

大腸癌における腸筋線維芽細胞の制御機構

山口大学大学院連合獣医学研究科

川崎 秀吉

2017年3月

目次

第1章 緒言	1
1-1 がん微小環境	1
1-2 腸筋線維芽細胞	3
1-3 本研究の目的	5
第2章 マウス結腸上皮細胞におけるアノキス耐性細胞の単離とその性質評価	7
第1節 背景および目的	7
2-1-1 腸上皮幹細胞	7
2-1-2 がん幹細胞	9
2-1-3 幹細胞の単離	10
2-1-4 本研究の目的	11
第2節 実験結果	12
2-2-1 アノキス耐性細胞における CD133 発現の検討	12
2-2-1-1 免疫染色法によるアノキス耐性細胞における CD133 発現の検討	12
2-2-1-2 フローサイトメトリー法による AR 細胞における CD133 発現の検討	14
2-2-2 AR 細胞における各種幹・前駆細胞マーカー発現の検討	16
2-2-2-1 AR 細胞における DCLK1 発現の検討	16
2-2-2-2 AR 細胞における各種幹・前駆細胞マーカー発現の検討	18
2-2-3 マウス結腸における DCLK1/CD133 共陽性細胞の局在	20
第3節 考察	22
2-3-1 消化管上皮細胞における上皮幹細胞マーカー発現	22
2-3-2 アノキス耐性細胞における Lgr5 および Bmi1 発現	23
2-3-3 アノキス耐性細胞が幹細胞である可能性	24
2-3-4 結論	25
第3章 マウス腸筋線維芽細胞株の樹立とその有用性に関する検討	26
第1節 背景および目的	26
3-1-1 腸筋線維芽細胞研究の問題点	26
3-1-2 本研究の目的	27
第2節 実験結果	28
3-2-1 LmcMF および SmcMF の細胞表現型の検討	28
3-2-1-1 LmcMF および SmcMF の細胞形態の検討	28
3-2-1-2 LmcMF および SmcMF の筋線維芽細胞マーカー発現の検討	30
3-2-1-3 LmcMF および SmcMF における I 型コラーゲン発現の検討	33
3-2-2 LmcMF および SmcMF における増殖能および接触阻止能の検討	35
3-2-2-1 LmcMF および SmcMF における増殖能の検討	35

3-2-2-2	LmcMF および SmcMF における接触阻止能の検討.....	37
3-2-3	LmcMF および SmcMF における LPS 反応性の検討.....	39
3-2-3-1	LmcMF および SmcMF における LPS 受容体の発現.....	41
3-2-3-2	LmcMF および SmcMF における LPS に対する反応性.....	43
第 3 節	考察.....	46
3-3-1	細胞の不死化方法.....	46
3-3-2	LmcMF および SmcMF の表現型.....	47
3-3-3	LmcMF および SmcMF の増殖能および接触阻止能.....	49
3-3-4	LmcMF および SmcMF における LPS の作用.....	50
3-3-5	結論.....	51
第 4 章	大腸癌における sphingosine-1-phosphate を介した上皮細胞-腸筋線維芽細胞間の相互作用の解明.....	52
第 1 節	背景および目的.....	52
4-1-1	Sphingosine-1-phosphate.....	52
4-1-2	本研究の目的.....	53
第 2 節	実験結果.....	54
4-2-1	IMFs の遊走および増殖に対する S1P の作用.....	54
4-2-2	LmcMF および SmcMF の遊走に対する S1P の作用.....	56
4-2-3	S1P による IMFs の遊走抑制に対する各 S1P 受容体阻害剤の作用.....	58
4-2-4	S1P による IMFs 遊走抑制への Rac1 および ROCK の関与.....	60
4-2-5	SphK1 過剰発現が aMoC1 の増殖および遊走に与える影響.....	62
4-2-6	SphK1 過剰発現が aMoC1 の上皮細胞マーカーに与える影響.....	65
4-2-7	IMFs の増殖および遊走に対する SphK1-aMoC1 培養上清の作用.....	67
4-2-8	IMFs 培養上清が aMoC1 および SphK1-aMoC1 の増殖および遊走に与える影響.....	69
4-2-9	S1P がヒト大腸癌組織由来 IMFs の遊走に与える影響の検討.....	71
4-2-9-1	hccIMFs の単離.....	71
4-2-9-2	hccIMFs の遊走に対する S1P の作用.....	73
第 3 節	考察.....	75
4-3-1	Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF における S1P の作用.....	75
4-3-2	S1P による IMFs 遊走抑制.....	75
4-3-3	S1P による IMFs 遊走抑制に関与するシグナル伝達機構.....	77
4-3-4	SphK1 過剰発現が上皮細胞および IMFs に与える影響.....	77
4-3-5	IMFs 培養上清が上皮細胞に与える影響.....	79
4-3-6	総括.....	80
第 5 章	KRas 変異がん細胞による腸筋線維芽細胞制御機構の解明.....	82

第1節	背景および目的.....	82
5-1-1	大腸癌における KRas 変異.....	82
5-1-2	本研究の目的.....	83
第2節	実験結果.....	84
5-2-1	KRasV12 発現 aMoC1 の作製.....	84
5-2-1-1	KRasV12 発現は aMoC1 の増殖および遊走を促進する.....	84
5-2-1-2	KRasV12 発現 aMoC1 はがん細胞様の性質を有する.....	86
5-2-2	KRasV12 発現 aMoC1 は IMF _s の遊走を促進する.....	88
5-2-2-1	KRasV12 発現 aMoC1 は Primary-IMF _s の遊走を促進する.....	88
5-2-2-2	KRasV12 発現 aMoC1 は LmcMF の遊走を促進する.....	90
5-2-3	aMoC1 の KRasV12 発現による各種サイトカインの mRNA 発現量の変化... 92	
5-2-4	各種サイトカインが IMF _s の遊走能に与える影響.....	94
5-2-5	aMoC1 培養上清中の HB-EGF 含有量の検討.....	96
5-2-6	KCM および HB-EGF による IMF _s の細胞内シグナルの変化.....	98
5-2-7	IMF _s の遊走促進への ERK, JNK シグナルの関与.....	104
5-2-8	ERK, JNK シグナル活性化への ErbB 受容体の関与.....	106
5-2-9	KCM による IMF _s 遊走促進に対する ErbB 受容体阻害剤の作用.....	109
5-2-10	HB-EGF による IMF _s 遊走促進に対する ErbB1 および ErbB4 の関与.....	111
5-2-11	ERK, JNK シグナル活性化への ErbB1 の関与.....	113
5-2-12	スクラッチ刺激により ERK および JNK シグナルは活性化される.....	115
5-2-13	IMF _s 培養上清が KRasV12-aMoC1 の増殖, 遊走および浸潤に与える影響.....	117
第3節	考察.....	119
5-3-1	KRasV12 が上皮細胞に与える影響.....	119
5-3-2	KRasV12-aMoC1 が IMF _s に与える影響.....	120
5-3-3	HB-EGF による IMF _s 遊走促進機構.....	121
5-3-4	IMF _s 培養上清ががん細胞に与える影響.....	123
5-3-5	IMF _s 研究における LmcMF の有用性.....	123
5-3-6	結論.....	124
第6章	総合考察.....	126
第7章	実験材料および実験方法.....	131
7-1	細胞単離および培養法.....	131
7-1-1	マウス消化管上皮細胞単離および培養法.....	131
7-1-2	マウス腸筋線維芽細胞単離および培養法.....	132
7-1-3	ヒト大腸癌組織由来腸筋線維芽細胞単離および培養法.....	132
7-1-4	各種細胞株の培養法および培養上清回収法.....	133

7-2	レンチウイルスを用いた遺伝子導入	133
7-2-1	プラスミドの作製	133
7-2-2	プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ	134
7-2-3	レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入	135
7-3	不死化IMFsの作製方法	135
7-4	細胞増殖率測定法	136
7-4-1	カウントによる細胞増殖率測定法	136
7-4-2	CCK-8を用いた細胞増殖率測定法	136
7-5	細胞遊走能測定法	137
7-5-1	Wound healing assayによる細胞遊走能測定法	137
7-5-2	Boyden chamber assayによる細胞遊走能測定法	137
7-6	ソフトアガーコロニー形成試験	138
7-7	免疫細胞染色法	138
7-8	免疫組織染色法	140
7-9	フローサイトメトリー法	141
7-10	RT-PCR法によるmRNA発現量測定	142
7-10-1	mRNAの抽出	142
7-10-2	RT-PCR法	142
7-11	Western blotting法によるタンパク質発現量測定	145
7-11-1	タンパク質抽出法	145
7-11-2	Western blotting法	145
7-12	Rac1活性測定法	147
7-12-1	GST-Pak1 beads作製法	147
7-12-2	Rac1活性測定法	149
7-13	ELISA法	150
7-14	使用薬物	150
7-15	統計処理	150
	引用文献	151
	謝辞	169

第1章 緒言

大腸癌はがんの中でも世界的に罹患者数が多く、男性では三番目に、女性では二番目に罹患率の高いがんである[1]。そのため、様々な抗がん戦略が用いられているが、現在も罹患者数・死亡者数は増加している。

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。がん細胞は、様々な因子を産生することでこの環境を制御し、自身の成長に適した環境に整えていると考えられており、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いる。

1-1 がん微小環境

がん微小環境は、筋線維芽細胞や免疫細胞、血管構成細胞などの正常細胞から構成され、がんの成長に適した環境を作り上げている（図1）[2]。近年、血管新生や腫瘍免疫などのがん微小環境を標的とした抗がん剤が開発され、高い治療効果を示していることからがん微小環境の重要性は明らかである[3, 4]。がん微小環境は、がん細胞の増殖や浸潤、転移の促進、薬剤耐性の獲得など様々な面からがんの悪性化に寄与している[2, 5]。一方、がん細胞はがん微小環境を制御することで自身の成長に適した環境を整えていると考えられており[6, 7]、がん細胞とがん微小環境の相互作用が、がんの病態における重要な現象として注目を集めている。腸筋線維芽細胞（intestinal myofibroblasts ; IMFs）は大腸癌においてがん微小環境を構成する細胞であり、がんの悪性化に寄与することが知られている[8]。一方、がん組織中の筋線維芽細胞は、正常な組織中に存在する筋線維芽細胞だけでなく、上皮細胞や間葉系幹細胞、ペリサイトなど様々な

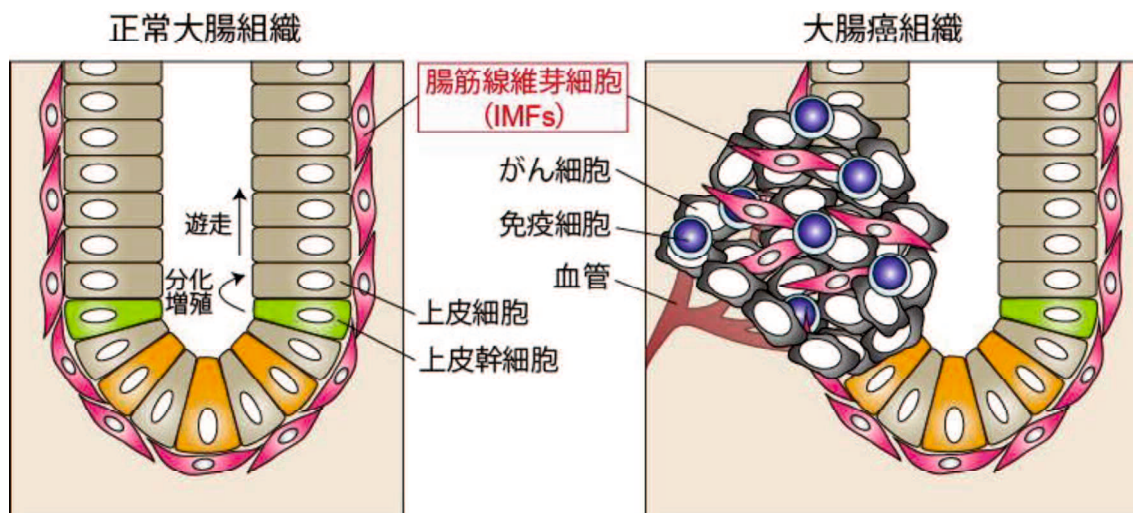


図1 大腸およびがん組織における腸筋線維芽細胞の機能

左：大腸陰窩において，上皮幹細胞が上皮細胞へ分化・増殖し，絨毛先端へ遊走することで上皮層を形成している。腸筋線維芽細胞（IMFs）はこれらの細胞に近接して存在し，上皮細胞の働きを制御している。

右：がん細胞はIMFsや免疫細胞，血管構成細胞など周囲に存在する細胞を利用し，自身の成長に適したがん微小環境を構築している。

細胞が分化することで筋線維芽細胞へ変化していると考えられており，その由来は明らかになっていない[9-11]。そのため，がん組織中の筋線維芽細胞の由来やその制御機構を解明することで，がん微小環境の成り立ちの一部を明らかにしようと，様々な研究が進められている。

1-2 腸筋線維芽細胞

腸上皮層は，上皮幹細胞から分化・増殖した細胞が絨毛端まで遊走することで形成されると考えられており，その一連の機構は筋線維芽細胞や線維芽細胞，血管壁細胞，平滑筋細胞などで構成される微小環境によって厳密に調節されている[12]。微小環境を構成する細胞の中で，IMFsは上皮細胞の分化や増殖，遊走を制御しており，粘膜上皮層の形成において極めて重要な役割を果たすと考えられている（図1）[13, 14]。IMFsは，腸上皮細胞の直下に足場として存在する紡錘形もしくは星状型の間質細胞であり，平滑筋細胞と線維芽細胞の特徴を併せ持つ[13-15]。これら間質系細胞は，それぞれマーカータンパク質の発現量の違いにより区別されるが，IMFsに特異的なマーカータンパク質は現在発見されておらず，平滑筋細胞のマーカータンパク質である α -smooth muscle actin

(α -SMA) と desmin，線維芽細胞のマーカータンパク質である vimentin の組み合わせにより区別される（表1）。IMFsは α -SMA および vimentin 陽性，desmin 陰性あるいは弱陽性という特徴をもち，平滑筋細胞は α -SMA および desmin 陽性，vimentin 陰性，線維芽細胞は α -SMA および desmin 陰性，vimentin 陽性である[12, 15]。

また，IMFsは正常な上皮層の形成に関与するだけでなく，創傷治癒や炎症反応，がんの進展などの各種病態にも密接に関与しており，消化管の病態生理において重要な役割を担う[13, 15, 16]。創傷治癒過程においては，傷害を受けた一

表 1 線維芽細胞, 筋線維芽細胞および平滑筋細胞におけるマーカータンパク質発現の比較

	FB	IMFs	SM
α -SMA	×	○	○
Vimentin	○	○	×
Desmin	×	×(△)	○

線維芽細胞 (FB), IMFs および平滑筋細胞 (SM) におけるマーカータンパク質発現の組み合わせを示す。陽性：○, 陰性：×, 弱陽性：△。

部の腸上皮細胞が脱落した場合、傷害を受けていない上皮細胞が増殖し遊走することで創傷部を覆い治癒するが、IMFs は transforming growth factor- β (TGF- β) や hepatocyte growth factor (HGF) などの成長因子を産生し、この過程を促進する[14, 17]。一方、創傷が重度で腸上皮細胞下にまで至る場合、まず IMFs などの間質系細胞が増殖し遊走することで足場を作り、上皮細胞の増殖と遊走を促進することで上皮層の再生を促す[15]。このように、IMFs が産生する因子と IMFs 自身の遊走は、腸の創傷治癒において重要な働きを担っている。

さらに、大腸癌において、IMFs はがん細胞に近接するように存在し、大腸癌の悪性化に直接的に寄与していることを示唆する報告がされている[8, 18, 19]。また、前立腺癌では筋線維芽細胞を始めとするがん微小環境が、がんの治療耐性獲得に寄与していることを示唆する報告があり[20]、がん研究において IMFs をはじめとする筋線維芽細胞の役割が注目されている。

1-3 本研究の目的

本研究では、がん微小環境中に存在する「筋線維芽細胞」に注目し、がん細胞と筋線維芽細胞の相互作用を解明することを目的とした。筋線維芽細胞は、正常上皮細胞と恒常的に相互作用することで上皮細胞の恒常性維持に寄与していることが知られている。そのため、正常上皮細胞からがん細胞への変異が筋線維芽細胞との相互作用に影響を与えていることが予想される。そこで、正常上皮細胞のがん化が、筋線維芽細胞にどのような影響を与えるかを検討することで、正常組織における微小環境の制御機構とがん組織におけるがん微小環境の制御機構の違いを明らかにすることができる。

第2章では、大腸正常上皮細胞および大腸癌細胞のモデルを作製するために、結腸上皮幹細胞の簡便な単離法の確立を目的に研究を行った。

第 3 章では、細胞株がなく研究効率が悪い筋線維芽細胞の研究を効率化するために、筋線維芽細胞の細胞株を樹立することを目的に研究を行った。

第 4 章および第 5 章では、大腸癌における筋線維芽細胞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筋線維芽細胞制御機構に与える影響について研究を行った。第 4 章では大腸癌細胞において発現が上昇する sphingosine kinase 1 (SphK1) を、第 5 章では上皮細胞をがん化する KRasV12 を上皮細胞に発現させ、筋線維芽細胞に与える影響を検討した。

第 2 章 マウス結腸上皮細胞におけるアノキス耐性細胞の単離とその性質評価

第 1 節 背景および目的

2-1-1 腸上皮幹細胞

幹細胞は自己複製能および多分化能を持つ細胞であり、組織の発生や修復の際には種々の細胞へ分化し供給源となる。腸管においては、腸上皮幹細胞は腸陰窩の底部に存在し、分化・増殖した細胞が絨毛端まで遊走することで上皮層を形成する[21]。一方、陰窩には前駆細胞など一定の幹細胞性を有する細胞も存在し、いずれの細胞が真の腸上皮幹細胞であるかは議論が分かれている。現在のところ、腸上皮幹細胞は二種類存在していると考えられている（図 2）。

一つは、パネート細胞に挟まれて存在する crypt base columnar cells (CBCs) であり、これらの細胞は *Lgr5* という Wnt 標的遺伝子の特異的に発現する[22]。Barker らによる細胞系譜追跡により、*Lgr5* 陽性細胞が全ての腸上皮細胞を生み出すことが示され[23]、さらに、Sato らにより単一の *Lgr5* 陽性細胞がマトリゲルを用いた三次元培養により絨毛-陰窩構造を有する組織構造体を形成することが示され[24]、CBCs が腸上皮幹細胞であることが示唆された。CBCs は、3~5 日程度でリニューアルされる腸上皮の恒常性を維持するため、正常時において増殖活性の高い幹細胞であると考えられている[25]。

もう一種類は、パネート細胞直上の陰窩底部から 4 番目に存在する細胞 (+4 細胞) である。この細胞は BrdU による DNA 標識が長期間にわたり保持されることから label retaining cells (LRCs) として知られ、静止期にある幹細胞と考えられてきた[25]。+4 細胞は *Bmi1* 陽性細胞として知られ、他の細胞と区別されて

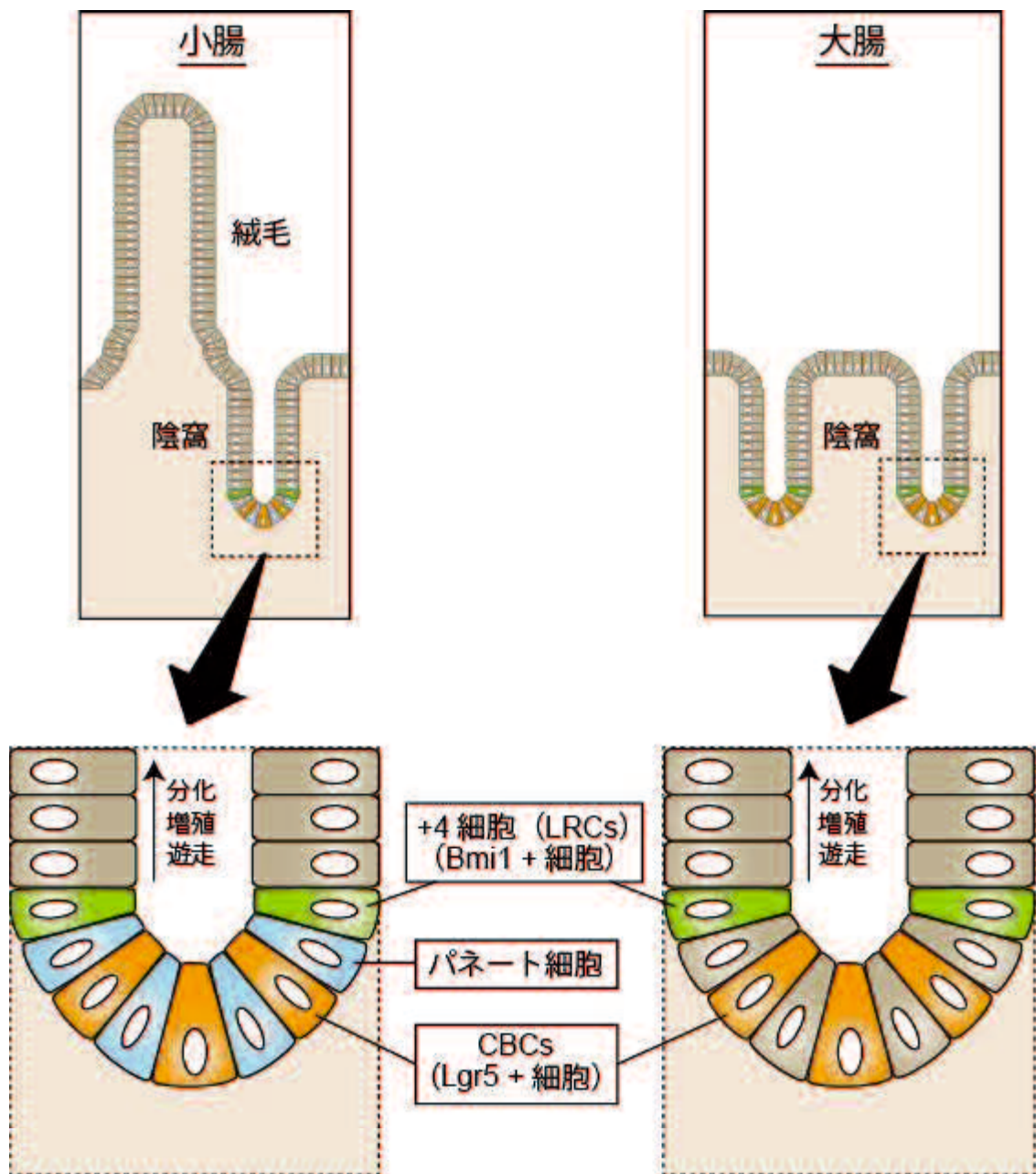


図2 小腸および大腸における幹細胞の分布

小腸陰窩（左）および大腸陰窩（右）における幹細胞の分布。腸陰窩には2種類の幹細胞（+4細胞およびCBCs）が存在し、上皮細胞の供給源となっている。また、小腸陰窩にはパネート細胞が存在する。

