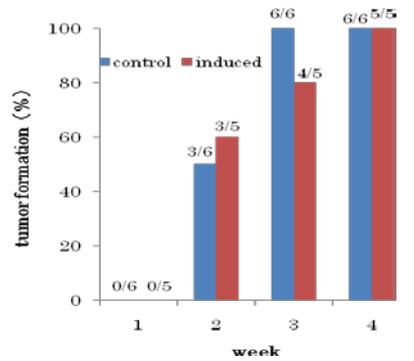
2) 間葉系前駆細胞(Ad-Fb)と肺腺癌細胞株(A549)を、SCID マウス皮下に共移植し、腫瘍の生着を検討した。

Ad-Fb (hVAFs)は、肺組織由来線維芽細胞(LF)と比較して、少数でも A549 生着に寄与した(left)。また、早期生着にも寄与した(right)。以上から、Ad-Fb は、腫瘍の生着を亢進していたことが確認された。(次ページ図)



3) 間葉系前駆細胞(Ad-Fb)の未分化状態が、腫瘍生着に与える影響を検討した。

分化誘導した Ad-Fb と肺腺癌細胞株(A549)を、SCID マウス皮下に共移植し、腫瘍の生着を検討した。



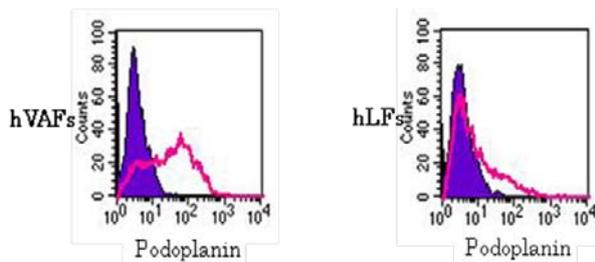
Ad-Fb を骨誘導後に、A549 を SCID マウス皮下に共移植し腫瘍の生着を検討した。誘導(-)の Ad-Fb と比較しても、腫瘍の生着率に差を認めなかった。

Ad-Fb を脂肪誘導後に、A549 を SCID マウス皮下に共移植し腫瘍の生着を検討した。誘導

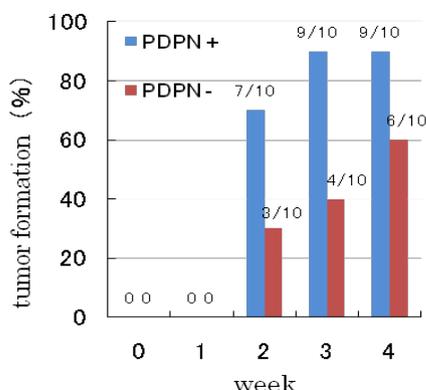
(-)の Ad-Fb と比較しても、腫瘍の生着率に差を認めなかった。

以上の結果から、間葉系前駆細胞(Ad-Fb)の未分化状態は、腫瘍生着率の亢進に寄与していない可能性が示唆された。

4) 腫瘍生着亢進に寄与する間葉系前駆細胞(Ad-Fb)発現分子の検索を行った。cDNA microarray にて、A-Fb と LF における遺伝子発現の差を検討した。

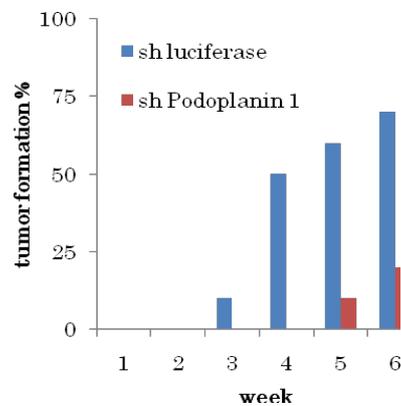


3 倍以上の発現量の差が認められた遺伝子の中で、我々は Podoplanin 分子に着目した。Podoplanin は、リンパ管内皮細胞のマーカーとして知られているが、近年の我々の検討から、がん間質線維芽細胞にも発現が確認されている。また、がん間質線維芽細胞に Podoplanin を発現している肺腺癌症例では、発現していない症例よりも有意に予後不良であることを見出していた。以上を踏まえて、間葉系前駆細胞(Ad-Fb)に発現している Podoplanin が、腫瘍生着亢進の原因分子であると仮説を立て、以下の検討を行なった。



