

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 川崎 秀吉

題 目：大腸癌における腸筋線維芽細胞の制御機構

## 論文要旨：

がん細胞は、様々な因子を産生することで周囲の細胞を制御し、自身の成長に適した環境（がん微小環境）を整えていると考えられている。近年、がん細胞とがん微小環境構成細胞の相互作用が注目されており、大腸癌においては腸筋線維芽細胞（Intestinal myofibroblasts ; IMFs）が注目されている。IMFs は、がん微小環境を構成し、がんの悪性化に寄与することが知られているが、その制御機構の詳細は不明である。そこで、本研究は、がん細胞による IMFs の制御機構を解明することを目的とした。

第1章および第2章では、本目的を遂行するための有用なツールを作製するために研究を行った。第3章および第4章では、大腸癌における IMFs の制御機構を明らかにすることを目的に、大腸癌細胞において発現が上昇するタンパク質が IMFs 制御機構に与える影響を検討した。

## 第1章および第2章

【背景】大腸癌の発生や悪性化には、上皮幹細胞のがん化と筋線維芽細胞によるがん微小環境の構築が重要と考えられる。そこで、これらの細胞生物学的研究を推進するための有用なツールとして、結腸上皮幹細胞の簡便な単離法の確立、および研究に使いやすい株化 IMFs の樹立を目的に研究を行った。

【結果・考察】結腸上皮幹細胞の簡便な単離法として、幹細胞のアノイキス（足場喪失性細胞死）耐性能に着目し、マウスの結腸よりアノイキス耐性細胞を単離した。得られたアノイキス耐性細胞はいくつかの幹細胞マーカーを発現したが、この細胞は培養、増殖させることができず、結腸上皮幹細胞を用いた実験系の確立にはいたらなかった。

次に、IMFs 細胞株として、SV40 Large T 抗原を用いて不死化した LmcMF と、継代を繰り返すことで自然に不死化させた SmcMF の2種類を作製した。検討の結果、いずれの細胞株も IMFs マーカーを発現し、初代培養 IMFs (Primary-IMFs) と類似した反応性を示したことから、有用な IMFs 細胞株を樹立することができた。

## 第3章

【背景】Sphingosine-1-Phosphate (S1P) は、細胞内の Sphingosine-Kinase (SphK) により合成される。結腸癌細胞は SphK1 を高発現しており、産生した S1P をがん微小環境との相互作用の伝達物質として利用していると考えられる。これまでの研究において、S1P を介したがん細胞と IMFs の相互作用が示唆されているが、S1P が IMF の増殖や遊走に与える影響など、その詳細は不明である。そこで本研究では、S1P を介した IMFs 制御機構の解明を目的に実験を行った。

【結果・考察】S1P は、Primary-IMFs の遊走を濃度依存的に抑制した。各種阻害薬を用いた実

験から、S1P は S1P2 受容体を介した Rac1 抑制により IMF<sub>s</sub> の遊走を抑制することが明らかになった。次に、マウス結腸上皮細胞株 aMoC1 を用いて SphK1 の過剰発現細胞 (SphK1-aMoC1) を作製し、その培養上清で IMF<sub>s</sub> を刺激したところ IMF<sub>s</sub> の遊走は抑制された。また、この遊走抑制も S1P2 受容体拮抗薬により阻害された。さらに、種による違いを検討するため、大腸癌患者の腫瘍部より単離したヒト IMF<sub>s</sub> を用いて、S1P がヒト IMF<sub>s</sub> の遊走に与える影響を検討したところ、S1P による遊走抑制作用が観察された。以上の結果から、SphK1 発現が上昇した大腸癌細胞は、S1P を介して周囲の IMF<sub>s</sub> の遊走を抑制することでがん微小環境を維持し、がんの悪性化に利用している可能性が示唆された。

#### 第 4 章

【背景】KRas は原がん遺伝子として知られており、大腸癌においてはその活性型の変異が多く認められる。がん細胞における KRas の活性型変異は、サイトカインの産生亢進を介してがん微小環境にも影響を与えることが知られているが、がん微小環境の一員である筋線維芽細胞に対する影響については明らかになっていない。そこで本研究では、結腸癌細胞における KRasV12 発現が IMF<sub>s</sub> 制御機構に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

【結果・考察】KRasV12 を過剰発現した aMoC1 (KRasV12-aMoC1) の培養上清は、Primary-IMF<sub>s</sub> および LmcMF の増殖活性に影響を与えず、遊走を促進した KRasV12-aMoC1 では Heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) の発現が上昇していること、また HB-EGF の受容体阻害剤を用いた検討により、HB-EGF が KRasV12-aMoC1 培養上清による IMF<sub>s</sub> の遊走促進の一端を担っていることが明らかになった。さらに、KRasV12-aMoC1 培養上清や HB-EGF は、ERK および JNK シグナルを活性化することで IMF<sub>s</sub> の遊走を促進することが明らかになった。これらの結果から、KRasV12 を発現したがん細胞は、HB-EGF を介して IMF<sub>s</sub> の遊走を促進することでがん微小環境を制御し、がんの悪性化に利用している可能性が示唆された。