いるが、doublecortin and CaM kinase-like-1 (DCLK1) も発現する細胞であると考
えられている[26, 27]。また、+4 細胞は通常は静止期にあるが、Lgr5 陽性細胞が
除去されると Lgr5 陽性細胞の幹細胞としての働きを代償することが報告され、
Bmi1 陽性細胞の幹細胞性が示された[28]。

CBCs および+4 細胞では、Lgr5 および Bmi1 がマーカーとして用いられている
が、どちらの細胞も幹・前駆細胞マーカーである CD133 や Musashi1 (Msi1) を
発現することが知られている[29, 30]。さらに、消化管上皮幹細胞を同定するた
め他にも様々なマーカータンパク質が検討されており、CBCs のマーカーとして
は Olfm4 が、+4 細胞マーカーとしては Hopx や mTert が報告されている[31-33]。
また、大腸にはパネート細胞は存在しないが、小腸と同様に CBCs および+4 細
胞が幹細胞の候補として考えられている[34]。一方、これらの幹細胞以外の細胞
が幹細胞性を有することも報告されている。+5 細胞では、一過性の増殖能と分
泌系細胞への分化という前駆細胞様の性質が観察されており、Lgr5 陽性細胞が
傷害された際に幹細胞に脱分化することが明らかにされた[35]。

このように、腸上皮幹細胞群は可塑性を持つことで幹細胞のバックアップ機
構を有していると考えられており、幹細胞の候補となる細胞は複数存在してい
る。このような複雑な幹細胞保持機構が、腸上皮幹細胞研究をより一層複雑な
ものになっている。

2-1-2 がん幹細胞

腸上皮幹細胞は、正常組織において種々の細胞の起源となるが、がんにおい
ても、がん幹細胞が存在し、がんの発生および再発や転移の原因となっている
とする「がん幹細胞仮説」が提唱されている[36]。実際に様々な実験において、
一部のがん細胞のみが幹細胞の特徴である自己複製能や造腫瘍能を持つことが

示されている[37, 38]。また、がん幹細胞は放射線治療や抗がん剤に抵抗性を持ち、がんの治療抵抗性にも関与していると考えられている[39, 40]。一方、がん幹細胞の由来は明らかになっておらず、正常幹細胞ががん化しているという報告や、がん細胞が脱分化しているという報告が存在する[40-43]。大腸癌においては、幹細胞における変異は効率よく腺腫を引き起こすことが報告されており[26, 42]、幹細胞のがん化プロセスを明らかにすることで大腸癌の発生機構を解明できる可能性がある。また、がん幹細胞においては、Lgr5 や CD133, DCLK1 がそのマーカーとして推定されているが、明確に証明された大腸癌幹細胞マーカーは存在していない。そのため、がん幹細胞の性質評価や、がん幹細胞を標的とした治療法の開発を行うための、がん幹細胞モデルの作製が期待されている。

2-1-3 幹細胞の単離

以上のように、幹細胞は生理的・病態生理的に重要な役割を担っており、さらなる研究が求められている。幹細胞研究を進めるためには、生体組織より幹細胞を単離する必要がある。現在、腸上皮幹細胞の単離方法としては、細胞表面抗原を認識する抗体を用いたセルソーティングや、幹細胞特異的に GFP を発現させたトランスジェニックマウスより単離した細胞から GFP 陽性細胞をソーティングする、といった方法が行われているが、いずれも特別な材料が必要であり、容易に行える方法ではない。また、幹細胞の蛍光化学物質排出能を利用して分画する side population (SP) 法は、幹細胞を単離する容易な方法として広く行われているが、消化管の SP 細胞は血球系細胞を含むことが知られている[44]。そのため、これらの方法に代わる、簡便に腸上皮幹細胞を単離する方法が必要とされている。

上皮細胞のような接着性の細胞は、細胞外基質などの足場との接着を失うことで細胞死が誘導されることが知られており、このようにして誘導される細胞死をアノイクスと呼ぶ[45]。幹細胞はアノイクス耐性であり、いくつかの組織では幹細胞の単離方法にアノイクス耐性能が利用されている[46, 47]。一方、腸上皮細胞において、アノイクス耐性能を用いた幹細胞単離法は確立されておらず、アノイクス耐性細胞が示す性質も明らかになっていない。

2-1-4 本研究の目的

腸管において、上皮細胞の恒常性を理解するためには、上皮幹細胞の働きを知ることが重要である。また、腸管におけるがんの発生には上皮幹細胞のがん化が関与していることから、大腸癌の発生を理解するには、上皮幹細胞のがん化メカニズムを検討する必要がある。そこで、幹細胞研究を進めるために、簡便かつ確実な腸上皮幹細胞の単離方法が必要とされている。

第 2 章では、腸上皮幹細胞の簡便な単離法を確立することを目的として、アノイクスによる腸上皮幹細胞単離法の確立および、アノイクス耐性細胞の幹細胞マーカー発現を検討した。

第 2 節 実験結果

2-2-1 アノイクス耐性細胞における CD133 発現の検討

2-2-1-1 免疫染色法によるアノイクス耐性細胞における CD133 発現の検討

マウス結腸組織より単離した上皮細胞 (Epi 細胞) およびアノイクス耐性細胞 (AR 細胞) を用いて, 免疫染色法により幹・前駆細胞マーカーである CD133 の発現量を検討した。なお, 上皮細胞および AR 細胞の単離方法については, 実験材料および実験方法の章で後述する。

図 3 に示した通り, Epi 細胞においては非常に少数の細胞のみが CD133 陽性を示したが, AR 細胞においてはほぼ全ての細胞が CD133 陽性を示した。なお, AR 細胞において, CD133 の発現量は細胞ごとに不均一であった。

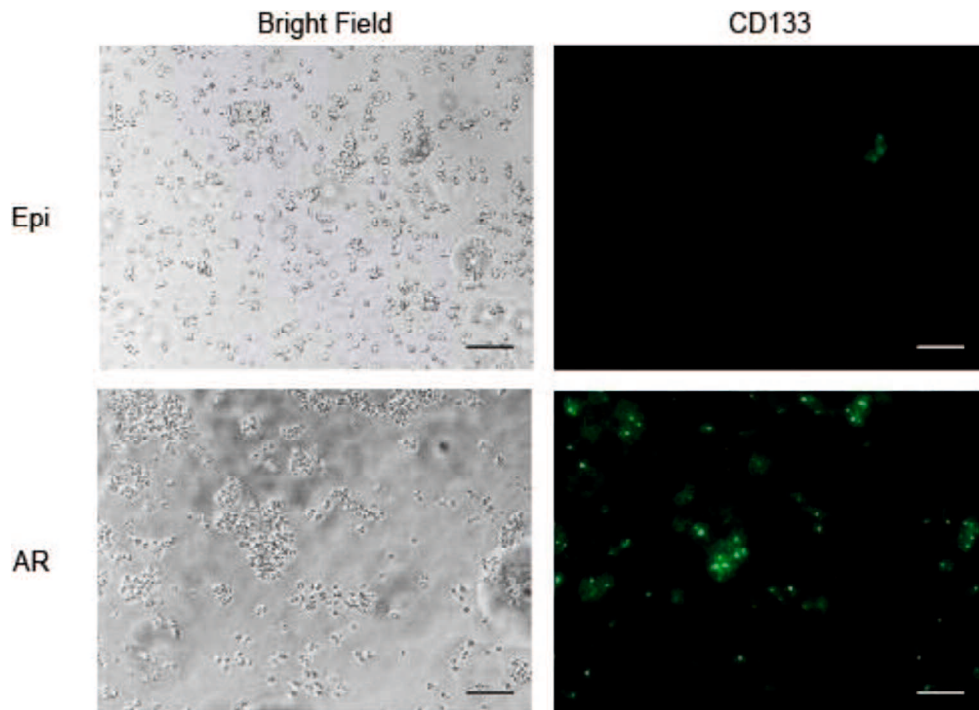


図3 Epi 細胞および AR 細胞における CD133 の発現

単離直後の上皮細胞 (Epi) およびアノイキス耐性細胞 (AR) における CD133 の発現を免疫染色法により検討した。同視野における明視野像 (Bright Field) を示した。スケールバーは 200 μm を示す。典型的な画像の一例を示した。N=3。

2-2-1-2 フローサイトメトリー法による AR 細胞における CD133 発現の検討

Epi 細胞および AR 細胞において、フローサイトメトリー法により CD133 の発現量を検討した。

AR 細胞において、CD133 弱陽性細胞の存在が観察された (図 4 A)。また、AR 細胞は、上皮細胞マーカーである CD326 陽性および造血系由来細胞マーカーである CD45 陰性であることから、血球系細胞が混入している可能性は除外された (図 4 B, C)。なお、CD45 の陽性対照として、マウスの脾臓細胞を使用した (図 4 D)。

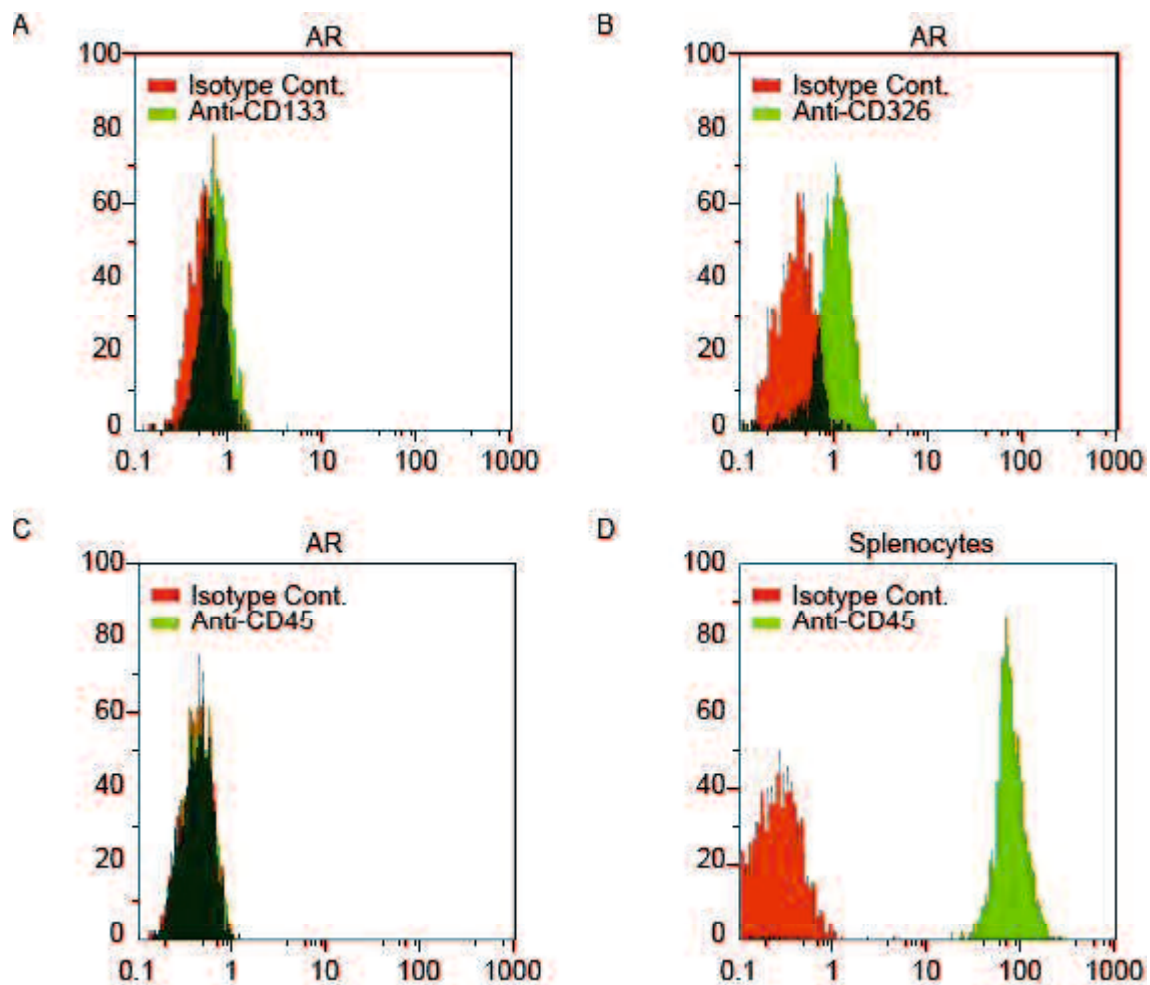


図4 AR細胞におけるCD133, CD326およびCD45の発現

AR細胞 (AR) におけるCD133 (A), CD326 (B), CD45 (C) の発現をフローサイトメトリー法により検討した。脾臓細胞はCD45の陽性対照として用いた (D)。各抗体のアイソタイプ・コントロール (Isotype Cont.) と比較した。典型的な画像の一例を示した。N=3。

2-2-2 AR 細胞における各種幹・前駆細胞マーカー発現の検討

AR 細胞において、幹・前駆細胞マーカーである CD133 の発現が観察されたため、他の幹・前駆細胞マーカーの発現を検討した。

2-2-2-1 AR 細胞における DCLK1 発現の検討

初めに、静止型の幹細胞である+4 細胞における発現が報告されている DCLK1 の発現を検討した[27]。AR 細胞における DCLK1 発現を免疫染色法により検討したところ、ほぼすべての AR 細胞において、CD133 および DCLK1 の共発現が認められた (図 5)。CD133 と同様に、AR 細胞において DCLK1 発現は細胞ごとに不均一であった。

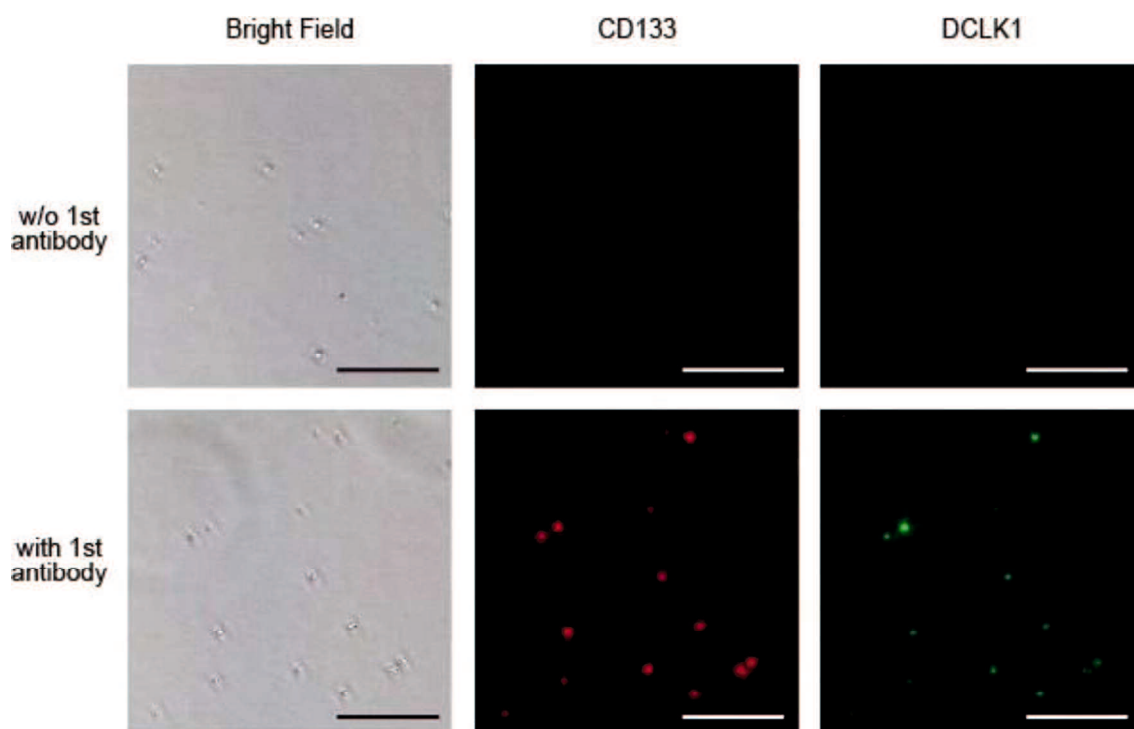


図5 AR細胞におけるDCLK1の発現

AR細胞におけるCD133（赤）およびDCLK1（緑）の発現を免疫染色法により検討した。同視野における位相差顕微鏡像（Bright Field）を示した。一次抗体非処置群（w/o 1st anti-body）は陰性対照として用いた。スケールバーは100 μm を示す。典型的な画像の一例を示した。N=3。

2-2-2-2 AR 細胞における各種幹・前駆細胞マーカー発現の検討

腸管上皮において幹・前駆細胞は、様々なマーカーの発現パターンにより区別されている。そこで、AR 細胞における種々の幹・前駆細胞マーカー発現を検討するため、Epi 細胞および AR 細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法により各種幹・前駆細胞マーカーの mRNA 発現を検討した。

AR 細胞において、Hopx の発現が認められたが、Msi1, Lgr5, Bmi-1, mTert および Olfm4 の発現は認められなかった (図 6)。Epi 細胞には幹・前駆細胞が混在していることから、陽性対照として用いた。

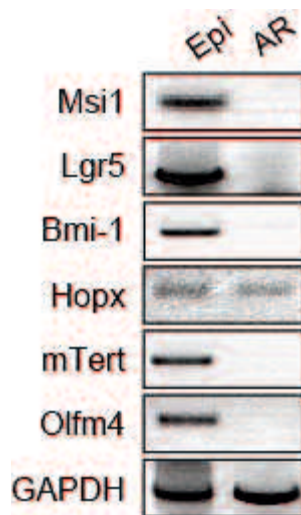


図6 AR細胞における各種幹・前駆細胞マーカーの発現

Epi細胞（Epi）およびAR細胞（AR）におけるMsi1, Lgr5, Bmi-1, Hopx, mTert, Olfm4およびGAPDHのmRNA発現をRT-PCR法により検討した。典型的な画像の一例を示した。N=2。

2-2-3 マウス結腸における DCLK1/CD133 共陽性細胞の局在

これまでの実験より、AR 細胞は DCLK1/CD133 共陽性であることが明らかになったため、マウス結腸における DCLK1/CD133 共陽性細胞の局在を免疫染色法により検討した。

マウス結腸において、DCLK1/CD133 共陽性上皮細胞の存在が認められた（図 7）。DCLK1/CD133 共陽性細胞は、非常に少ない割合で存在していたが、幹・前駆細胞の存在する陰窩底部のみでなく、陰窩上部においてもその存在が観察された。

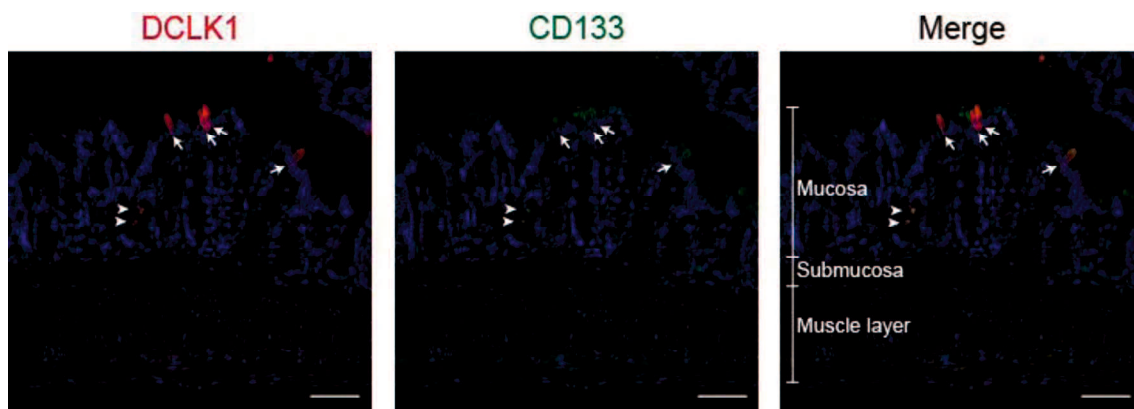


図7 マウス結腸組織における DCLK1/CD133 共陽性細胞の局在

マウス結腸組織における DCLK1（赤）および CD133（緑）共陽性細胞の局在を免疫染色法により検討した。青は核を示す。Merge は重ね合わせ像を示す。矢印は陰窩上部に，矢頭は陰窩底部に存在する DCLK1/CD133 共陽性細胞を示す。スケールバーは 50 μm を示す。典型的な画像の一例を示した。N=2

第3節 考察

腸上皮幹細胞は上皮細胞の恒常性維持やがん化において重要な役割を担っていることから、識別法や単離法を確立するための研究が広く行われている。しかし、いずれの細胞が真の幹細胞であるかは未だに議論が分かれており、単離法も完全には確立されていない。アノイキス耐性（AR）は幹・前駆細胞の特徴であり、様々な組織において幹細胞の単離に利用されている[46, 47]。そこで本研究は、腸上皮幹細胞の簡便な単離法の確立と結腸上皮細胞における AR 細胞の性質評価を目的として行った。