間葉系前駆細胞(Ad-Fb)を、Podoplanin (PDPN)陽性細胞と陰性細胞とに分離し、それぞれを SCID マウス皮下に A549 と共移植した。その結果、Podoplanin 陽性 Ad-Fb と共移植した群では、陰性細胞と共移植した群と比較して、腫瘍の生着率が亢進していた。(前ページ図)

さらに、Podoplanin が腫瘍生着亢進の原因分子であるか否かを決定するために、間葉系前駆細胞(Ad-Fb)の Podoplanin を shRNA を用いてノックダウンし、腫瘍生着に及ぼす影響を検討した。(下図)



間葉系前駆細胞(Ad-Fb)-Sh Podoplanin を共移植した群では、コントロール群と比較して、腫瘍の生着が減少していた。以上の結果から、間葉系前駆細胞(Ad-Fb)に発現している Podoplanin 分子は、腫瘍生着亢進の原因分子である可能性が示唆された。

5) 今後の課題

本研究は、間葉系前駆細胞(Ad-Fb)は腫瘍の生着を亢進することを明らかにした。しかし未分化状態は、腫瘍生着率の亢進に寄与していない可能性が示唆された。また、preliminary result ではあるが、BM-Fb は、腫瘍生着率を亢進しなかった。以上より、腫瘍進展に関わるのは、間葉系前駆細胞の未分化状態ではなく、個々の間葉系前駆細胞が有する形質であ

ることが示唆された。今後は、個々の間葉系前駆細胞において、腫瘍生着率の亢進に寄与する分子機構を解明していくことが重要と考える。

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 10 件) (査読あり 10 件)

1. Yamane Y, Ishii G, Goto K, Kojima M, Nakao M, Shimada Y, Nishiwaki Y, Nagai K, Kohrogi H, Ochiai A. A novel histopathological evaluation method predicting the outcome of non-small cell lung cancer treated by neoadjuvant therapy: the prognostic importance of the area of residual tumor. *J Thorac Oncol.* 2010;5(1):49-55.
2. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Otaki Y, Aokage K, Yanagi S, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A.

Budding in Adenocarcinoma of the Lung: Tumor Budding As an Index to Predict the Potential Aggressiveness.
J Thorac Oncol. 2010;5(9):1361-8.
3. Ishii G, Hashimoto H, Asada K, Ito T, Hoshino A, Fujii S, Kojima M, Kuwata T, Harigaya K, Nagai K, Ushijima T, Ochiai A. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts. *Int J Oncol.* 2010 ;37(2):317-25.
4. Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y, Yamaguchi Y, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal

transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation. *Int J Cancer.* 2011;128(7):1585-95.

5. Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Takeyoshi I, Ochiai A.

associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2010;5(10):1507-15.
6. Nakao M, Ishii G, Nagai K, Kawase A, Kenmotsu H, Kon-No H, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ochiai A.

anhydrase IX expression by cancer-associated fibroblasts in lung adenocarcinoma. *Cancer.* 2009 ;115(12):2732-43.
7. Sugiyama K, Ishii G, Ochiai A, Esumi H.

wound by combined treatment with recombinant human G-CSF, recombinant human M-CSF, and a TGF-beta1 receptor kinase inhibitor in rat skin. *Cancer Sci.* 2008;99(5):1021-8.
8. Hoshino A, Chiba H, Nagai K, Ishii G, Ochiai A. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:305-310.
9. Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagano T, Murata Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Suzuki K, Ochiai A. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2008 ;123(5):1053-9.

10. Chiba H, Ishii G, Ito TK, Aoyagi K, Sasaki H, Nagai K, Ochiai A. CD105-positive cells in pulmonary arterial blood of adult human lung cancer patients include mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2008 ;26(10):2523-30.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 源一郎 (ISHII GENICHIRO)
独立行政法人国立がん研究センター
東病院臨床開発センター・臨床腫瘍病理部
室長
研究者番号 : 00270869

(2) 研究分担者

落合 淳志 (OCHIAI ATSUSHI)
独立行政法人国立がん研究センター
東病院臨床開発センター・臨床腫瘍病理部
部長
研究者番号 : 60183034