本研究により、がん微小環境における IMF<sub>s</sub> の制御機構として、SphK1 発現上皮細胞による S1P を介した遊走抑制、および KRasV12 発現上皮細胞による HB-EGF を介した遊走促進という、相反する二つの機構が関与している可能性を示した。がん細胞によるこのような IMF<sub>s</sub> の制御機構は、がんのステージによって変化している可能性が考えられる。今後は、本研究により樹立したモデル細胞を用いることで、がん細胞と IMF<sub>s</sub> の相互作用についてさらに詳細なメカニズムを検討することが可能となり、大腸癌細胞による筋線維芽細胞の制御機構の解明が、新たな抗がん剤の開発など大腸癌の克服につながることを期待される。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	川崎 秀吉
審 査 委 員	主 査： 山口大学・教授・佐藤晃一
	副 査： 鹿児島大学・教授・宮本篤
	副 査： 鳥取大学・教授・太田利男
	副 査： 山口大学・准教授・加納聖
	副 査： 山口大学・准教授・大瀧剛
題 目	大腸癌における腸筋線維芽細胞の制御機構

審査結果の要旨：

大腸癌は世界的に罹患者数が多く、様々な治療法が用いられているが、現在もその罹患者数や死亡者数は増加しており、新たな抗がん戦略の開発が求められている。がんの悪性化には、がん細胞そのものだけでなく、周囲の正常細胞から構成される微小環境(がん微小環境)が重要な働きを担っていると考えられている。近年、がん微小環境を構成する細胞間の相互作用が注目されており、大腸癌においては腸筋線維芽細胞(Intestinal myofibroblasts; IMFs)が注目されている。IMFs は、がん微小環境を構成し、がんの悪性化に寄与することが知られているが、その制御機構の詳細は不明である。本研究は、結腸上皮細胞のがん化が IMFs に与える影響を検討することで、がん組織におけるがん微小環境の制御機構を解明し、結腸癌における新たな抗がん戦略の開発へ寄与することを目的として行われた。

第 1 章および第 2 章では、本研究における細胞生物学的研究を推進するツールを開発するために、結腸上皮幹細胞の簡便な単離法の確立、および IMFs 細胞株の樹立を目的に研究を行った。結腸上皮幹細胞の簡便な単離法として、幹細胞の足場非依存性増殖能(アノイキス耐性能)に着目し、マウスの結腸より結腸上皮幹細胞の簡便な単離方法を確立した。次に、IMFs 細胞株として、SV40 Large T 抗原の導入と繰り返し継代の 2 つの方法で株化 IMFs を作製し、いずれの細胞株も初代培養 IMFs と類似した反応性を示したことから、有用な IMFs 細胞株を樹立することができた。

第 3 章では、結腸癌細胞で高発現する Sphingosine-Kinase (SphK) により合成される Sphingosine-1-Phosphate (S1P) に着目した。S1P は、がん微小環境における細胞間相互作用の伝達物質と考えられているが、S1P が IMFs の増殖や遊走に与える影響など、その詳細は不明である。そこで本章では、S1P を介した IMFs 制御機構の解明を目的に研究

を行った。その結果、S1P は IMF<sub>s</sub> の S1P<sub>2</sub> 受容体を介した Rac1 抑制によりその遊走を抑制することが明らかになった。また、SphK1 の過剰発現上皮細胞を作製し、その培養上清が S1P<sub>2</sub> 受容体を介して IMF<sub>s</sub> 遊走を抑制することを明らかとした。さらに、種による違いを検討するため、ヒト大腸癌患者の腫瘍部より単離した IMF<sub>s</sub> を用いて、S1P がヒト IMF<sub>s</sub> の遊走に与える影響を検討し、動物種に依存しない S1P による遊走抑制作用を確認した。以上の結果から、SphK1 発現が上昇した大腸癌細胞は、S1P を介して周囲の IMF<sub>s</sub> の遊走を抑制することでがん微小環境を維持し、がんの悪性化に利用している可能性が示唆された。

第 4 章では、大腸癌においてその活性型の変異が多く認められる原がん遺伝子 KRas に着目し、活性型変異体 KRasV12 を発現した結腸上皮細胞が、IMF<sub>s</sub> に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、KRasV12 発現結腸上皮細胞は、IMF<sub>s</sub> の増殖活性に影響を与えず遊走を促進すること、変異結腸上皮細胞では Heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) の発現が上昇し、上皮細胞より放出された HB-EGF が IMF<sub>s</sub> の遊走促進の一端を担っていることが明らかになった。さらに、IMF<sub>s</sub> 遊走促進における細胞内情報伝達系として、ERK および JNK シグナルが活性化されていることを明らかとした。これらの結果から、KRasV12 を発現したがん細胞は、HB-EGF を介して IMF<sub>s</sub> の遊走を促進することでがん微小環境を制御し、がんの悪性化に利用している可能性が示唆された。

本研究により、がん微小環境における IMF<sub>s</sub> の制御機構として、SphK1 発現上皮細胞による S1P を介した遊走抑制、および KRasV12 発現上皮細胞による HB-EGF を介した遊走促進という、相反する二つの機構が関与している可能性が示された。がん細胞によるこのような IMF<sub>s</sub> の制御機構は、がんのステージによって変化している可能性が考えられる。また、本研究で樹立したモデル細胞を用いることにより、がん細胞と IMF<sub>s</sub> の相互作用についてさらに詳細なメカニズムを明らかにすることが可能となり、大腸癌細胞による腸筋線維芽細胞の制御機構を解明し、新たな抗がん剤の開発など大腸癌の克服につながることを期待される。

以上により、本論文は博士（獣医学）の付与に資する内容であると考えられる。