本研究において単離された AR 細胞は、上皮細胞マーカーである CD326 は陽性であったが、血球系細胞マーカーである CD45 は陰性であったことから、血球系細胞の混入の可能性は否定された。また予想通り、ほとんどのマウス結腸上皮由来 AR 細胞は幹・前駆細胞マーカーである CD133 陽性であった。さらに、AR 細胞は、+4 細胞マーカーである DCLK1 および Hopx を発現するが[27, 33], Lgr5, Bmi1, Msi1, mTert および Olfm4 は発現しないことが明らかになった。また、今回採取した AR 細胞において CD133 および DCLK1 の発現に不均一性（heterogeneity）が見られたことから、AR 細胞には分化度の違いなど細胞不均一性のある可能性が示された。

2-3-1 消化管上皮細胞における上皮幹細胞マーカー発現

DCLK1 は微小管結合タンパク質リン酸化酵素の一つであり、胎児の中樞神経系から末梢神経系にわたって発現している[48]。神経発生時、DCLK1 はダイニン依存的機構により紡錘体形成を制御し、分裂期の前中期から中期への適切な移行を担っている[49]。さらに、DCLK1 は脳の発生時における軸索投射や神経

細胞遊走も制御している[50]。DCLK1 は静止状態の幹細胞のマーカーであると考えられているが[27, 51, 52], 近年, 上皮細胞中にごく少数存在する刷子細胞にも発現することが明らかになった[53, 54]。

CD133 は 5 回膜貫通型のタンパク質であり, 造血幹細胞のマーカー分子として同定され[55], その後, 様々な組織の幹細胞やがん幹細胞で発現することが報告された。その機能についてはほとんど明らかになっていないが[56, 57], Wnt/ β -catenin シグナルの活性化に関与することが報告されている[58]。CD133 は, 腸上皮幹細胞マーカーとして使用されているが[29, 59], DCLK1 同様に刷子細胞においても CD133 の発現が報告されている[60]。

本研究において, マウス結腸組織の免疫染色法により, DCLK1/CD133 共陽性細胞が陰窩底部のみでなく陰窩上部にも局在していることが明らかになった。幹・前駆細胞は陰窩底部に存在していることから[21], 陰窩上部で観察された DCLK1/CD133 共陽性細胞は刷子細胞であると考えられる。一方, この結果は同時に, AR 細胞が刷子細胞である可能性を提起するものである。しかし, DCLK1 陽性刷子細胞は分化後の細胞であるにも関わらず, Lgr5 や Bmi1, Msi1, CD133 などの幹・前駆細胞マーカーを発現することが報告されている[60]。本研究において, AR 細胞は Lgr5 や Bmi1, Msi1 を発現しなかったことから, AR 細胞は刷子細胞ではないと考えられる。

2-3-2 アノイキス耐性細胞における Lgr5 および Bmi1 発現

当初の予想と異なり, AR 細胞において Lgr5 および Bmi1 の発現は認められなかった。その可能性の一つとして, これらのマーカー発現が低付着培養中に減少してしまった可能性が考えられる。Lgr5 は R-spondin の受容体であり, Wnt シグナルを増強する[61]。反対に, Lgr5 発現は Wnt シグナルにより増強される[62]。

Bmi1 はポリコム群タンパク質の一つで、細胞の運命決定において重要な役割を担っている。*Bmi-1* 遺伝子の発現は転写因子である c-Myc により正の制御を受けており、血清により c-Myc と *Bmi-1* 遺伝子のプロモーター領域の結合が増強されることが報告されている[63]。本研究により用いた培地は、Wnt および血清を含んでおらず、そのため培養中に Lgr5 および Bmi-1 の発現量が減少した可能性が考えられる。またその他の可能性として、これらのマーカーを発現する細胞はアノキスにより取り除かれたことも考えられる。

2-3-3 アノキス耐性細胞が幹細胞である可能性

腸上皮細胞には、増殖型の CBCs と静止型の +4 細胞という 2 種類の幹細胞が存在していることが示唆されており、これらの細胞はそれぞれ Lgr5 と Bmi1 の発現により区別されると考えられてきた[23, 26, 64]。しかし近年、少なくとも一部の細胞において Bmi1 発現が、Lgr5 発現と重なることが報告された[60, 65]。さらに、オルガノイド培養において、静止型幹細胞マーカーである Bmi1 陽性細胞が高い増殖活性を示すことが明らかになった[64]。これらの報告は、Bmi1 は静止型幹細胞だけでなく、増殖型の幹・前駆細胞にも発現している可能性を示唆している。今回、Lgr5 陽性細胞や Bmi1 陽性細胞のオルガノイド培養において用いられている、Wnt3A, epidermal growth factor (EGF), R-spondin, Noggin 含有培地を使用しても[24, 64], AR 細胞をマトリゲル中で増殖させることができなかった (data not shown)。また、AR 細胞は Lgr5 や Bmi1 を発現しなかったことから、Lgr5 陽性細胞や Bmi1 陽性細胞などの増殖性幹細胞はアノキス感受性であり、単離時に排除されたと考えられる。AR 細胞において、+4 細胞マーカーである DCLK1 および Hopx の発現は確認されたが[27, 33], AR 細胞が静止型幹細胞であるかを検討するためには、さらに他の幹・前駆細胞マーカーの発現を

検討する必要がある。一方、Lgr5 陽性細胞も静止型幹細胞である+4 細胞のマーカを発現することが報告されており[65]、静止型幹細胞におけるマーカ発現については未だに議論が分かれている。そのため、本研究においては AR 細胞が静止型幹細胞であるかどうかについては明らかにすることができなかった。

2-3-4 結論

本研究において、マウス結腸上皮層にはアノキス耐性上皮細胞が存在し、それらの細胞は幹・前駆細胞マーカである CD133 および DCLK1 を発現することが明らかになった。本研究において単離された AR 細胞が、静止型の幹細胞および刷子細胞のいずれの細胞であるかを明らかにするためには更なる検討が必要であるが、結腸上皮層から幹細胞を簡便に単離できる可能性が示された。一方、単離後の細胞は培養することができなかったため、単離法や培養法をさらに検討する必要がある。消化管上皮幹細胞は Wnt シグナルや BMP シグナルにより制御されており、オルガノイド培養においても Wnt シグナルのリガンドである R-spondin や BMP 阻害タンパクである Noggin が用いられている[24, 66]。本研究では、培養時のみしかこれらのタンパクで刺激していないため、単離時においてもこれらの刺激を加えることで幹細胞性を維持できる可能性がある。また、静止型幹細胞は傷害時に増殖することが知られているため[66]、AR 細胞が静止型幹細胞である場合、消化管の傷害時に産生されるインターロイキンなどの炎症性サイトカインによる刺激で増殖を誘導できる可能性がある。今後は、単離した AR 細胞の培養方法を確立することで、簡便な消化管上皮幹細胞単離法および培養法の確立が期待される。

第3章 マウス腸筋線維芽細胞株の樹立とその有用性に関する検討

第1節 背景および目的

3-1-1 腸筋線維芽細胞研究の問題点

IMFs は腸の恒常性維持から病態発症に至るまで広く関与しているが、その役割には未解明な点が多数存在する。その原因として、IMFs 研究進展の障害となっている二つの問題が考えられる。まず一つ目として、IMFs を他の間葉系細胞と区別する特異的マーカーが発見されていないことが挙げられる。各間葉系細胞はその細胞特性が類似しており、細胞間でマーカータンパク質の発現が重複している[12]。そのため、IMFs に特異的なマーカーは発見されておらず、IMFs の役割を解明する上で大きな障害となっている。二つ目は、定常的に筋線維芽細胞の特徴を発現した株化細胞が存在しないことである。そのため、IMFs 研究には、生体から単離培養した初代培養 IMFs (Primary-IMFs) が用いられている。しかし、Primary-IMFs は増殖が非常に遅く、細胞の倍化時間はおおよそ 5 日であるため[67]、研究で使用できる状態にするまでに単離後 3~4 週間の培養が必要となる。さらに、Primary-IMFs は細胞寿命が短く、7~8 継代程度で増殖を停止してしまう。一方、ヒト結腸筋線維芽細胞株として使用されている CCD-18Co 細胞は、TGF- β 刺激下でしか筋線維芽細胞マーカーである α -SMA を発現せず、線維芽細胞の性質を維持している[68]。このように、現時点において定常的に分化した株化 IMFs は報告されておらず、特異的マーカーの探索研究においても障害となっている。以上より、分化した細胞株の欠如が IMFs 研究の発展における障害であることは明白であり、株化 IMFs の樹立は早急に解決されるべき課題である。

3-1-2 本研究の目的

腸において,IMFs は正常時だけでなく病態時にも重要な役割を果たしており,その役割を解明することは,腸の恒常性維持や病態発症メカニズムの理解につながる。しかし,IMFs の機能については未解明な点が多く,研究を進展させていくために株化した IMFs が必要不可欠である。そこで第 3 章では,株化 IMFs の樹立とその有用性に関する検討を目的として行った。

第 2 節 実験結果

3-2-1 LmcMF および SmcMF の細胞表現型の検討

3-2-1-1 LmcMF および SmcMF の細胞形態の検討

本研究では、Primary-IMFs に SV40 large T 抗原を導入することで不死化させた LmcMF, および Primary-IMFs の培養を続けることで自然に不死化させた SmcMF の 2 種類の細胞株を作製した。

筋線維芽細胞の特徴の一つとして紡錘形の細胞形態が挙げられる[12]。そこで、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) と Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF の形態を比較し、細胞表現型について検討した。

図 8 に示したとおり、コンフルエント状態となった MEF は類円形を呈していたが、LmcMF および SmcMF は Primary-IMFs と同様に紡錘形の細胞形態を呈していることが認められた。

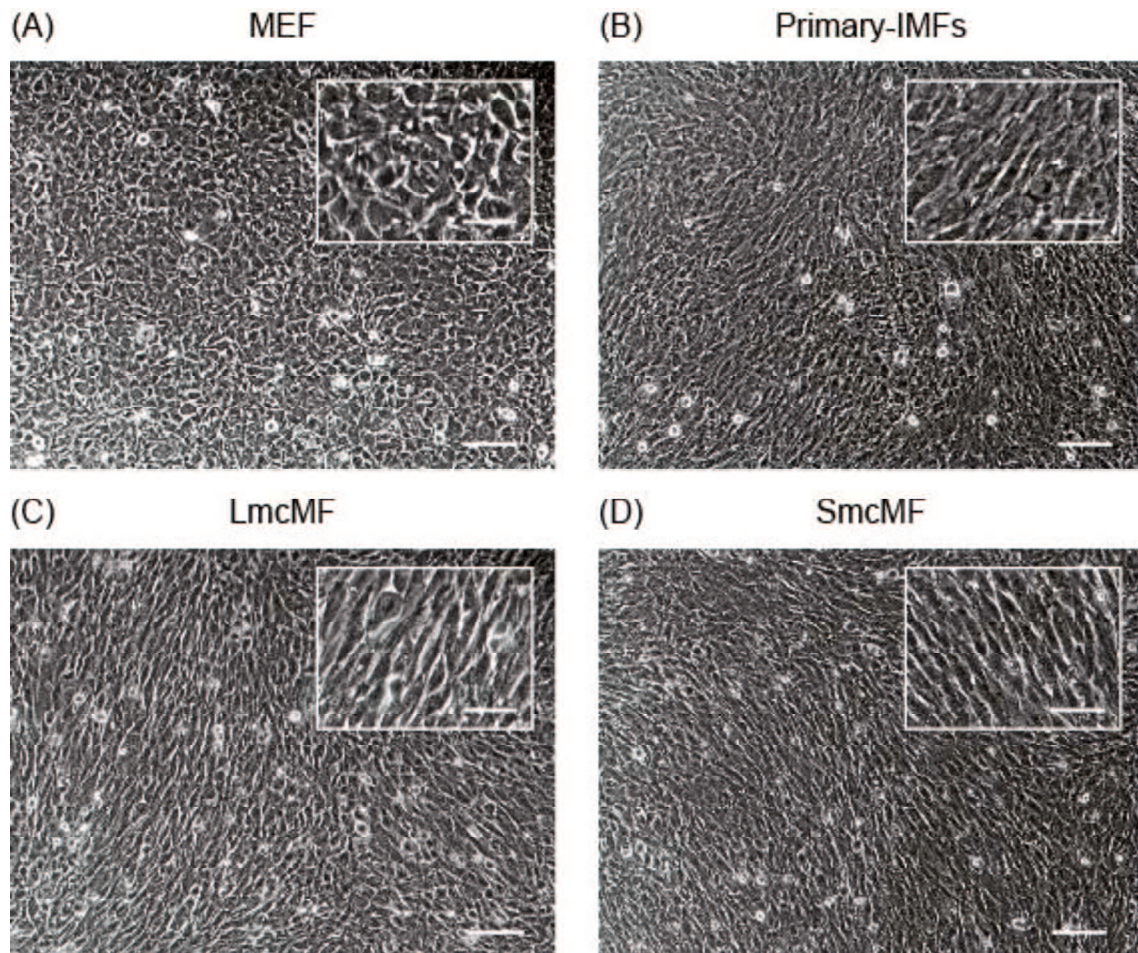


図 8 MEF, Primary-IMFs, LmcMF, SmcMF の細胞形態

MEF (A), Primary-IMFs (B), LmcMF (C) および SmcMF (D) の細胞形態を位相差顕微鏡で観察し検討した。スケールバーは、弱拡大像は $200\ \mu\text{m}$ を、強拡大像（写真中挿入図）は $100\ \mu\text{m}$ を示す。典型的な画像の一例を示した。

3-2-1-2 LmcMF および SmcMF の筋線維芽細胞マーカー発現の検討

IMFs は、 α -SMA および vimentin に陽性、desmin は陰性もしくは弱陽性という 3 つのマーカータンパク質発現の組み合わせにより、他の間葉系細胞と区別される (表 1)。そこで、LmcMF および SmcMF におけるこれらのタンパク質の発現を、western blotting 法および免疫染色法により検討した。

陰性対照として用いたマウス乳腺上皮細胞株 (Eph4) では、 α -SMA の発現は認められなかったが、LmcMF および SmcMF において Primary-IMFs と同様に α -SMA の発現が認められた (図 9 A, B)。また、免疫染色法において Primary-IMFs および LmcMF の α -SMA はフィラメント状に観察され、SmcMF の α -SMA は細胞質全体に均一に観察された (図 10 A)。Vimentin は、陰性対照のマウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7) では発現は認められなかったが、LmcMF および SmcMF において Primary-IMFs と同様にその発現が認められ (図 9 C, D)、3 種の細胞間で発現様式には大きな違いは見られなかった (図 10 B)。また、陽性対照として用いた平滑筋組織では desmin の発現が認められたが、Primary-IMFs と SmcMF では desmin の発現は非常に弱く、LmcMF では発現は認められなかった (図 9 E, F)。

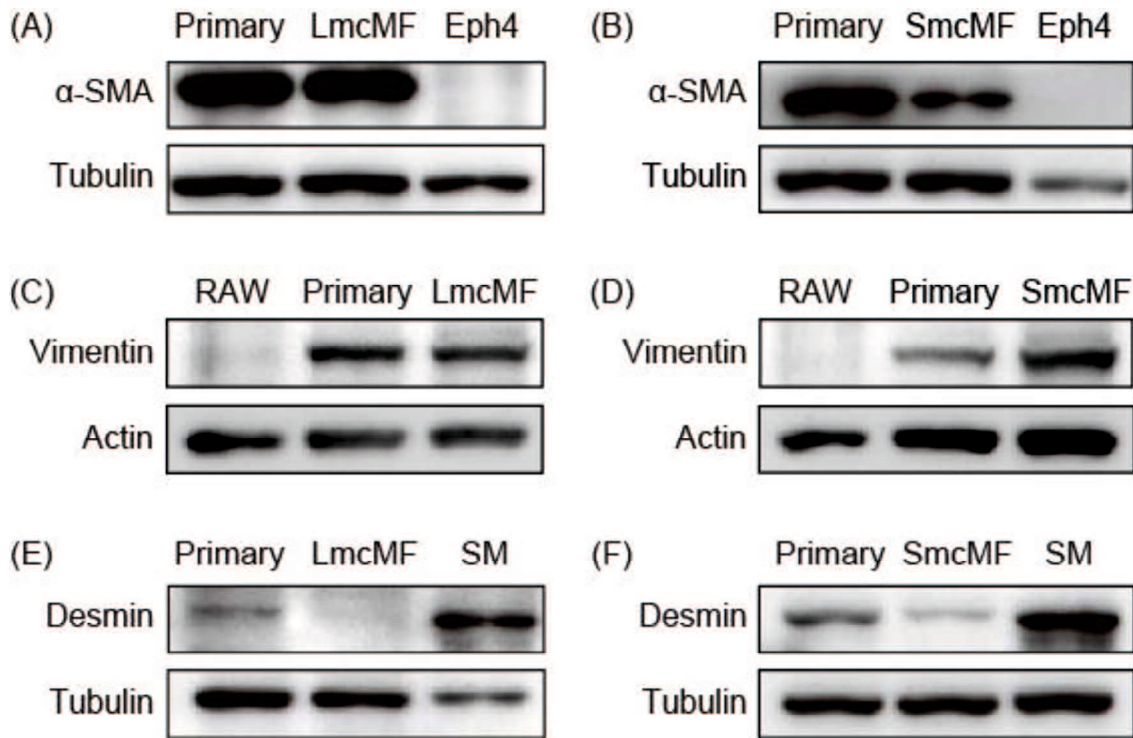


図9 各種細胞における筋線維芽細胞マーカーの発現

Primary-IMFs (Primary), LmcMF および SmcMF における α -SMA (A, B), vimentin (C, D) および desmin (E, F) の発現を western blotting 法により検討した。Eph4 および RAW264.7 (RAW) は陰性対照として、平滑筋組織 (SM) は陽性対照としてそれぞれ用いた。Tubulin および total actin (Actin) はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。N=2。

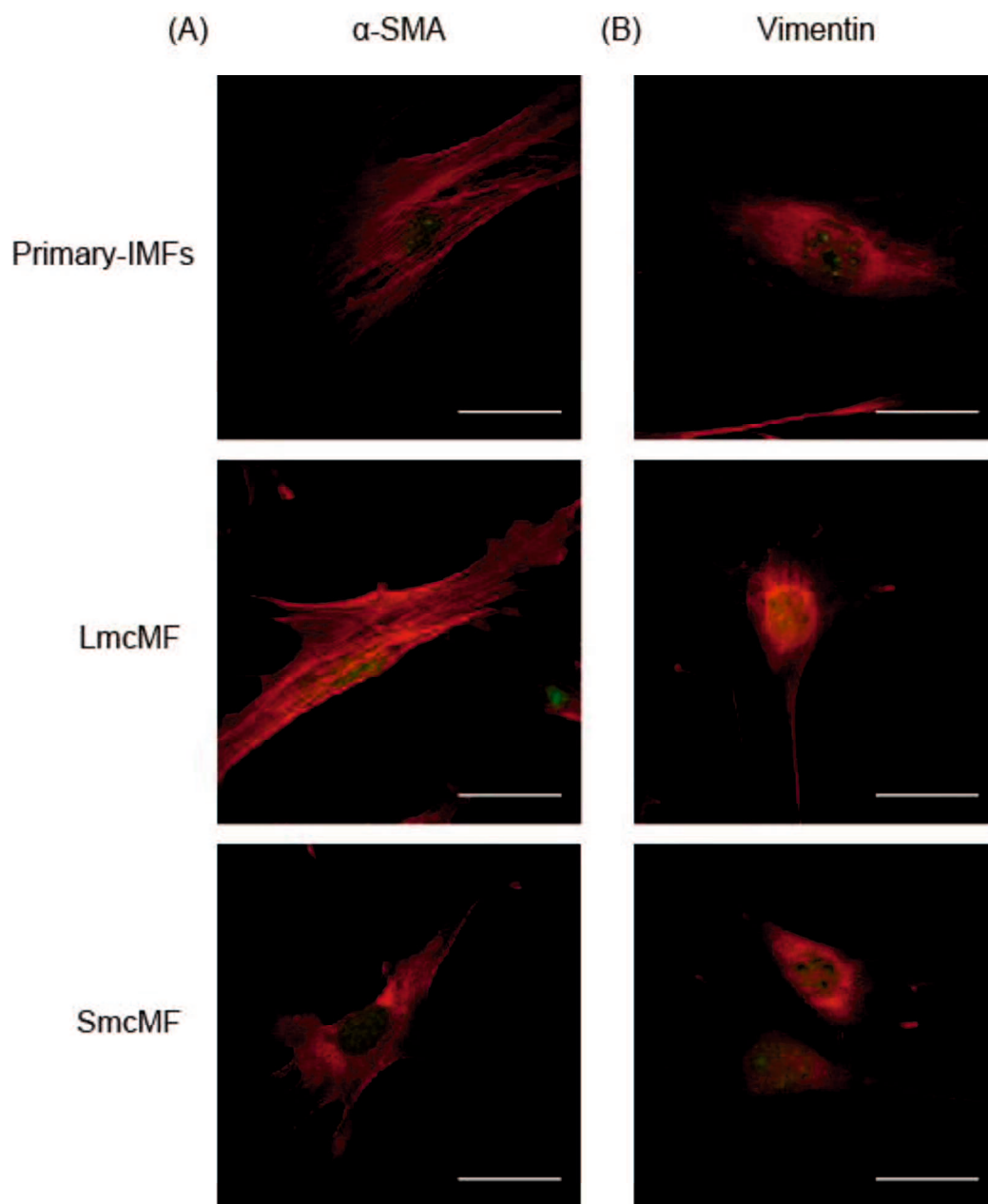


図 10 各種 IMFs における筋線維芽細胞マーカーの発現

Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF における α -SMA (A, 赤) または vimentin (B, 赤) の発現を免疫染色法により検討した。緑は核を示す。スケールバーは 40 μ m を示す。典型的なデータの一部を示した。N=2。

3-2-1-3 LmcMF および SmcMF における I 型コラーゲン発現の検討

I 型コラーゲンは間葉系細胞で産生される細胞外基質の一つであり，筋線維芽細胞でも産生されることが知られている[12, 68, 69]。そこで，LmcMF および SmcMF における I 型コラーゲンの発現を，western blotting 法により Primary-IMFs と比較し検討した。

本実験において，陰性対照として用いた RAW264.7 では I 型コラーゲンの発現は認められなかったが，LmcMF および SmcMF で，Primary-IMFs よりやや少ない I 型コラーゲンの発現が認められた（図 11）。

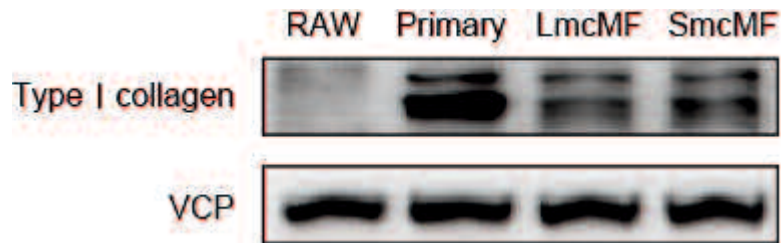


図 11 各種細胞における I 型コラーゲン発現

Primary-IMFs (Primary), LmcMF および SmcMF における I 型コラーゲン (Type I collagen) の発現を western blotting 法により検討した。RAW264.7 (RAW) は陰性対照として用いた。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。N=4。

3-2-2 LmcMF および SmcMF における増殖能および接触阻止能の検討

ここまでの結果より, LmcMF および SmcMF は IMFs の表現型を示すことが明らかになった。そこで, 次にこれらの細胞が株化細胞であることを明らかにするため, 細胞の不死化およびがん化の有無を検討した。

3-2-2-1 LmcMF および SmcMF における増殖能の検討

一般に, 正常な体細胞には寿命があり, 寿命を迎えた細胞は増殖を停止し, 死への経過を辿っていく。一方, 不死化した細胞は増殖能を維持し続けるため長期間にわたる継代が可能である。そこで, LmcMF および SmcMF の不死化の有無を明らかにするために, それぞれの細胞の増殖倍率を測定し, その増殖能を検討した。

Primary-IMFs は 7~8 継代で増殖を停止するのに対して, LmcMF および SmcMF は少なくとも 20 継代は増殖能を維持し, 細胞の不死化が認められた。また, 細胞数の倍化時間はそれぞれ 19.1 時間と 17.2 時間だった (図 12 A, B)。なお, Primary-IMFs は, 細胞密度が低いと増殖しないことから, 本実験では細胞の増殖が認められず増殖倍率を計算できなかった。

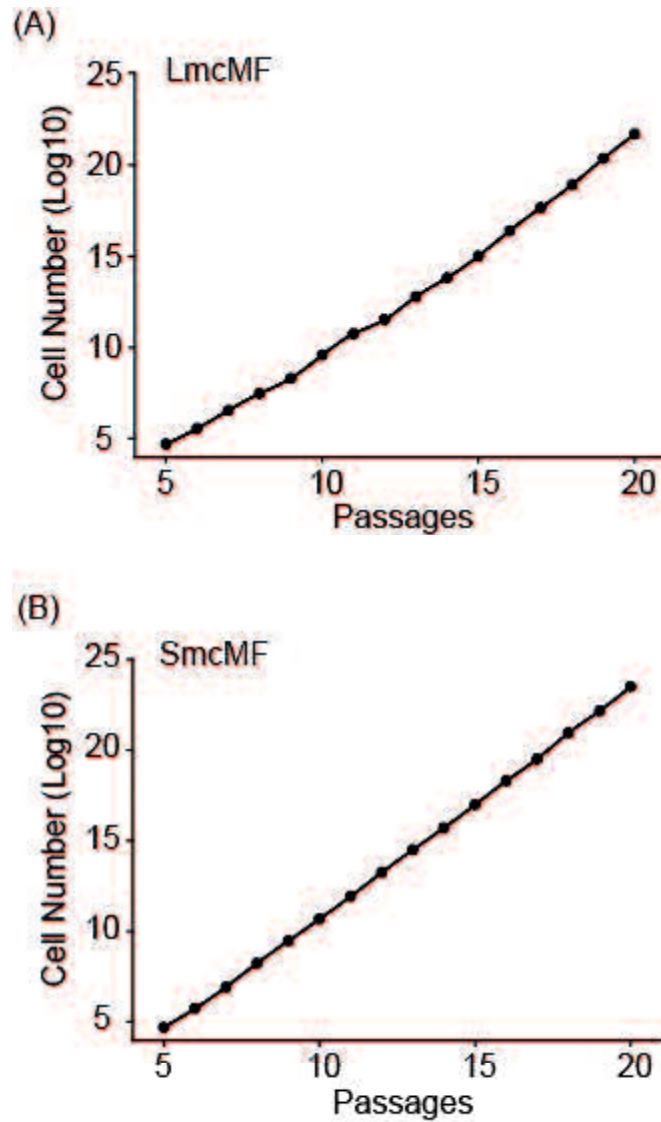


図 12 LmcMF および SmcMF における増殖能の検討

LmcMF (A) および SmcMF (B) における増殖能の維持を表す増殖曲線を示す。細胞を定期的に継代し、細胞数を測定して増殖倍率を計算することにより細胞増殖曲線を作成した。横軸は継代回数を、縦軸は細胞数を示す。

3-2-2-2 LmcMF および SmcMF における接触阻止能の検討

がん化していない正常な細胞は接触阻止能を有するため、培養下で細胞がコンフルエントになると不死化細胞であっても増殖を停止する。一方、がん化した細胞は接触阻止能を持たず、細胞がコンフルエントになった後も増殖を続ける。そこで、LmcMF および SmcMF のがん化の有無を明らかにするため、それぞれの細胞の接触阻止能を検討した。

LmcMF および SmcMF は約 5 日でコンフルエントになり、細胞数は 5~6 日をピークとし、その後は増殖が停止したことから、どちらの細胞においても接触阻止能が認められた (図 13 A, B)。

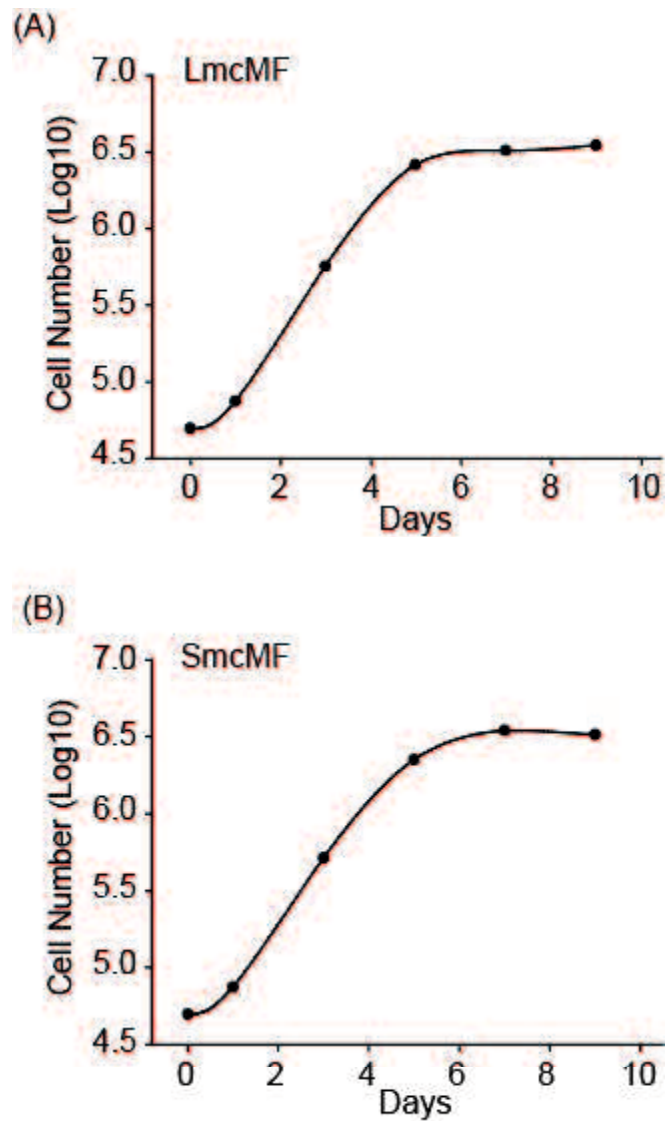


図 13 LmcMF および SmcMF における接触阻止能の検討

LmcMF (A) および SmcMF (B) における接触阻止能を表す増殖曲線を示す。
 5×10^4 個の細胞を播種し、経時的に細胞数を数えることで増殖曲線を作成した。
 典型的な増殖曲線の一例を示した。N=2~3。

3-2-3 LmcMF および SmcMF における LPS 反応性の検討

腸内腔には多数の常在細菌が存在するが、正常な腸ではそれらの細菌は免疫応答を誘導しない。一方、上皮層のバリアが崩壊した場合には、常在細菌が炎症を誘導することで病原性細菌による感染を防ぎ、腸内の恒常性を維持している[16]。しかし、炎症性腸疾患（IBD）等の病態においては、常在細菌による炎症反応が持続することで慢性的な炎症が引き起こされ、防御機構が破綻すると考えられている。

炎症の発生と持続には、Toll-like receptor (TLR) を介した反応が重要な役割を担っている[70]。グラム陰性菌の細胞壁主要構成成分である lipopolysaccharide (LPS) は、腸における炎症反応を誘導する主要な因子の一つであり、TLR ファミリーである TLR4 を介して腸上皮細胞へシグナルを伝達し、炎症性サイトカイン等の分泌を促進する。LPS は、LPS 結合タンパク質 (LBP) との結合により CD14 へ誘導され、LPS-CD14 複合体が MD2 を介して TLR4 に結合することで細胞内へシグナルが伝達される (図 14) [71]。細胞内では、TLR4 への刺激により TAK1 が活性化され、MAP キナーゼキナーゼである MKK3 と MKK6 の活性化を介して、p38 MAP キナーゼ (MAPK) が活性化される[72]。また、TAK1 は IKK 複合体の活性化を通して I κ B α のリン酸化と分解を引き起こし、NF- κ B が活性化され核内に移行することで炎症性サイトカインの発現が誘導される[73]。IMFs においても、TLR4、CD14 および MD2 を発現することが報告されており、LPS 処置によって NF- κ B の活性化や p38 MAPK のリン酸化を介した炎症反応が惹起されることから[16]、IMFs は腸上皮細胞とともに消化管における炎症反応に重要な役割を担っていると考えられている。

そこで、本研究では、LmcMF および SmcMF の細胞株としての有用性を検討するため、これらの細胞の LPS 反応性を Primary-IMFs と比較し検討した。

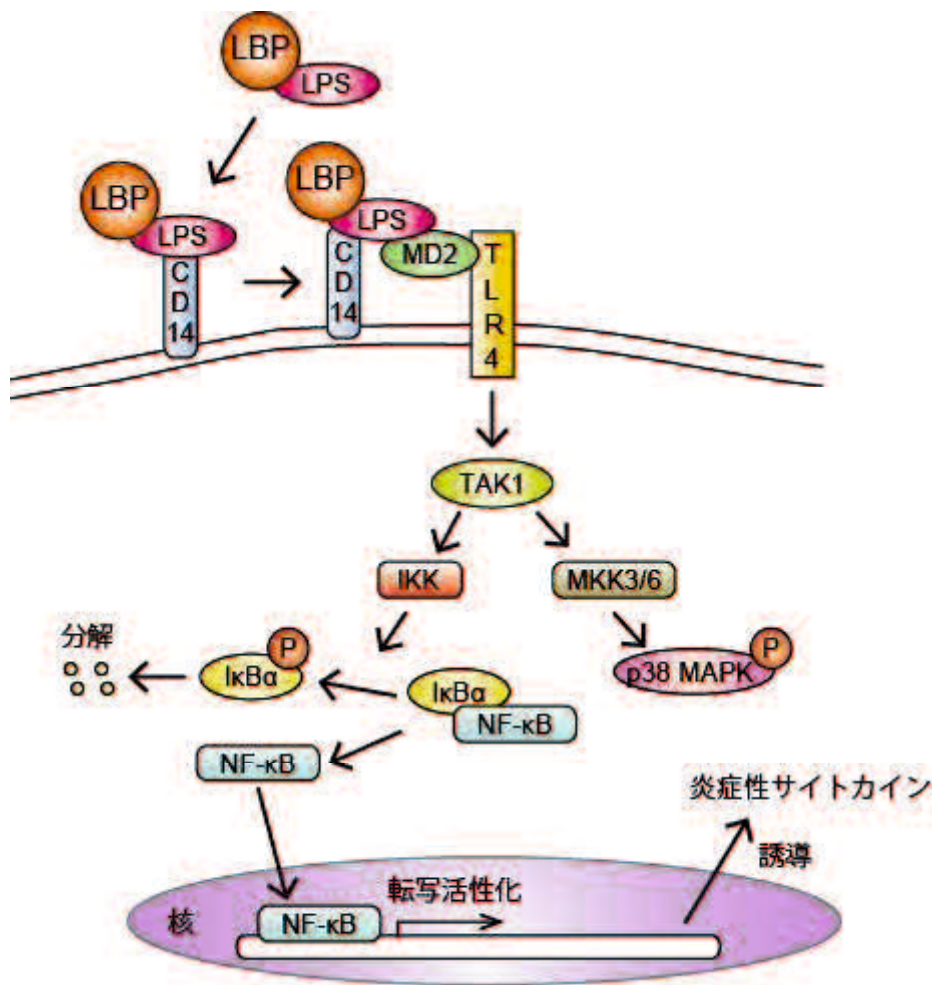


図 14 LPS 刺激による TLR4 を介したシグナル伝達様式

LPS は LBP に捕捉され CD14 へ運ばれた後, MD2 を介して TLR4 を刺激する。TLR4 が刺激されると, TAK1 が活性化され, MKK3/6 が活性化されることで p38 MAPK のリン酸化が誘導される。また, TAK1 による IKK 複合体の活性化, IκBα のリン酸化と解離を介して NF-κB が核内に移行し, 炎症性サイトカインの発現が誘導される。解離したリン酸化 IκBα は分解される。

3-2-3-1 LmcMF および SmcMF における LPS 受容体の発現

LmcMF および SmcMF における LPS 受容体関連タンパク質 (TLR4, CD14, MD2) の発現を western blotting 法により検討した。

Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF のすべての細胞において, LPS 受容体関連タンパク質の発現が認められた。しかし, LmcMF および SmcMF における TLR4 の発現は Primary-IMFs より高く, LmcMF における CD14 の発現と, SmcMF における MD2 の発現は, それぞれ他の細胞よりやや低いものだった (図 15)。

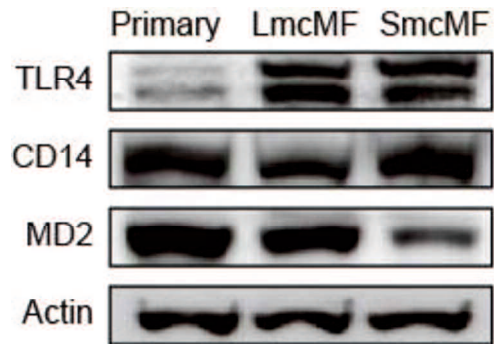


図 15 各種 IMFs における LPS 受容体の発現

Primary-IMFs (Primary), LmcMF および SmcMF における TLR4, CD14 および MD2 の発現を western blotting 法により検討した。Actin はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。N=3。

3-2-3-2 LmcMF および SmcMF における LPS に対する反応性

Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF における LPS に対する反応性を western blotting 法を用いて検討した。

LPS (20 ng/ml) で 30, 60, 120 分間処置し, I κ B α とリン酸化 p38 MAPK の発現量を測定した。Primary-IMFs においては, LPS の 30 分間処置により I κ B α 発現量が有意に減少し, 120 分間処置により LPS 無処置群と同等のレベルにまで回復した。また, リン酸化 p38 MAPK の発現量は, LPS の 30 分間処置により有意に上昇し, 120 分間処置により LPS 無処置群と同等のレベルにまで低下した (図 16 A, 図 17 A)。LmcMF および SmcMF においても, LPS 処置による I κ B α とリン酸化 p38 MAPK の発現量は Primary-IMFs と同様の傾向を示し, 一過性の有意な減少または増加を示した後, ほぼ静止レベルまで回復した (図 16 B, C, 図 17 B, C)。

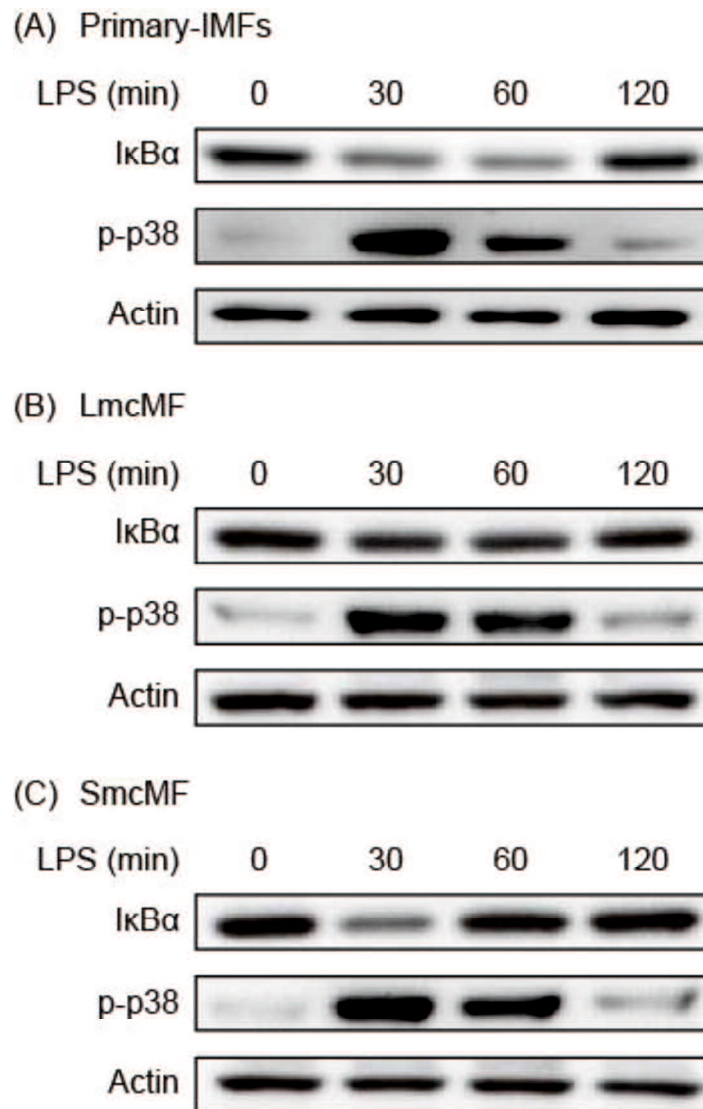
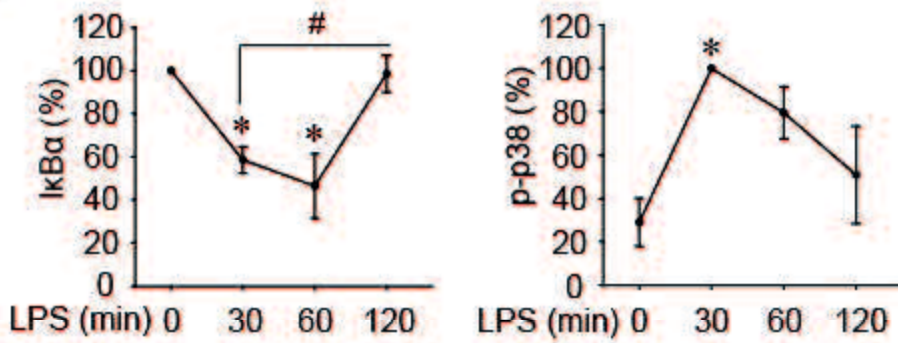


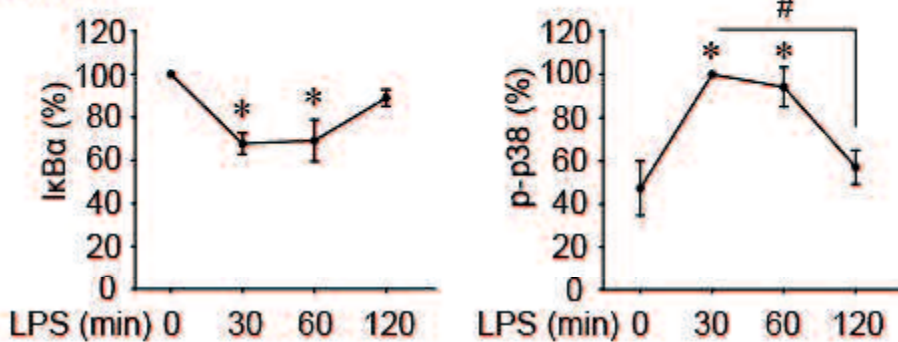
図 16 各種 IMFs における LPS 反応性

LPS (20 ng/ml) の 30, 60, 120 分処置による, Primary-IMFs (A), LmcMF (B) および SmcMF (C) における IκBα およびリン酸化 p38 MAPK (p-p38) の発現量の変化を western blotting 法により検討した。Actin はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例を示した。N=3~4。

(A) Primary-IMFs



(B) LmcMF



(C) SmcMF

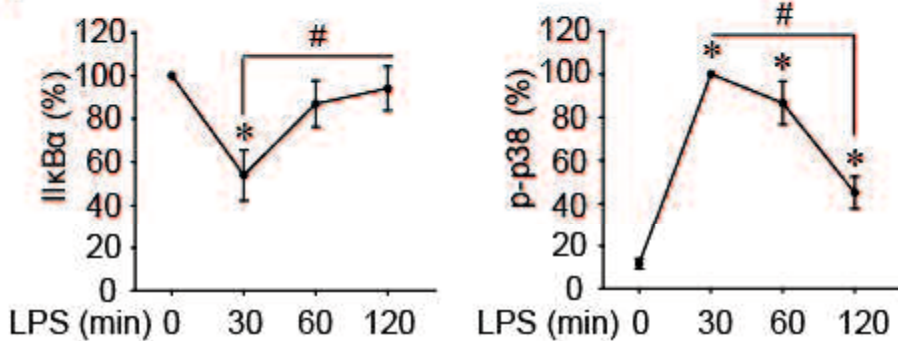


図 17 各種 IMFs における LPS 反応性タンパク質発現量の変化

LPS (20 ng/ml) の 30, 60, 120 分処置による Primary-IMFs (A), LmcMF (B) および SmcMF (C) における IκBα (左図) およびリン酸化 p38 MAPK (p-p38) (右図) の発現量を表す。IκBα は LPS 無処置群を, リン酸化 p38 MAPK は LPS 30 分処置群を 100% としてその相対値で数値化し, グラフ化した。N=3~4。* : $P < 0.05$ (LPS 無処置群との比較)。# : $P < 0.05$ (LPS 30 分処置群との比較)。

第3節 考察

3-3-1 細胞の不死化方法

哺乳類細胞の不死化には、ヒトパピローマウイルス 18 型や、テロメラーゼ逆転写酵素、SV40 ウイルスを用いる方法など、多くの手法が報告されており[74, 75]、本研究では広く一般に行われている SV40 による不死化方法を用いて実験を行った。SV40 は、large T 抗原 (LT) と small t 抗原 (ST) の 2 つの T 抗原を産生することにより細胞をがん化する。LT は腫瘍抑制因子である Rb と p53 に結合しその働きを抑制することで、ST は protein phosphatase 2A と結合しその働きを抑制することで細胞のがん化に寄与している[76, 77]。また、LT のみを導入した細胞はがん化せずに不死化することから[78]、ST が細胞のがん化に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、本研究では ST を発現せず、LT のみを発現するプラスミドを用いて IMFs を不死化することで、LmcMF を作製した。

真核生物の細胞寿命はあらかじめ決定されており、寿命を迎えた細胞は増殖することができなくなる。この寿命を決定する要因として、テロメアの存在が重要である。テロメアは DNA 末端の反復配列であり、DNA 複製とともに短縮し、ある程度の長さにまで短縮すると細胞は老化して増殖を停止する。そのため、テロメアの短縮は細胞の老化や死の原因と考えられている[79]。一方、生殖細胞やがん細胞では、テロメアを伸長する酵素であるテロメラーゼの活性が高く、細胞寿命の延長に大きく寄与している。そのため、テロメラーゼ活性がないヒトの正常体細胞は自然不死化を起こしにくく、テロメラーゼ活性を持つマウス体細胞は自然不死化を起こしやすいと考えられている[79, 80]。実際、乳腺上皮細胞や肺上皮細胞などのマウス体細胞由来の自然不死化細胞株が作製され、

研究に用いられている[81, 82]。そこで本研究では、マウスより単離した Primary-IMFs の継代を繰り返し、増殖能を維持する細胞を選別していくことで、自然に不死化した IMFs である SmcMF の作製を試み、成功した。

3-3-2 LmcMF および SmcMF の表現型

消化管の粘膜固有層に存在する間葉系細胞には、IMFs 以外にも線維芽細胞や平滑筋細胞、血管周皮細胞など様々な種類の類似した性質を持つ細胞が存在する。これら間葉系細胞の中で、IMFs は線維芽細胞と平滑筋細胞の両細胞の特徴を併せ持つ特殊な細胞である[83]。IMFs を細胞生物学的に特徴づけるのが、紡錘形もしくは星状型である形態的特徴と、 α -SMA および vimentin 陽性、desmin 陰性（または弱陽性）として確認されるマーカータンパク質の発現様式である[12]。

本研究において、LmcMF および SmcMF はどちらも紡錘形であり、線維芽細胞の MEF とは異なり、Primary-IMFs と同様の形態を示すことが確認された（図 8）。また、LmcMF は α -SMA および vimentin 陽性、desmin 陰性、SmcMF は α -SMA および vimentin 陽性、desmin 弱陽性であり、これらのタンパク質の発現様式も IMFs の特徴を満たしており、LmcMF および SmcMF は IMFs から発生した株化細胞であることが示唆された。

しかし、SmcMF における α -SMA の発現は Primary-IMFs や LmcMF における発現より低く、vimentin の発現はこれらの細胞よりも高いことが確認された（図 9 A-D）。筋線維芽細胞は線維芽細胞から分化して発生することが知られており[13, 14, 84]、SmcMF におけるマーカー発現は、この細胞株が Primary-IMFs や LmcMF と分化段階がやや異なる可能性を示唆している。また、IMFs に類似した間質系細胞として知られる血管周皮細胞は、 α -SMA、vimentin および desmin

陽性であることから[12, 85], 本研究において樹立した LmcMF は血管周皮細胞ではないと考えられる。しかし, SmcMF は desmin 弱陽性であり, 血管周皮細胞との鑑別には, その発現量を血管周皮細胞と詳細に比較する必要がある。細胞外基質と細胞の結合を担う fibronectin の一種である EDA-fibronectin の発現は, 筋線維芽細胞への分化に必須であることが示唆されており[86-88], 今後, SmcMF における EDA-fibronectin 発現を検討することで血管周皮細胞との完全な区別ができる可能性がある。

一般に, 細胞内におけるアクチンタンパク質は, 球状のアクチン分子が分散して存在する単量体状態 (G-アクチン) と, G-アクチンが重合した細長いフィラメント状態 (F-アクチン) の 2 つの形態を取る。今回行った免疫細胞化学的検討では, Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF における vimentin の発現様式には大きな違いは見られなかったのに対し, α -SMA においては, Primary-IMFs および LmcMF ではフィラメント状に, SmcMF では細胞質全体に均一に観察された (図 10)。これらの結果から, SmcMF の細胞内アクチンは Primary-IMFs や LmcMF と異なる状態にある可能性が示唆された。F-アクチンは細胞の安定性や接着性, 遊走に関与していることが知られており[89], LmcMF と SmcMF は細胞接着や遊走実験において適切に使い分ける必要があると考えられる。

LmcMF や SmcMF において I 型コラーゲンの発現は認められたが, Primary-IMFs に比べるとその発現量は少なかった (図 11)。一般に, I 型コラーゲンの産生は線維芽細胞より IMFs で多く, IBD 患者の消化管では, 線維芽細胞から IMFs への分化が誘導され, I 型コラーゲンの産生が増加していることが知られている [68, 83, 90]。LmcMF および SmcMF において, I 型コラーゲンの発現量が少なかったことは, これらの細胞の分化段階が Primary-IMFs と異なる可能性を示唆する。本研究では, I 型コラーゲンの発現量の違いと分化段階の違いの因果関係を

明らかにしておらず、今後さらなる検討が必要である。

以上より、LmcMF および SmcMF は、細胞形態学的に Primary-IMFs と類似しており、筋線維芽細胞マーカータンパク質の発現パターンも Primary-IMFs と一致していることから、本実験において分化段階の異なる 2 種類の IMFs の株化細胞が樹立できたとと言える。

3-3-3 LmcMF および SmcMF の増殖能および接触阻止能

株化細胞には、Eph4 のようにがん化せずに不死化した細胞株と[91]、HeLa 細胞のようながん化している細胞株がある。一般的に、がん化せずに不死化した細胞は、初代培養細胞と類似した細胞生物学的特徴を有するが、がん化した細胞は正常細胞とは異なる性質を持つようになる[92]。そのため、正常細胞の細胞生物学的研究にはがん化していない不死化細胞株が必要となる。

がん化した細胞は、細胞形態の変化、足場非依存性増殖や接触阻止能の欠如など、正常細胞と異なる様々な特徴を示す[93]。特に接触阻止能の欠如は、がん細胞が組織内で増殖し続けるために必要な能力であり、がん細胞を特徴づける。そこで、本研究では接触阻止能の有無をがん化の指標として検討した。

LmcMF および SmcMF は、20 継代以上にわたる増殖能を獲得しているが（図 12）、細胞密度の増加によって増殖能が低下する接触阻止能を維持していたことから（図 13）、これらの細胞株はがん化せずに不死化していることが示唆された。また、LmcMF と SmcMF の増殖速度は Primary-IMFs より速く、これまで IMFs を用いた研究の問題点とされていた、細胞寿命の短さと増殖速度の遅さをどちらも解決する細胞株であることが明らかとなった。

3-3-4 LmcMF および SmcMF における LPS の作用

IMFs は T 細胞の活性や増殖を制御することで、局所免疫応答において重要な役割を担っている[94, 95]。また LPS は、IMFs において炎症反応を惹起することで IBD の病態に関与するなど、消化管炎症において重要な因子と考えられている[16]。そこで、Primary-IMFs における LPS の反応性を、LmcMF や SmcMF における LPS の反応性と比較し検討することで、これら細胞株の研究への有用性を検討した。

MD2 は、LPS 受容体の本体である TLR4 の細胞外ドメインに結合しており、LPS シグナル伝達に必須の因子である[96]。また、CD14 は LPS を TLR4 へ誘導することで、そのシグナル伝達を増強する因子である (図 14) [71]。LmcMF および SmcMF において、TLR4, CD14 および MD2 の発現はすべて認められたが、TLR4 の発現量において Primary-IMFs との間に大きな差が認められた (図 15)。Primary-IMFs における TLR4 の発現量は、LmcMF および SmcMF より著しく少なかったが、Walton らによる報告と同様に LPS 投与による I κ B α の分解と p38 MAPK のリン酸化が観察され[16]、LmcMF および SmcMF においても Primary-IMFs と同様の LPS 反応性を有することが示された (図 16, 17)。これらの結果より、Primary-IMFs は少なくとも LPS に反応するのに十分量の TLR4 を発現していることが示唆された。TLR4 受容体は LPS の曝露によりダウンレギュレーションすることから[97]、Primary-IMFs においては、生体内もしくは単離作業中に曝露された LPS により TLR4 がダウンレギュレーションし、LmcMF および SmcMF では継代を繰り返すことでダウンレギュレーションが解除され、TLR4 の発現量が増加した可能性が考えられる。

本研究で作製した Primary-IMFs と LmcMF および SmcMF では、LPS 受容体関連タンパク質の発現量に違いが認められたが、Primary-IMFs 同様の LPS 反応性

が観察されたことから、LPS 反応性には LPS 受容体関連タンパク質の発現量の差は影響を与えないことが明らかとなり、LPS を用いた免疫応答系の研究には LmcMF と SmcMF が有用であると考えられる。

3-3-5 結論

本研究では、Primary-IMFs より LmcMF と SmcMF という 2 種類のがん化せずに不死化したマウス株化 IMFs を樹立することに成功した。これらの細胞株では、LPS 受容体関連タンパク質の発現量において Primary-IMFs と若干異なる傾向が認められたが、LPS に対して同様の反応性を有し、IMFs 研究における有用性が示された。さらに、LmcMF と SmcMF は Primary-IMFs に比べて非常に速い増殖能を有するため、研究の効率化に寄与することで IMFs 研究を発展させることが期待される。

IMFs は、他の間質細胞と細胞生物学的な特徴が類似しているため、IMFs の生体内における働きを研究していく上で、その特異的マーカーが発見されていないことが大きな障壁となっている。今後は、本研究で樹立した細胞株を用いて、他の間質系細胞と遺伝子発現やタンパク質発現を網羅的に比較検討することで、IMFs に特異的なマーカーを発見し、生体内における IMFs の働きを明らかにする一助となることが期待される。

第4章 大腸癌における sphingosine-1-phosphate を介した上皮細胞

—腸筋線維芽細胞間の相互作用の解明

第1節 背景および目的

4-1-1 Sphingosine-1-phosphate

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は、生体膜を構成する sphingolipid の代謝産物である sphingosine が sphingosine kinase (SphK) によりリン酸化されて産生される生理活性物質である[98]。S1P は、G タンパク質共役型受容体である S1PR1~5 を介して、オートクラインおよびパラクライン様式で細胞の増殖や遊走、分化など様々な生命現象に関与している[99]。一方、SphK には SphK1 と SphK2 の2つのアイソフォームが存在し、SphK1 は大腸癌を含む各種のがんでその発現の上昇が報告されており、S1P の産生を介して腫瘍の悪性化に関与していると考えられている[98, 100, 101]。また肝線維症においては、S1P が肝筋線維芽細胞の分化や遊走を促進することでその病態に大きく関与していることが報告されていることから[102]、大腸癌においても S1P を介した腸筋線維芽細胞の制御がその病態に関与している可能性が考えられる。実際、S1P が腸筋線維芽細胞に作用して Cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現上昇を介してがん悪性化因子である Prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生を誘導することが報告されており[103]、S1P を介した大腸癌細胞—腸筋線維芽細胞間の相互作用が大腸癌の悪性化に寄与していると考えられる。一方、がん細胞が産生した S1P が腸筋線維芽細胞の増殖や遊走に与える影響については明らかになっていない。

4-1-2 本研究の目的

これまでに大腸癌における S1P および IMFs の重要性は示されている。また、S1P が IMFs の機能に作用していることも報告されている。しかし、大腸癌細胞が産生する S1P が IMFs に与える影響や、反対に、S1P に暴露された IMFs ががん細胞に与える影響など、大腸癌細胞と IMFs の S1P を介した相互作用については未解明な点が多い。そこで本研究は、大腸癌における S1P を介した上皮細胞—腸筋線維芽細胞間の相互作用を解明することを目的に研究を行った。

第2節 実験結果

4-2-1 IMFの遊走および増殖に対するS1Pの作用

はじめに、S1PがIMFの遊走および増殖に与える影響を検討した。

Wound healing assayによりIMFの遊走能を検討したところ、S1PはIMFの遊走を濃度依存的に抑制した(図18A)。さらに、Boyden chamber assayにおいても、S1PはIMFの遊走を抑制した(図18B)。一方、CCK-8を用いて増殖率を検討したところ、S1PはIMFの増殖に影響を与えなかった(図18C)。

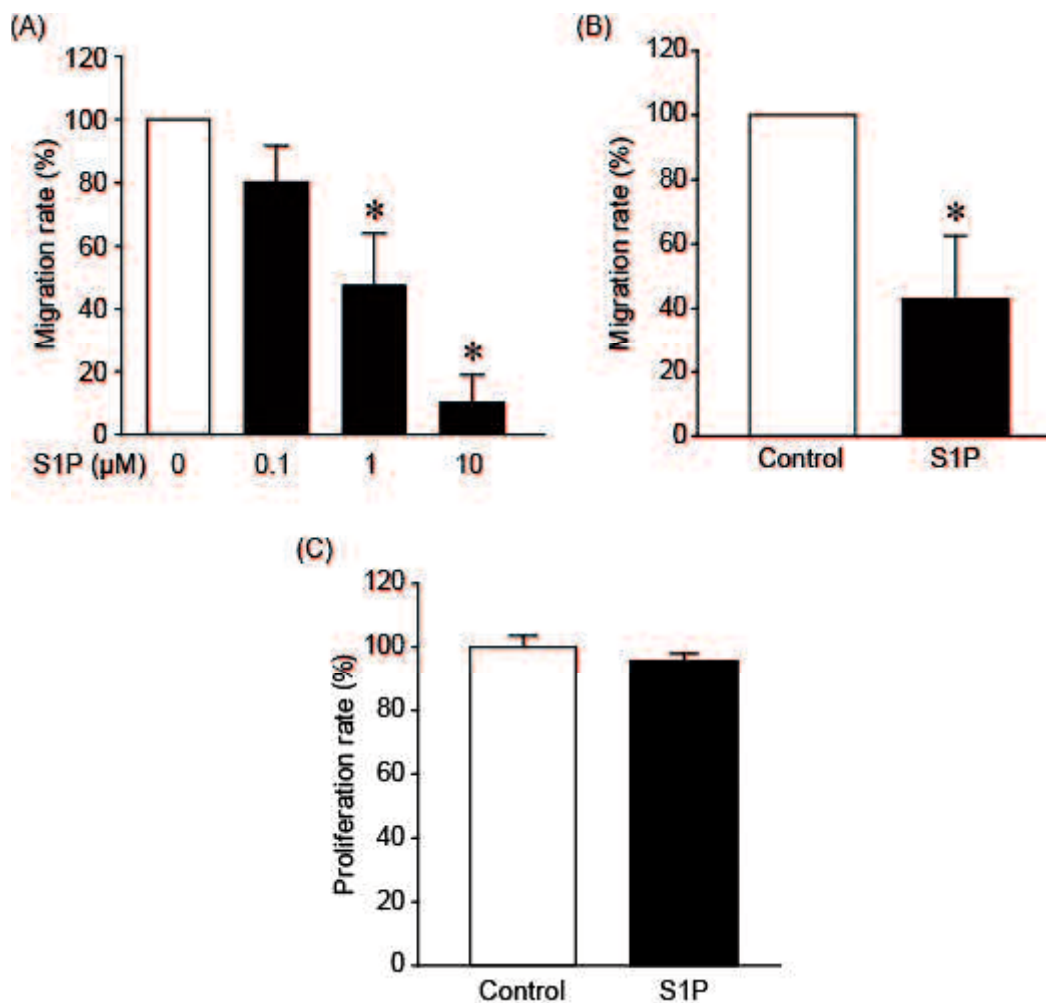


図 18 IMF の遊走および増殖に対する S1P の作用

S1P (0.1, 1, 10 μM : A, 1 μM : B, C) 処置による IMF の遊走率 (A, B) および増殖率 (C) の変化。遊走率は wound healing assay (A) (N=3~6) および Boyden chamber assay (B) (N=4) により、増殖率は CCK-8 を用いて (C) (N=6, in duplicate) 検討した。遊走率および増殖率は S1P 無処置群を 100% としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (S1P 無処置群との比較)。

4-2-2 LmcMF および SmcMF の遊走に対する S1P の作用

S1P が IMFs の遊走を濃度依存的に抑制することが明らかになったため、その詳細な機構を検討するにあたり、研究を効率化するために、先の研究において樹立した株化 IMFs である LmcMF および SmcMF を用いて、遊走における S1P 反応性を wound healing assay により検討した。

その結果、LmcMF および SmcMF はどちらも 1 μ M S1P 処置で遊走促進傾向が、10 μ M S1P 処置では逆に遊走抑制傾向が観察された（図 19 A, B）。

このように S1P 反応性については、Primary-IMFs と LmcMF および SmcMF において違いが認められたため、以降の実験は Primary-IMFs を用いて行った。

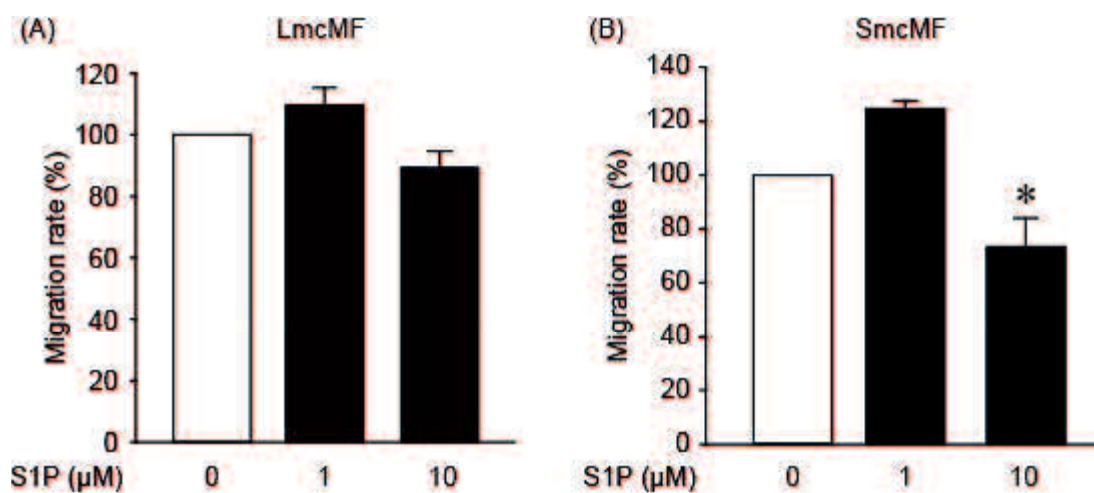


図 19 LmcMF および SmcMF の遊走に対する S1P の作用

S1P (1, 10 μM) 処置による, LmcMF (A) (N=12, in duplicate) および SmcMF (B) (N=4, in duplicate) の遊走率の変化を wound healing assay により検討した。遊走率は各細胞における S1P 無処置群を 100 %としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (S1P 無処置群との比較)。

4-2-3 S1P による IMF_s の遊走抑制に対する各 S1P 受容体阻害剤の作用

以前の研究において、マウス Primary-IMF_s は、S1P に対する受容体として S1PR1~3 を発現することが報告されている[103]。そこで、各 S1P 受容体の IMF_s 遊走抑制への関与を、各種受容体阻害剤を用いて検討した。

S1PR2 特異的阻害剤である JTE-013 の前処置により、S1P による IMF_s の遊走抑制作用が阻害された (図 20)。一方、S1PR1 特異的阻害剤である W146 および S1PR3 特異的阻害剤である CAY10444 の前処置は、S1P による IMF_s の遊走抑制作用に影響を与えなかった。

以上の結果から、S1P は S1PR2 を介して IMF_s の遊走を抑制することが明らかになった。

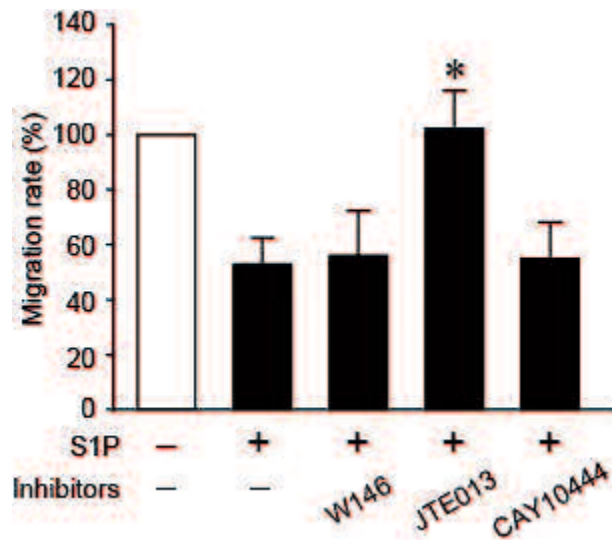


図 20 S1P による IMFs の遊走抑制に対する各 S1P 受容体阻害剤の作用

S1P (1 μ M) 処置による IMFs の遊走抑制に対する W146 (5 μ M), JTE-013 (1 μ M), および CAY10444 (1 μ M) の作用を wound healing assay により検討した。各 S1P 受容体阻害剤は 30 分間前処置した。遊走率は S1P 無処置群を 100%としてその相対値で示した (N=3~4)。* : $P < 0.05$ (S1P 単独処置群との比較)。

4-2-4 S1P による IMFs 遊走抑制への Rac1 および ROCK の関与

様々な細胞において、S1P による遊走制御には低分子量 GTPase の一種である Rac1 および RhoA が関与していることが知られている[99]。そこで、S1P の IMFs 遊走抑制機構における Rac1 および RhoA の関与を検討した。

Rac1 阻害剤の Rac1 inhibitor II により、IMFs の遊走は S1P と同程度に抑制された (図 21 A)。一方、RhoA の下流のエフェクター分子である ROCK の阻害剤である Y27632 は、単独では IMFs の遊走に影響を与えなかったが、S1P による IMFs の遊走抑制を阻害した (図 21 B)。さらに、S1P により Rac1 の活性が抑制されたが、Y27632 により Rac1 活性抑制が阻害された (図 21 C)。以上の結果より、S1P は ROCK 活性依存的に Rac1 を抑制することで IMFs の遊走を抑制することが示唆された。

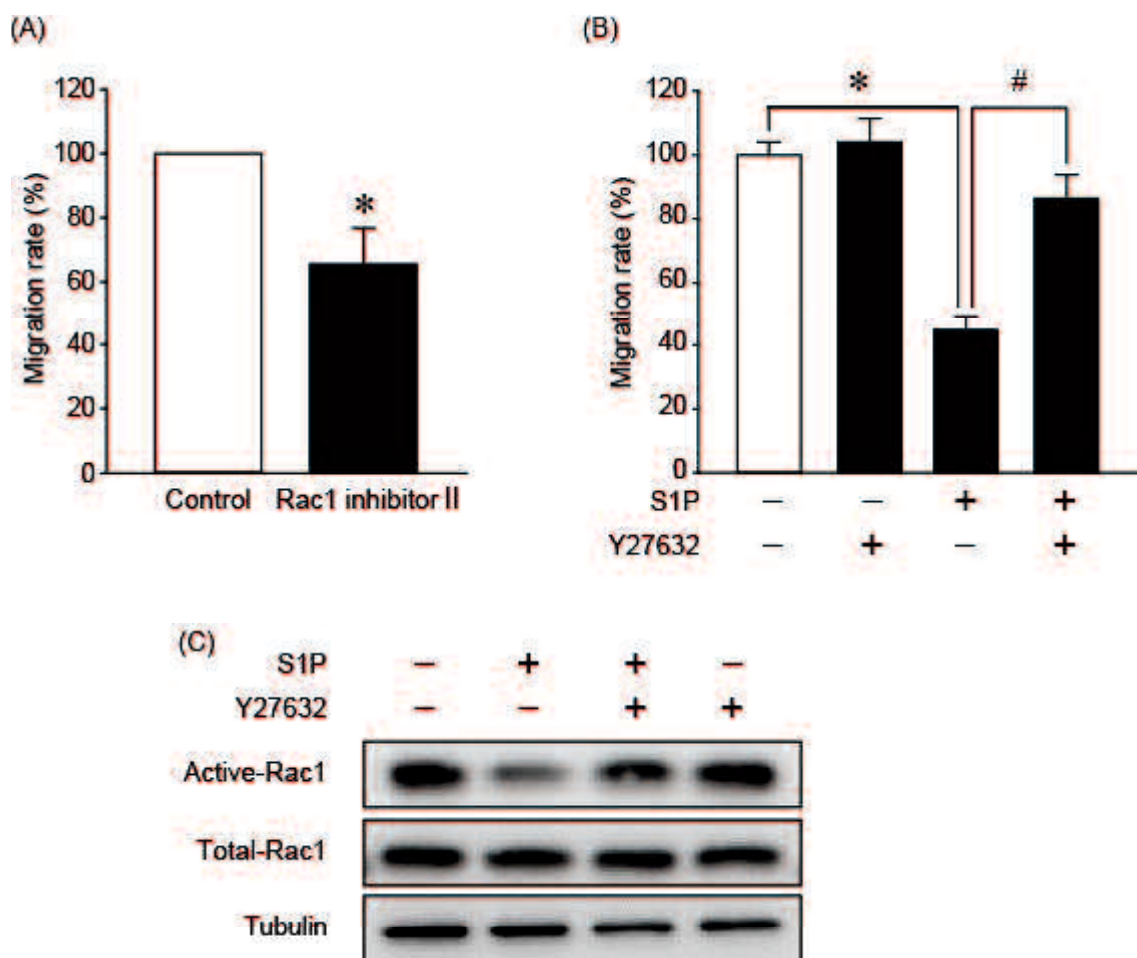


図 21 S1P による IMFs の遊走抑制に対する Rac1 および ROCK の関与

(A) Rac1 inhibitor II (25 μM) 処置による IMFs の遊走率の変化 (N=6) および (B) S1P (1 μM) 処置による IMFs の遊走抑制に対する Y27632 (1 μM : 30 分間前処置) の作用 (N=12~16, in duplicate) を wound healing assay により検討した。遊走率は S1P 無処置群を 100 %としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (S1P 無処置群との比較)。# : $P < 0.05$ (S1P 単独処置群との比較)。(C) S1P (1 μM : 15 分間) 処置および Y27632 (1 μM : 6 時間前処置) による Rac1 活性の変化を western blotting 法により検討した。Tubulin はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。N=2。

4-2-5 SphK1 過剰発現が aMoC1 の増殖および遊走に与える影響

S1P 産生酵素の SphK1 は、大腸癌細胞において発現が上昇していることが知られている[98, 104]。そこで本研究では、上皮細胞における SphK1 発現の上昇が大腸癌の悪性化に与える影響を検討するため、上皮細胞における SphK1 発現が上皮細胞自身および IMFs に与える影響を検討した。

SphK1 発現の上昇が上皮細胞自身に与える影響を検討するため、マウス結腸上皮細胞株である aMoC1 を用いて、SphK1 過剰発現 aMoC1 (SphK1-aMoC1) を作製した (図 22 A)。この細胞を用いて、SphK1 過剰発現が aMoC1 の増殖および遊走に与える影響を検討したところ、SphK1-aMoC1 ではどちらも有意に促進された (図 22 B, C)。一方、外的に投与した S1P は aMoC1 の増殖および遊走には影響を与えなかった (図 22 D, E)。

SphK1 発現による aMoC1 の増殖および遊走の促進に対する S1P 受容体の関与を明らかにするため、SphK1-aMoC1 における S1P 受容体発現量の変化をリアルタイム PCR により検討した。その結果、SphK1 過剰発現により、S1PR1 の発現量が増加傾向にあったものの、S1PR1~S1PR3 のいずれの受容体も発現量に有意な変化は認められなかった (図 22 F~H)。

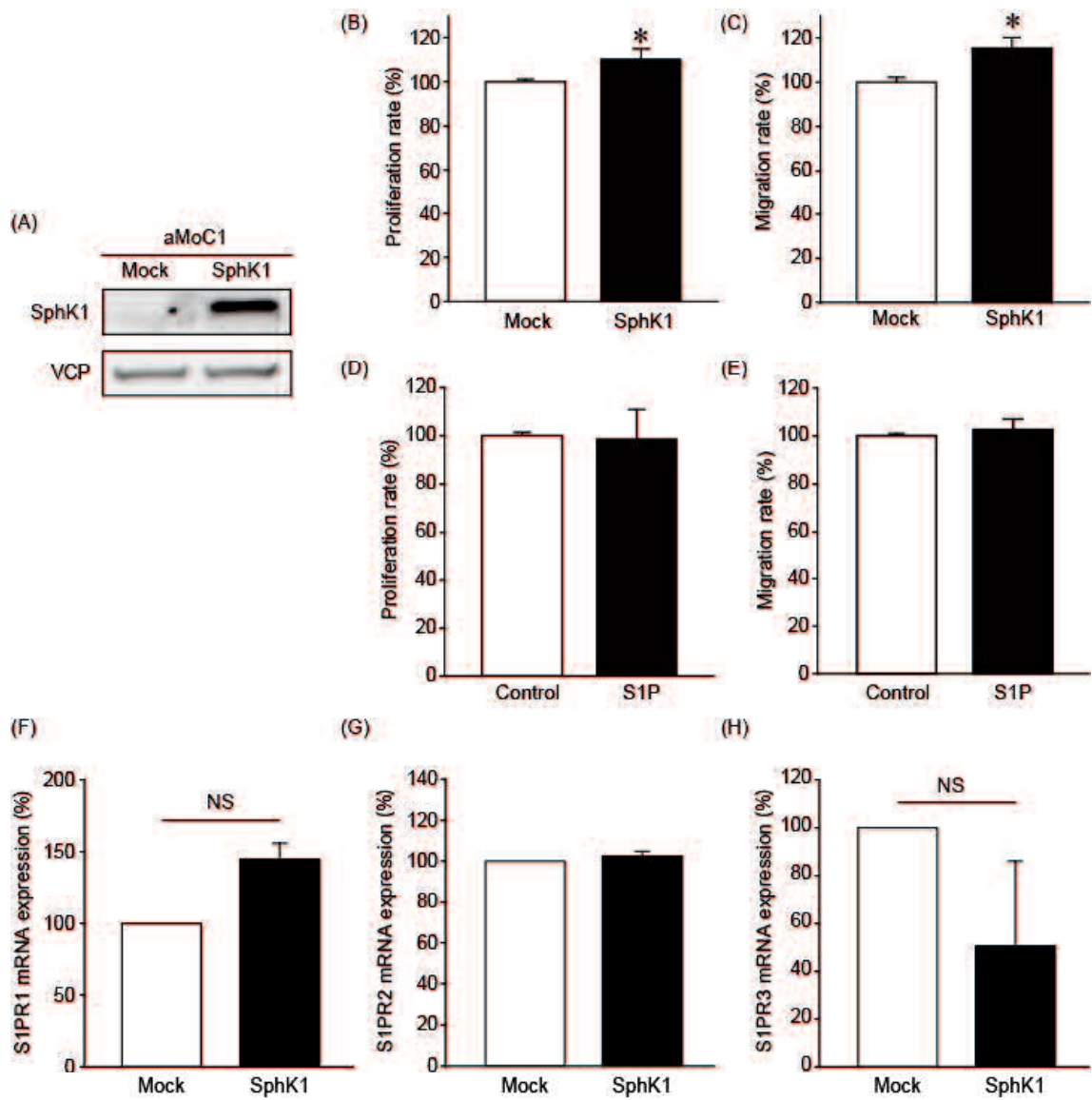


図 22 SphK1 過剰発現が aMoC1 の増殖および遊走に与える影響

(A) コントロールベクタープラスミド (Mock) または SphK1 過剰発現プラスミド (SphK1) を導入した aMoC1 における SphK1 の発現を, western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。N=3。(B, C) SphK1 過剰発現による aMoC1 の増殖率 (B) (N=22, in duplicate) および遊走率 (C) (N=24, in duplicate) の変化。(D, E) S1P (1 μ M) 処置による aMoC1 の増殖率 (D) (N=14, in duplicate) および S1P (1 μ M) 処置による遊走率 (E) (N=14, in duplicate) の変化。増殖率は CCK-8 を用いて, 遊走率は wound healing assay で検討した。(F~H) SphK1 過剰発現による aMoC1 の S1PR1 (F), S1PR2 (G) および S1PR3 (H) mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR により検討した (N=5)。Mock および S1P 無処置群を 100% としてその相対値で示した。*: $P < 0.05$ (Mock との比較)。NS : non significant。

4-2-6 SphK1 過剰発現が aMoC1 の上皮細胞マーカーに与える影響

がん細胞は、間葉系細胞の形質を獲得することで高い遊走能を獲得し、浸潤・転移すると考えられており、この現象を上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition ; EMT) という[105]。また、EMT を起こした細胞は、上皮細胞として維持していた極性や細胞間接着を失い遊走性が増加することが知られている[106]。今回、SphK1 の過剰発現により aMoC1 の遊走が促進されたことから、SphK1-aMoC1 を用いて、上皮細胞の接着結合を構成するタンパク質である E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現量および局在の変化を確認し、SphK1 の過剰発現が aMoC1 において EMT を引き起こしている可能性を検討した。

Western blotting によりこれらのタンパク質発現量を検討したところ、SphK1-aMoC1 において変化は認められなかった (図 23 A)。また、免疫染色法による E-cadherin および β -catenin の局在検討においても影響は認められなかった (図 23 B)。

以上の結果から、SphK1 の過剰発現は上皮細胞やがん細胞で見られる EMT には関与しないことが示唆された。

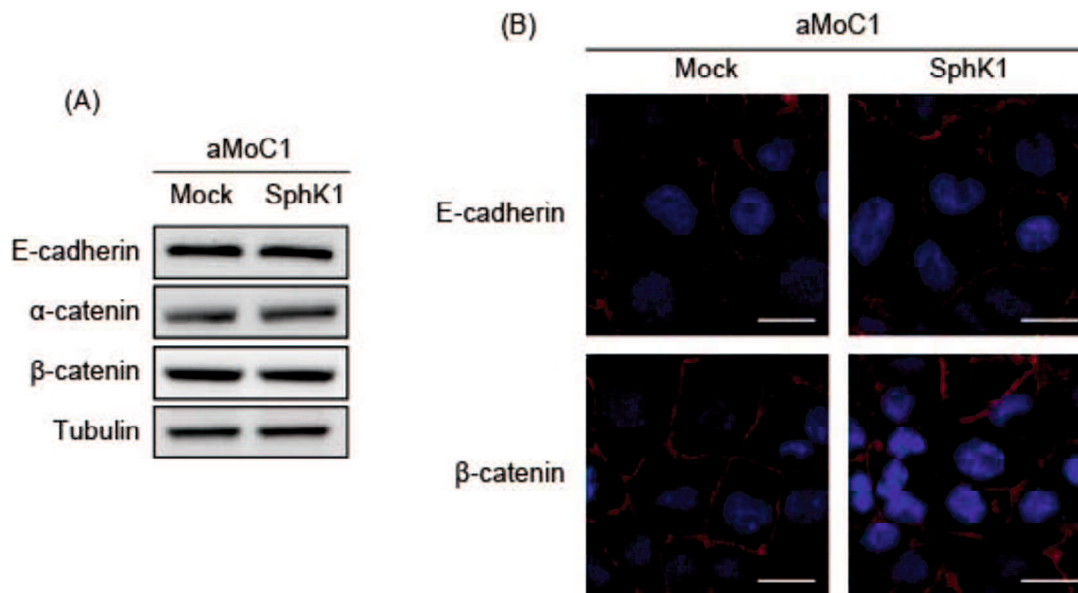


図 23 SphK1 過剰発現が aMoC1 の上皮細胞マーカーに与える影響

(A, B) Mock-aMoC1 および SphK1-aMoC1 における上皮細胞マーカー (E-cadherin, α -catenin および β -catenin) の発現量を western blotting 法により (A), E-cadherin および β -catenin の局在を免疫染色法により (B) 検討した。Tubulin はローディングコントロールとして用いた。青は核を示す。スケールバーは 20 μ m を示す。典型的なデータの一部を示した。N=3 (A)。N=2 (B)。

4-2-7 IMF_s の増殖および遊走に対する SphK1-aMoC1 培養上清の作用

次に、SphK1 を発現した上皮細胞が IMF_s に与える影響を明らかにするため、SphK1-aMoC1 培養上清が IMF_s の増殖および遊走に与える影響について検討した。

CCK-8 を用いて増殖率を検討したところ、SphK1-aMoC1 の培養上清は IMF_s の増殖に影響を与えなかった (図 24 A)。一方、wound healing assay により IMF_s の遊走能を検討したところ、SphK1-aMoC1 の培養上清は IMF_s の遊走を抑制し、さらに、その遊走抑制作用は JTE-013 により阻害された (図 24 B)。

以上の結果から、SphK1 発現細胞は S1P を産生することで S1PR2 を介して IMF_s の遊走を抑制することが示唆された。

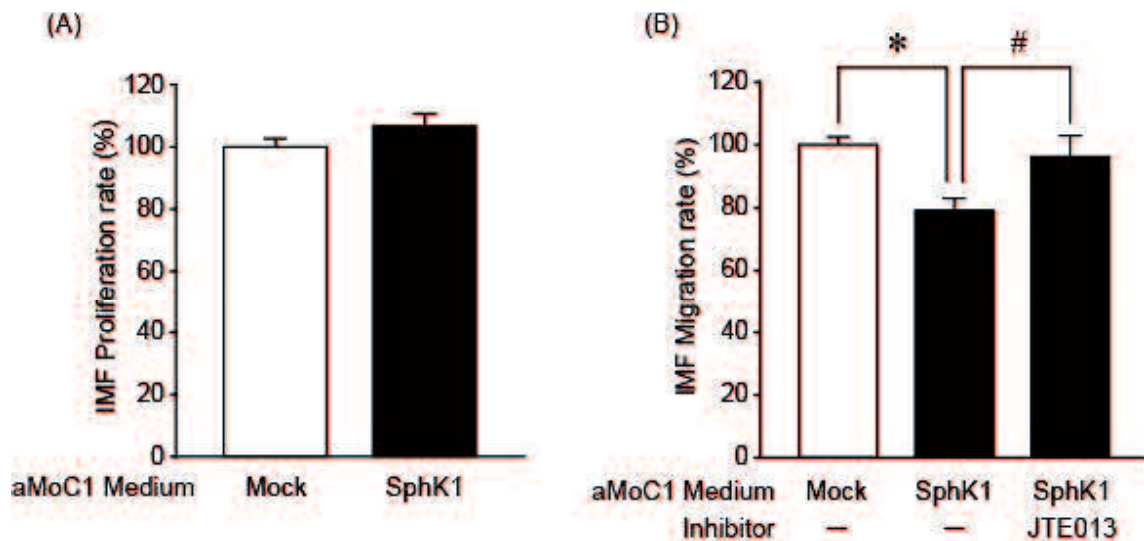


図 24 IMF の増殖および遊走に対する SphK1-aMoC1 培養上清の作用

(A) SphK1-aMoC1 培養上清 (SphK1) 処置による IMF の増殖率の変化。増殖率は CCK-8 を用いて検討した。N=12, in duplicate。 (B) SphK1-aMoC1 培養上清 (SphK1) 処置および JTE-013 (1 μ M : 30 分間前処置) による IMF の遊走率の変化。N=14~26, in duplicate。遊走率は wound healing assay により検討した。増殖率および遊走率は Mock-aMoC1 培養上清 (Mock) 処置を 100 % としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (Mock 処置群との比較)。# : $P < 0.05$ (SphK1 単独処置群との比較)。

4-2-8 IMF_s 培養上清が aMoC1 および SphK1-aMoC1 の増殖および遊走に与える影響

IMFs は様々な分泌性因子を介して、正常上皮細胞やがん細胞などの上皮性細胞の表現型に影響を与えることが知られている[107, 108]。一方、正常組織とがん組織では、IMFs が上皮性細胞に与える影響は異なると考えられている[107]。上皮性細胞はがん化に伴いサイトカイン感受性が変化すること[109]、一方、IMFs はがん細胞からの働きかけによりサイトカイン産生能を変化させることが示唆されており[110]、このような上皮側の変化と IMF_s 側の変化が合わさることで、適切ながん細胞-IMFs 相互作用が作り上げられていると考えられる。

そこで、IMFs が上皮細胞に与える影響が、上皮細胞の SphK1 発現亢進により変化するか、また、IMFs への S1P 処置により変化するかを明らかにするため、IMFs および S1P 処置 IMF_s (S1P-IMFs) の培養上清が aMoC1 および SphK1-aMoC1 の増殖および遊走に与える影響を検討した。

CCK-8 を用いて増殖率を検討したところ、IMFs の培養上清は SphK1 発現に関わらず aMoC1 の増殖を抑制した (図 25 A, B)。また、IMFs と S1P-IMFs の培養上清による影響に違いは認められなかった。さらに、wound healing assay により遊走能を検討したところ、IMFs の培養上清は SphK1 発現に関わらず aMoC1 の遊走を促進した (図 25 C, D)。また、aMoC1 の遊走に関しても、IMFs と S1P-IMFs の培養上清による影響に違いは認められなかった。

以上の結果から、IMFs は S1P 処置および上皮細胞の SphK1 の発現の有無に関わらず、上皮性細胞の増殖および遊走を制御することが明らかになった。

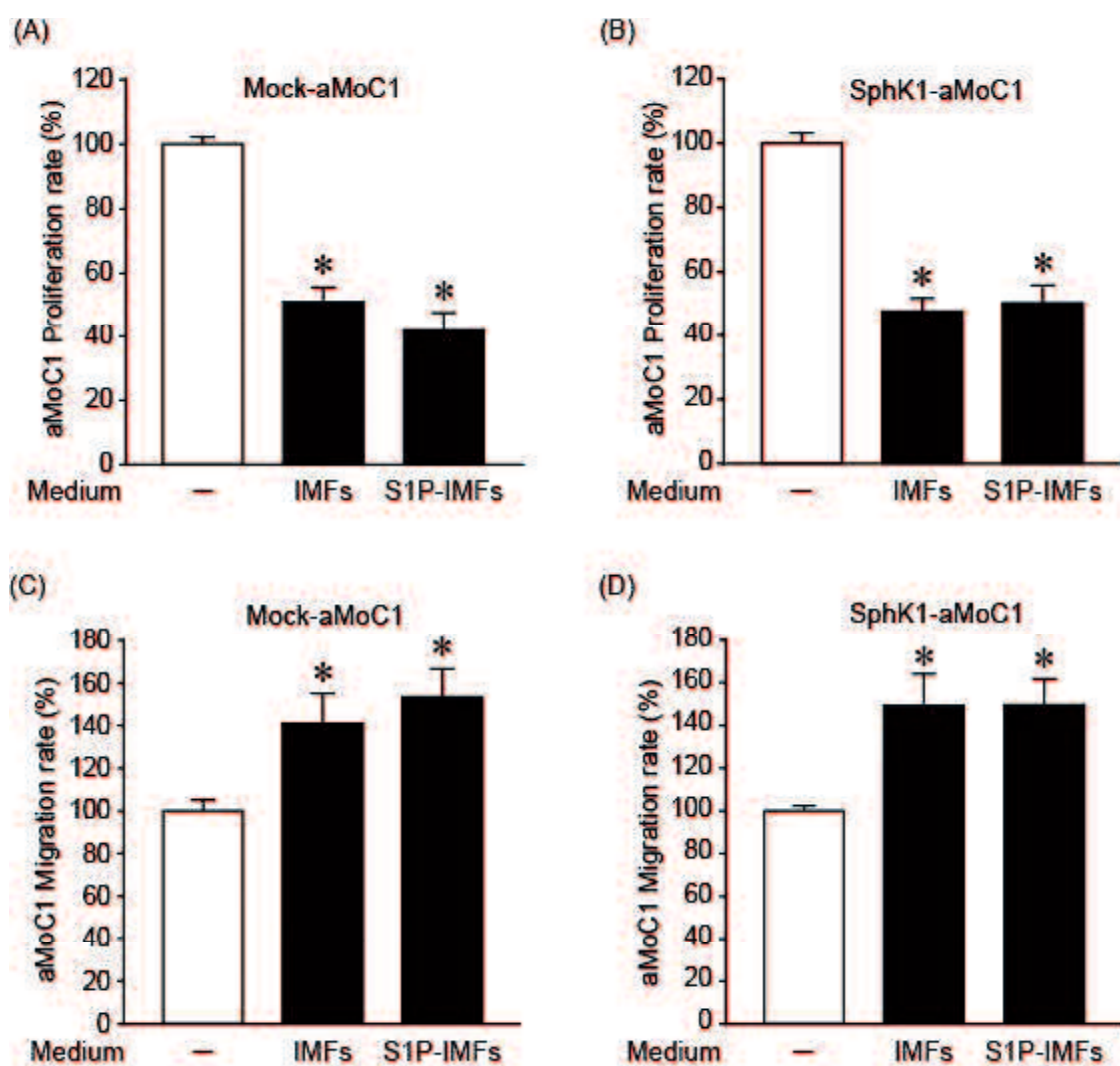


図 25 IMF 培養上清が aMoC1 および SphK1-aMoC1 の増殖および遊走に与える影響

(A, B) IMF 培養上清 (IMFs) および S1P 処置 IMF 培養上清 (S1P-IMFs) による, Mock-aMoC1 (A) および SphK1-aMoC1 (B) の増殖率の変化。N=6, in duplicate。 (C, D) IMF および S1P-IMFs による, Mock-aMoC1 (C) および SphK1-aMoC1 (D) の遊走率の変化。N=6, in duplicate。増殖率は CCK-8 を用いて, 遊走率は wound healing assay で検討した。増殖率および遊走率は培養上清無処置群を 100% としてその相対値で示した。*: $P < 0.05$ (培養上清無処置群との比較)。

4-2-9 S1P がヒト大腸癌組織由来 IMF_s の遊走に与える影響の検討

ここまでの結果で、S1P が IMF_s の遊走を抑制することでがんの病態に関与している可能性が示唆された。そこで、ヒトの病態においても同様の現象が起きていることを確認するため、S1P がヒト大腸癌組織由来 IMF_s (hccIMF_s) の遊走に与える影響を検討した。

4-2-9-1 hccIMF_s の単離

はじめに、ヒト大腸癌組織を用いて、筋線維芽細胞の分布を免疫染色法により検討したところ、筋線維芽細胞マーカーの一つである α -SMA 陽性を示す細胞が大腸癌組織の間質部に存在していることが確認された (図 26 A)。がん微小環境中に存在する α -SMA 陽性細胞としては、筋線維芽細胞以外に血管平滑筋細胞である可能性が考えられるが[10]、今回観察された α -SMA 陽性細胞は血管様構造を形成していなかった。さらに、ヒト大腸癌組織より単離した細胞は、線維芽細胞特有の紡錘形を示すとともに (図 26 B)、筋線維芽細胞の特徴的なマーカー発現パターンである α -SMA および vimentin 陽性を示したことから (図 26 C)、大腸癌組織で観察された α -SMA 陽性細胞および単離された細胞は hccIMF_s であると考えられる。なお、単離 hccIMF_s は、上皮性細胞マーカーである E-cadherin 陰性を示しており、がん細胞などの上皮性細胞の混入が無いことが示された。

以上の結果から、ヒト大腸癌組織より hccIMF_s を単離することに成功した。

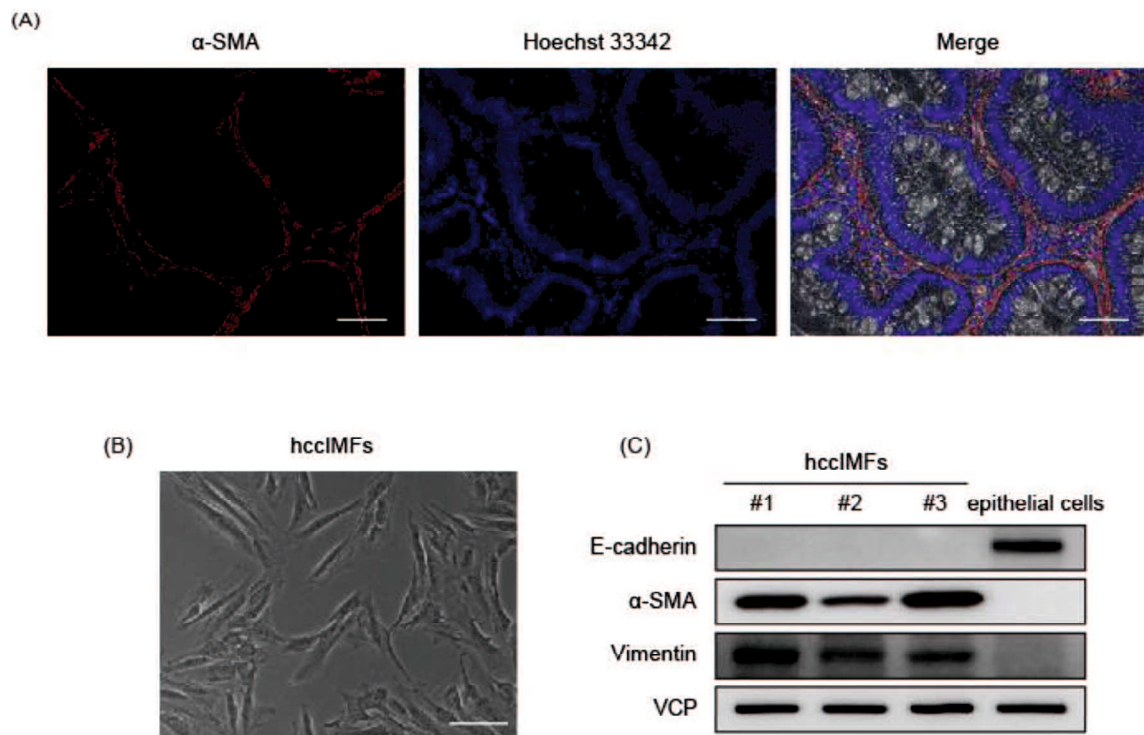


図 26 ヒト大腸癌組織由来 IMFs の単離

(A) ヒト大腸癌組織における α -SMA (赤) 陽性細胞を免疫染色法により検討した。Hoechst33342 (青) は核を示す。Merge は位相差顕微鏡像の重ね合わせ像を示す。スケールバーは 50 μ m を示す。典型的な画像の一例を示した。N=3。

(B) 単離したヒト大腸癌組織由来 IMFs (hccIMFs) の位相差顕微鏡像。スケールバーは 100 μ m を示す。典型的な画像の一例を示した。(C) hccIMFs における

筋線維芽細胞マーカー (α -SMA および vimentin) および上皮性細胞マーカー (E-cadherin) の発現を western blotting 法により検討した。3 人の大腸癌患者の組織より単離した hccIMFs を用いた (#1~#3)。マウス結腸上皮細胞 (epithelial cell) は上皮性細胞マーカーの陽性対照および筋線維芽細胞マーカーの陰性対照として用いた。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例を示した。N=3。

4-2-9-2 hccIMFs の遊走に対する S1P の作用

最後に、S1P が hccIMFs の遊走に与える影響を wound healing assay により検討した。

その結果、マウス IMFs における結果と同様に、S1P は hccIMFs の遊走を抑制した (図 27 A, C)。一方、3 検体中 1 検体の hccIMFs では、S1P により遊走が抑制されなかった (図 27 B)。

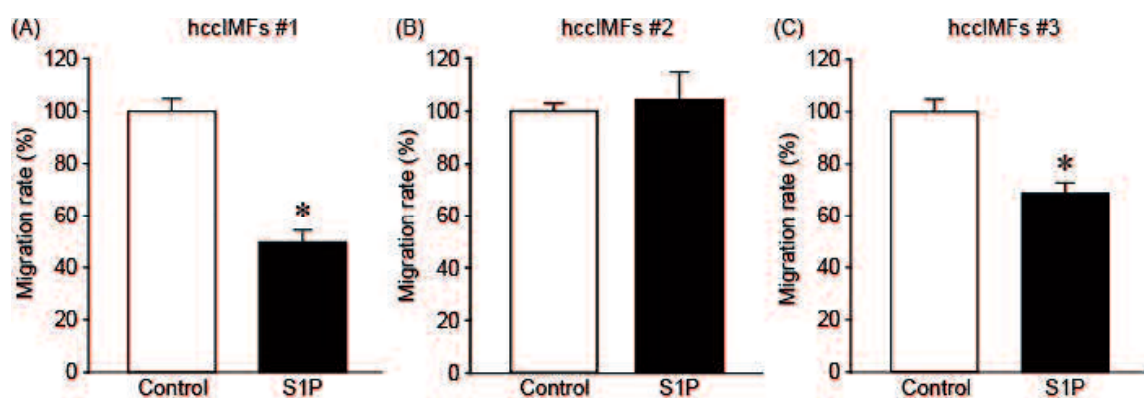


図 27 hccIMFs の遊走に対する S1P の作用

(A~C) S1P (1 μ M) 処置による hccIMFs の遊走率の変化。遊走率は wound healing assay により検討した。3 人の大腸癌患者の組織より単離した hccIMFs を用いた (#1~#3)。遊走率は S1P 無処置群を 100 % としてその相対値で示した。N=6, in duplicate。* : $P < 0.05$ (S1P 無処置群との比較)。

第3節 考察

4-3-1 Primary-IMFs, LmcMF および SmcMF における S1P の作用

本研究において、S1P は Primary-IMFs の遊走を濃度依存的に抑制したが（図 18）、LmcMF および SmcMF においては、低濃度 S1P（1 μ M）では遊走促進作用が、高濃度（10 μ M）では弱い遊走抑制作用が観察された（図 19）。S1P 受容体は S1PR1 および S1PR3 が遊走促進性に働き、S1PR2 が遊走抑制性に働くことから[99]、LmcMF および SmcMF では、Primary-IMFs と同様に S1PR2 は発現しているが、遊走促進に関与する S1PR1, 3 受容体の発現が高く、その拮抗作用により、高濃度 S1P によっても弱い遊走抑制作用しか観察されなかった可能性が考えられる。

今回、第3章の結果とは異なり Primary-IMFs と LmcMF および SmcMF における反応性に大きな差が認められたことから、S1P が IMFs に与える影響の検討にはこれらの不死化細胞株は用いることができないことが明らかになった。そこで、本研究では Primary-IMFs を用いて実験を行った。また、この結果は、LmcMF および SmcMF は Primary-IMFs を完全に代用できるものではなく、研究に用いる際には初めにその有用性を検討する必要性があることを示している。

4-3-2 S1P による IMFs 遊走抑制

S1P は、がんの進展において重要な伝達物質の役割を果たしていることが知られており、IMFs においては、S1P が PGE₂ 産生を誘導することが報告されている[103]。PGE₂ はがん幹細胞の増加や転移を促進することや[111]、消化管腫瘍において炎症性微小環境を作り上げることが知られており[112]、腫瘍の成長において重要な働きを担っている。しかし、S1P が IMFs の増殖や遊走、さらには上皮

細胞へのフィードバック機構に与える影響については明らかになっていない。

S1P は、肝細胞やケラチノサイトの増殖は抑制し、皮膚線維芽細胞の増殖は促進するなど、細胞種ごとに異なる影響を与えることが報告されている[113, 114]。本研究において、S1P は IMF_s の増殖には影響を与えなかったが、IMF_s の遊走を抑制した(図 18)。また各 S1P 受容体阻害剤を用いた検討により、S1P は S1PR2 を介して IMF_s の遊走を抑制していることが明らかになった(図 20)。IMF_s は S1PR1~3 を発現することが報告されており[103]、血管内皮細胞や膠芽腫細胞においても、S1P が S1PR2 を介して遊走を抑制するという、本研究の結果と一致する報告がなされている[115, 116]。一方、肝臓の筋線維芽細胞において、S1P は S1PR1, 3 を介して遊走を促進し、肝線維症に関与していることが報告されている[102]。このように、肝臓の筋線維芽細胞と IMF_s が異なる S1P 反応性を持つことから、筋線維芽細胞は組織により異なる表現型を示し、組織ごとに異なる働きを行う多様性に富む細胞であると考えられる。

本研究の結果は、SphK1 を発現する大腸癌細胞が、S1P を介して IMF_s の遊走を抑制し、自身の近傍に IMF_s をとどめ、がん微小環境として利用している可能性を示唆している。実際、大腸癌患者の癌組織より単離した hccIMF_s を用いた検討より、大腸癌組織に存在する IMF_s が S1P による遊走抑制を受けることが示唆された(図 27)。一方、3 検体中 1 検体の hccIMF_s において、S1P による遊走抑制作用が認められなかったが(図 27 B)、この原因としては、hccIMF_s における S1PR2 の発現量が異なる可能性が考えられる。また、S1P による遊走抑制作用が認められなかった hccIMF_s #2 は、他の 2 検体と比較して α -SMA の発現量が低かったことから(図 26 C)、筋線維芽細胞の分化度による違いが影響している可能性も考えられる。この点については更なる検討が必要であるが、患者ごとに、がん微小環境の構成や制御機構が異なる可能性が考えられる。

4-3-3 S1P による IMFs 遊走抑制に關与するシグナル伝達機構

Rac1, RhoA および cdc42 は Rho ファミリー低分子量 GTPase に属し, 細胞遊走において重要な働きを担っている。血管平滑筋細胞においては, S1P が S1PR2 を介して RhoA を活性化し Rac1 を抑制することで遊走を抑制することが報告されている[117]。さらに, RhoA は ROCK 依存的に細胞遊走を抑制することも報告されている[116]。

本研究において, Rac1 阻害剤により IMFs の遊走が阻害され, S1P による IMFs の遊走抑制は ROCK 阻害剤である Y27632 により阻害された (図 21)。また前述の通り, S1P は S1PR2 を介して遊走を抑制していた。これらの結果から, S1P が S1PR2 を介して RhoA を活性化し, Rac1 を抑制することで IMFs の遊走を抑制することが示唆された。一方, ROCK の活性化が IMFs の遊走抑制に關与していることから, 反対に ROCK の抑制は細胞遊走を促進すると予想されるが, Y27632 の単独処置は定常状態の IMFs の遊走には影響を与えなかった (図 21)。この結果は, 定常状態の IMFs では ROCK 活性が低く保たれていることを示唆しており, 定常状態の IMFs 遊走は, ROCK 活性とは異なる何らかの機構を介して促進されている可能性を示唆している。

4-3-4 SphK1 過剰発現が上皮細胞および IMFs に与える影響

本研究において, SphK1 過剰発現は aMoC1 の増殖および遊走を促進したが, 外因性の S1P 処置は影響を与えなかった (図 22)。SphK1 過剰発現は, aMoC1 における S1PR1~3 の mRNA 発現量に有意な変化をおこさなかったが, S1PR1 は増加傾向を示した (図 22 F~H)。これらの結果から, SphK1-aMoC1 では, S1PR1 の発現上昇により S1P 感受性が高まり, オートクライン様式による増殖および遊走の促進が引き起こされた可能性が考えられる。また, 他の可能性として,

オートクライン様式を介さない S1P の働きも考えられる。SphK1 により産生された S1P は、細胞内においてセカンドメッセンジャーとしての働きも有していると考えられており、NIH3T3 などの細胞では細胞内 S1P が増殖や生存に関与することが報告されている[118]。本研究の結果は、SphK1 過剰発現により aMoC1 の細胞内 S1P が上昇した結果引き起こされた可能性も考えられる。

一方、SphK1 過剰発現による aMoC1 の増殖および遊走の促進は有意ではあるもののわずかであり、EMT マーカーの発現量や局在にも影響を与えなかったことから、上皮細胞において、SphK1 発現増加だけではがんの発生や進行には不十分であると考えられる(図 23)。実際、S1P は Interleukin-6 (IL-6) や Tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカインと協調して働くことでがんの進行に寄与することが知られており[119, 120]、S1P と他の因子の協調作用が、がんの悪性化に重要であると考えられる。

本研究において、S1P と同様に、SphK1-aMoC1 の培養上清は IMFs の遊走を S1PR2 依存的に抑制したことから、SphK1-aMoC1 過剰発現上皮細胞は S1P を産生し、S1PR2 を介して IMFs の遊走を抑制していると考えられる(図 24)。一方、SphK1-aMoC1 の培養上清による IMFs の遊走抑制効果は、1 μ M S1P 処置と比較すると弱いレベルでしか観察されなかった(図 18, 24)。本研究では培養上清中の S1P 量を測定していないが、S1P による IMFs 遊走抑制効果は濃度依存的であることから、SphK1-aMoC1 が培養上清中に産生している S1P は比較的低濃度であると考えられる。しかし生体においては、SphK1 が大腸癌で強く活性化されていること、また担癌マウスにおいては血清中の S1P 濃度が 1 μ M 以上検出されることが報告されていることから[121-123]、SphK1 を発現したがん細胞は、IMFs の遊走を抑制するために十分量の S1P を産生していると考えられる。

4-3-5 IMF_s 培養上清が上皮細胞に与える影響

IMFs 培養上清は、aMoC1 の遊走を促進したが、増殖を抑制した (図 25)。IMFs が産生する TGF- β や Wnt5a は、上皮細胞の遊走を促進するが、増殖を抑制することが知られている[124, 125]。IMFs の培養上清が aMoC1 の増殖を抑制したことから、IMFs は腸上皮細胞の過度な増殖を抑制することで腸上皮の恒常性を維持していると考えられる。一方で、腸上皮細胞は、陰窩構造を維持するために恒常的に遊走しており[126]、IMFs の培養上清が aMoC1 の遊走を促進することは、上皮細胞の恒常性維持において遊走の制御が重要なことを裏付けている。また、aMoC1 における SphK1 発現は、IMFs 培養上清の反応性に対して影響を与えなかった (図 25)。上皮細胞はがん化することで、様々な成長因子に対する反応性を変化させることが知られており[127, 128]、この結果からも aMoC1 は SphK1 過剰発現のみではがん化してないことが示唆された。

さらに、IMFs 培養上清の aMoC1 に与える影響において、IMFs に対する S1P 処置の有無により差は認められなかった (図 25)。IMFs において S1P が PGE₂ 産生を誘導すること[103]、また、PGE₂ はがん幹細胞の増加や転移を促進することや[111]、消化管腫瘍において炎症性微小環境を作り上げることが知られている[112]。本研究の結果から、PGE₂ などの IMFs において S1P 処置により産生が変化する因子は、がん細胞に直接影響を与えるのではなく、がんの進行を支持する微小環境に影響を与えることで、間接的にがんの悪性化に寄与している可能性が考えられる。また、もう一つの可能性として、S1P により誘導される PGE₂ 以外の因子が、PGE₂ によるがん細胞への作用を打ち消している可能性も考えられる。この点を検討するためには、S1P により IMFs において産生が変化する因子について網羅的に検討する必要がある。

4-3-6 総括

本研究により，結腸上皮細胞における SphK1 発現上昇が S1P/S1PR2/ROCK/Rac1 シグナルを介して IMF の遊走を抑制すること，反対に IMF は上皮細胞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，SphK1 を発現した大腸癌細胞は，S1P を介して IMF をがん微小環境中に維持し，がんの悪性化に利用していると考えられる（図 28）。

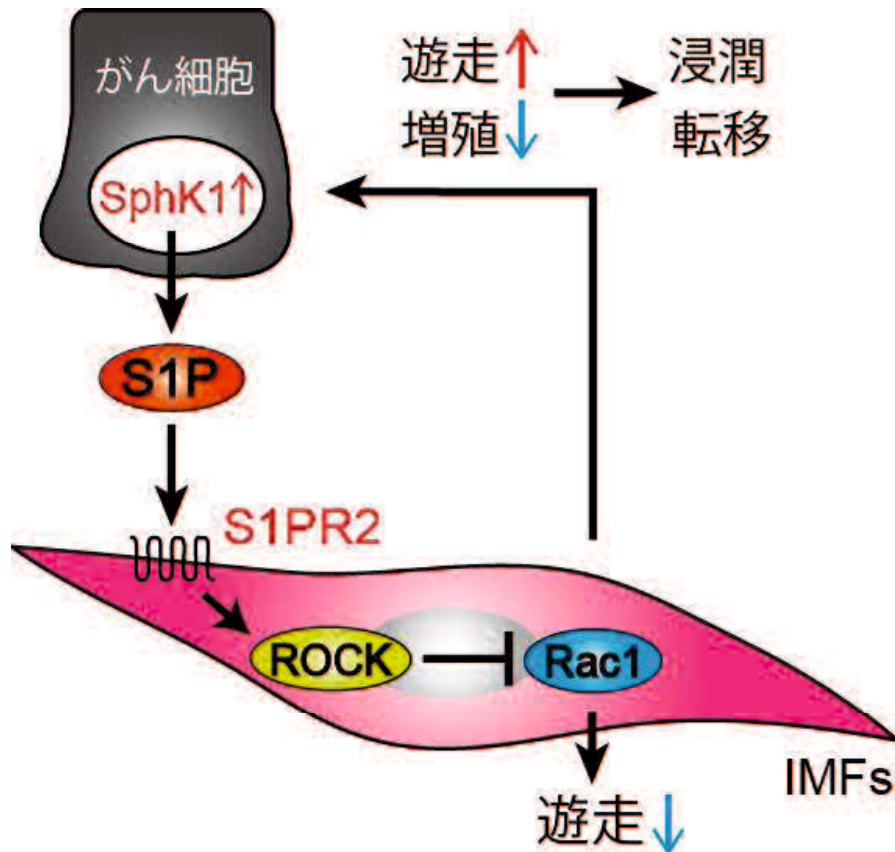


図 28 SphK1 発現がん細胞による IMFs 遊走制御メカニズム

大腸癌細胞において、SphK1 発現による S1P 産生量増加は、S1PR2 を介した ROCK 活性化および Rac1 抑制により、IMFs の遊走を抑制し、自身の近くにとどめることでがん微小環境の維持に寄与する。また、IMFs は上皮性細胞の増殖を抑制し遊走を促進したことから、浸潤や転移の促進に寄与すると考えられる。

第5章 KRas 変異がん細胞による腸筋線維芽細胞制御機構の解明

第1節 背景および目的

5-1-1 大腸癌における KRas 変異

Ras は、低分子量 GTP 結合タンパク質であり、細胞の増殖や遊走、細胞死の制御など様々な現象に関与している[129]。一方、Ras は原がん遺伝子としても知られており、様々ながんにおいてその活性型の変異が認められている[129]。大腸癌は Ras の変異が頻繁に認められるがんの一つであり、およそ 45 %の大腸癌でその変異が認められる[130]。Ras 遺伝子には KRas, HRas および NRas の 3 種が知られているが、大腸癌においては、KRas の変異が Ras の変異の 80 %以上を占めており、そのうち 90 %以上は、コドン 12 (約 70 %) および 13 (約 20 %) に認められる[130]。特に、コドン 12 のアミノ酸がグリシンからバリンへ変異した KRasV12 は、様々な実験系において KRas の活性型変異体として用いられている[131, 132]。

KRas の活性型変異は、がん細胞の増殖や浸潤、転移、薬剤耐性能の獲得などを促進することが知られている[133-136]。さらに、様々なサイトカインの産生亢進を介して周囲の微小環境にも影響を与え、血管新生促進や免疫反応抑制を介して悪性化に利用していることが示唆されている[137-139]。このように、上皮細胞における KRas 変異は、がん細胞自身を悪性化するだけでなく、微小環境の制御機構にも影響を与え、がん化を促進している。一方、微小環境の一員である筋線維芽細胞に対して KRas 変異がん細胞が与える影響については、まだ不明な点が多く、大腸癌に至ってはほとんど明らかになっていない。

5-1-2 本研究の目的

前述した通り，大腸癌における IMF_s の重要性は示されており，がん細胞による IMF_s 制御機構を明らかにする必要がある。また，第 3 章で樹立した株化 IMF_s は，IMF_s 研究への有用性を示すために，Primary-IMF_s との更なる比較検討が必要である。そこで，大腸癌細胞において高頻度に変異が認められる KRas 遺伝子の変異が，IMF_s に与える影響を解明するとともに，IMF_s 細胞株の有用性について検討することを目的に研究を行った。

第 2 節 実験結果

5-2-1 KRasV12 発現 aMoC1 の作製

5-2-1-1 KRasV12 発現は aMoC1 の増殖および遊走を促進する

初めに、KRasV12 の発現が上皮細胞に与える影響を検討するため、3 × FLAG タグを付加した KRasV12 を安定発現させた aMoC1 (KRasV12-aMoC1) を作製した (図 29 A)。KRasV12 発現により aMoC1 の形態変化が観察され (図 29 B)、KRasV12 発現が aMoC1 の機能に影響を与えている可能性が示唆されたため、aMoC1 の増殖能および遊走能の変化を検討した。

CCK-8 を用いて細胞増殖能を検討したところ、KRasV12 発現は aMoC1 の増殖を促進した (図 29 C)。さらに、Boyden chamber assay により遊走能を検討したところ、KRasV12 発現は aMoC1 の遊走を促進した (図 29 D)。

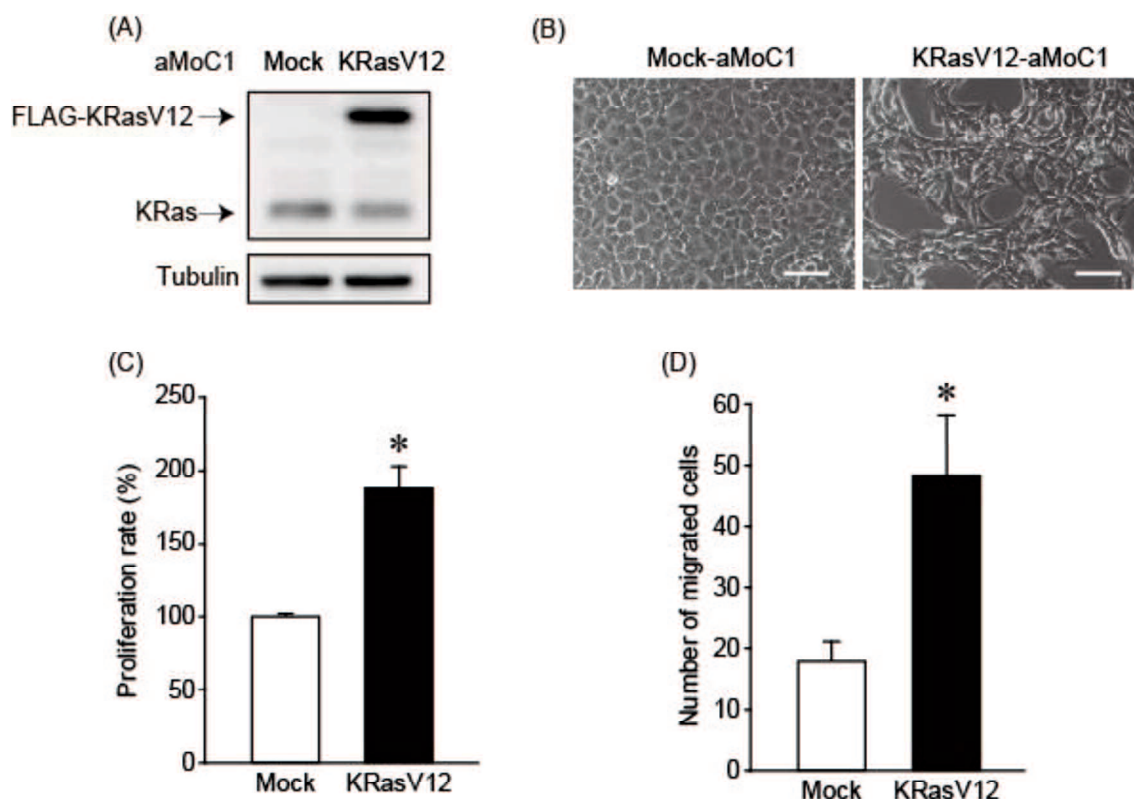


図 29 KRasV12 発現が aMoC1 の増殖および遊走に与える影響

(A) コントロールベクタープラスミド導入 (Mock) および FLAG-KRasV12 発現プラスミド導入 (KRasV12) aMoC1 における KRas タンパク質の発現を western blotting 法により検討した。Tubulin はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例を示した。N=3。(B) Mock-aMoC1 および KRasV12-aMoC1 の位相差顕微鏡像。スケールバーは 100 μm を示す。典型的な画像の一例を示した。(C, D) KRasV12 過剰発現による aMoC1 の増殖率 (C) (N=6, in duplicate) および遊走率 (D) (N=3) の変化。増殖率は CCK-8 を用いて、遊走率は Boyden chamber assay で検討した。増殖率は Mock を 100%としてその相対値で示し、遊走率は遊走細胞数を示した。*: $P < 0.05$ (Mock との比較)。

5-2-1-2 KRasV12 発現 aMoC1 はがん細胞様の性質を有する

次に、KRasV12-aMoC1 が、がん細胞の性質を有するかを検討した。がん細胞の特徴としては、足場非依存的増殖能や個体接種時の腫瘍形成能、細胞間結合の崩壊などが挙げられる。

そこで、ソフトアガーコロニー形成試験により足場非依存性増殖能を検討したところ、KRasV12 発現によるコロニー形成数の増加が認められ、KRasV12 発現により足場非依存性増殖能が増強されることが明らかになった (図 30 A)。また、免疫不全マウスの皮下に細胞を移植することで腫瘍形成能の有無を検討したところ、Mock-aMoC1 は腫瘍を形成せず、KRasV12-aMoC1 は腫瘍を形成した (data not shown)。さらに、western blotting 法により、細胞間結合関連タンパク質発現の変化を検討したところ、E-cadherin および β -catenin の発現量減少が認められ、細胞間結合の崩壊が示唆された (図 30 B)。一方、vimentin の発現量に変化は認められず、上皮間葉転換は引き起こされていないことが示唆された。また、幹細胞マーカー発現を検討したところ、Lgr5 の発現量に変化は認められなかったが、CD44 および c-Myc の発現量増加が認められた (図 30 B)。

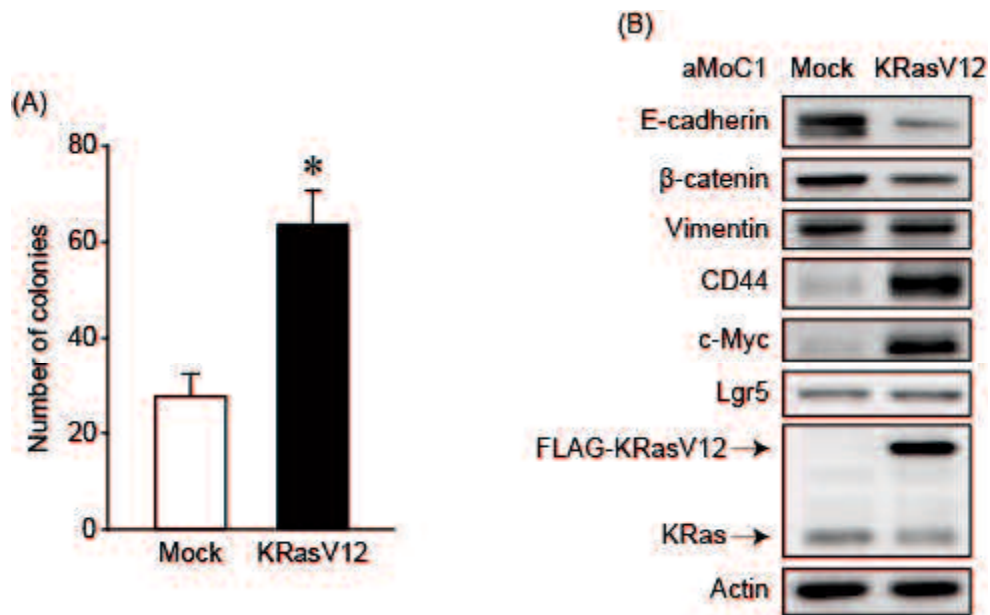


図 30 KRasV12 過剰発現が aMoC1 に与える影響

(A) Mock-aMoC1 および KRasV12-aMoC1 における足場非依存性増殖能をソフトアガーコロニー形成試験により検討した。グラフはコロニー形成数を示した。N=6, in duplicate。(B) Mock-aMoC1 および KRasV12-aMoC1 における各種マーカーの発現を western blotting 法により検討した。Actin はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。N=3。

5-2-2 KRasV12 発現 aMoC1 は IMF の遊走を促進する

5-2-2-1 KRasV12 発現 aMoC1 は Primary-IMF の遊走を促進する

上皮細胞における KRasV12 発現が IMF に与える影響を検討するため、Mock-aMoC1 の培養上清 (MCM) および KRasV12-aMoC1 の培養上清 (KCM) が IMF の分化、増殖および遊走に与える影響を検討した。

第 3 章で述べた通り、筋線維芽細胞は線維芽細胞が α -SMA を発現するように分化した細胞であり、 α -SMA の発現量に相関して線維芽細胞の機能が変化する [140-143]。また、筋線維芽細胞は線維芽細胞と平滑筋細胞の中間の形質を持つことから、筋線維芽細胞の分化に伴い、vimentin や desmin の発現量も変化すると考えられる。そこで western blotting 法により α -SMA, vimentin および desmin の発現量変化を検討することで筋線維芽細胞の分化度を検討した。その結果、MCM および KCM は Primary-IMF の α -SMA, vimentin および desmin の発現量に影響を与えなかった (図 31 A)。また、CCK-8 を用いて、IMF の増殖を検討したところ、MCM および KCM は Primary-IMF の増殖に影響を与えなかった (図 31 B)。一方、wound healing assay により IMF の遊走能を検討したところ、MCM は影響を与えなかったが、KCM は Primary-IMF の遊走を促進した (図 31 C)。さらに、Boyden chamber assay においては、MCM により Primary-IMF の遊走が促進されたが、KCM により Primary-IMF の遊走はさらに強力に促進された (図 31 D)。

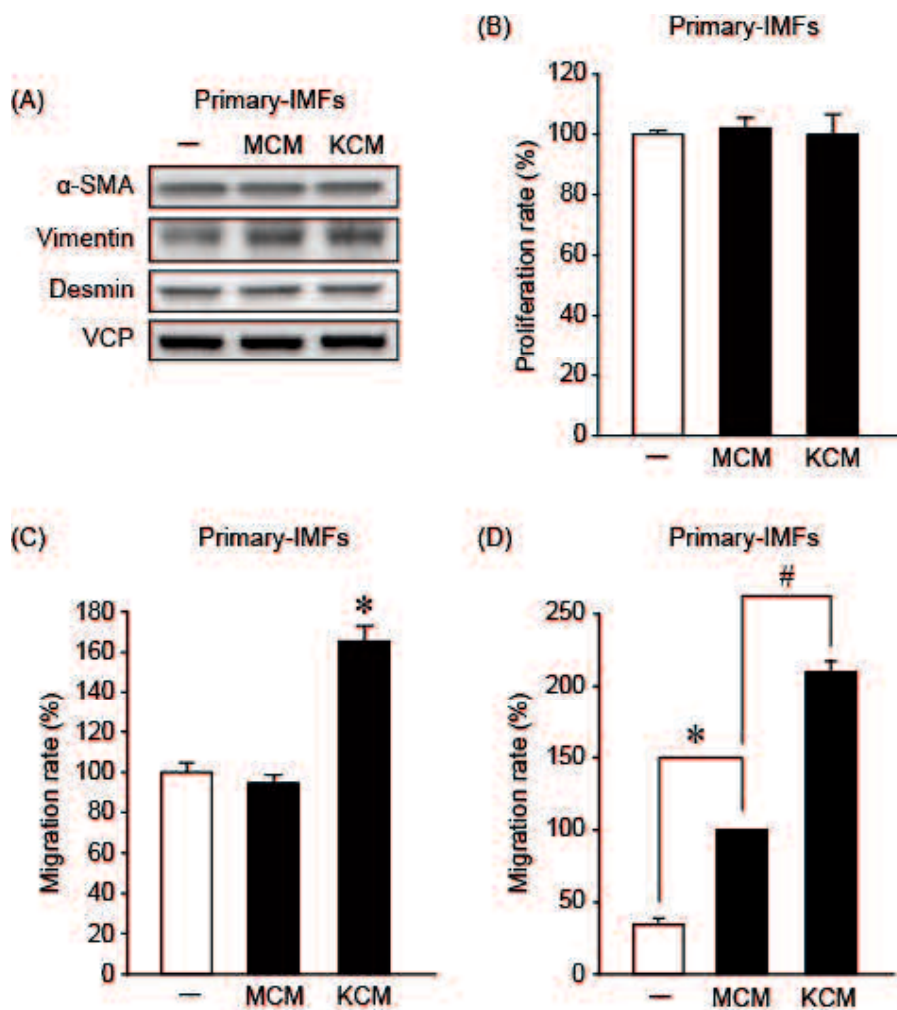


図 31 IMF の分化，増殖および遊走に対する KRasV12-aMoC1 培養上清の作用
 Mock-aMoC1 培養上清 (MCM) および KRasV12-aMoC1 培養上清 (KCM) 処置による IMF の分化度 (A) (N=4, in duplicate), 増殖率 (B) (N=6, in duplicate) および遊走率 (C, D) の変化。分化度は western blotting 法により, 増殖率は CCK-8 を用いて, 遊走率は wound healing assay (C) (N=12, in duplicate) および Boyden chamber assay (D) (N=3) により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。それぞれ, 培養上清で 5 日間 (A), 2 日間 (B), および 12 時間 (C, D) 処置した。増殖率および遊走率は培養上清無処置を 100 %としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (培養上清無処置群との比較)。# : $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。

5-2-2-2 KRasV12 発現 aMoC1 は LmcMF の遊走を促進する

KCM が Primary-IMFs の遊走を促進することが明らかになったことから、以降の検討を効率的に行うため、本研究における LmcMF の有用性を検討した。

LmcMF の遊走における、MCM および KCM の反応性を wound healing assay により検討したところ、LmcMF は MCM により遊走が促進されたが、KCM により LmcMF の遊走はさらに強力に促進された (図 32)。

以上の結果から、LmcMF においても KCM による遊走促進が認められることが明らかになった。

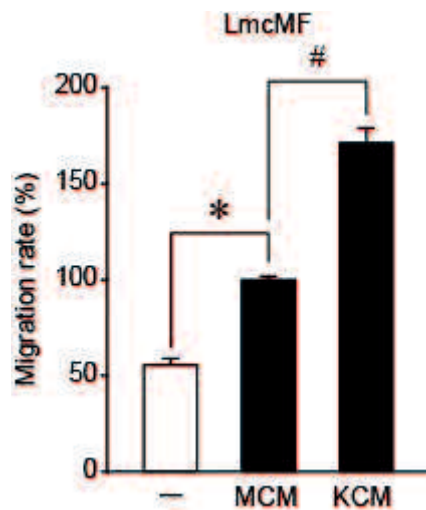


図 32 LmcMF の遊走に対する KRasV12-aMoC1 培養上清の作用

MCM および KCM 処置における LmcMF の遊走率の変化を wound healing assay により検討した。遊走率は MCM 処置群を 100 % としてその相対値で示した (N=18~20, in duplicate)。* : $P < 0.05$ (培養上清無処置群との比較)。# : $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。

5-2-3 aMoC1 の KRasV12 発現による各種サイトカインの mRNA 発現量の変化

KCM により IMFs の遊走が強く促進されたことから、KRasV12 発現により aMoC1 における分泌性因子の産生量に変化していると考えられる。がん細胞は、サイトカインを介してがん微小環境中の細胞を制御していることが知られている[6, 7]。そこで、KRasV12 発現による aMoC1 での各種遊走関連サイトカインの発現量の変化について検討を行った。

Mock-aMoC1 と KRasV12-aMoC1 における各種サイトカインの mRNA 発現量を Real-time PCR により検討した結果、KRasV12-aMoC1 における IL-6, TNF- α , EGF, Heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) および TGF- β 1 の mRNA 発現量増加, および Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) の発現量低下が認められた (図 33)。

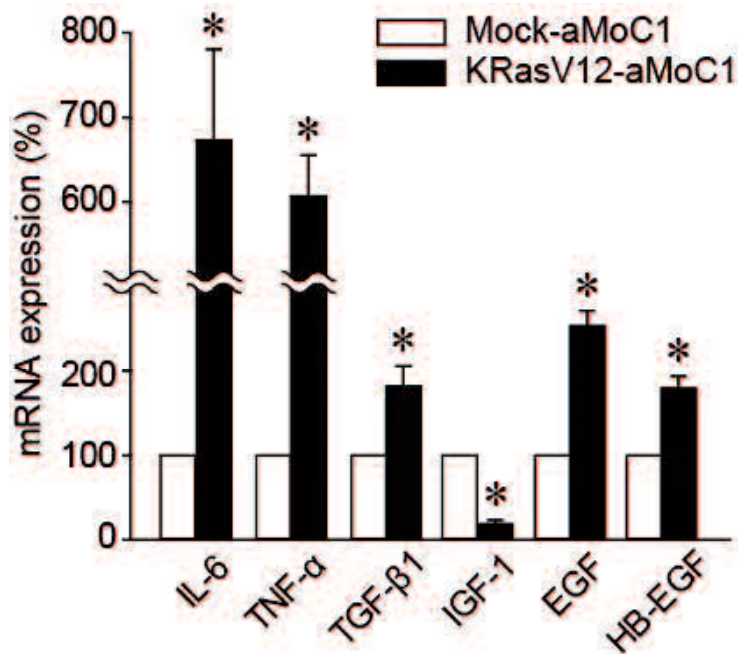


図 33 aMoC1 の KRasV12 発現による各種サイトカインの mRNA 発現量の変化
 aMoC1 における, KRasV12 発現による各種サイトカインの mRNA 発現量の変化を Real-time PCR により検討した。Mock-aMoC1 における各サイトカインの発現量を 100 % としてその相対値で示した。N=5。* : $P < 0.05$ (Mock-aMoC1 との比較)。

5-2-4 各種サイトカインが IMFs の遊走能に与える影響

KRasV12 発現により aMoC1 における各種サイトカインの発現量が変化していたため、各種サイトカインについて、IMFs の遊走への関与を wound healing assay で検討した。Primary-IMFs についてはサイトカインのみで処置し検討を行ったが、LmcMF については MCM でも遊走が促進されることから、MCM とサイトカインの共処置によって細胞遊走の検討を行った。

その結果、HB-EGF により Primary-IMFs および LmcMF の細胞遊走が促進された。一方、それ以外のサイトカインでは遊走への影響は認められなかった (図 34 A, B)。また、Boyden chamber assay においても、HB-EGF による Primary-IMFs の遊走促進作用が認められた (図 34 C)。

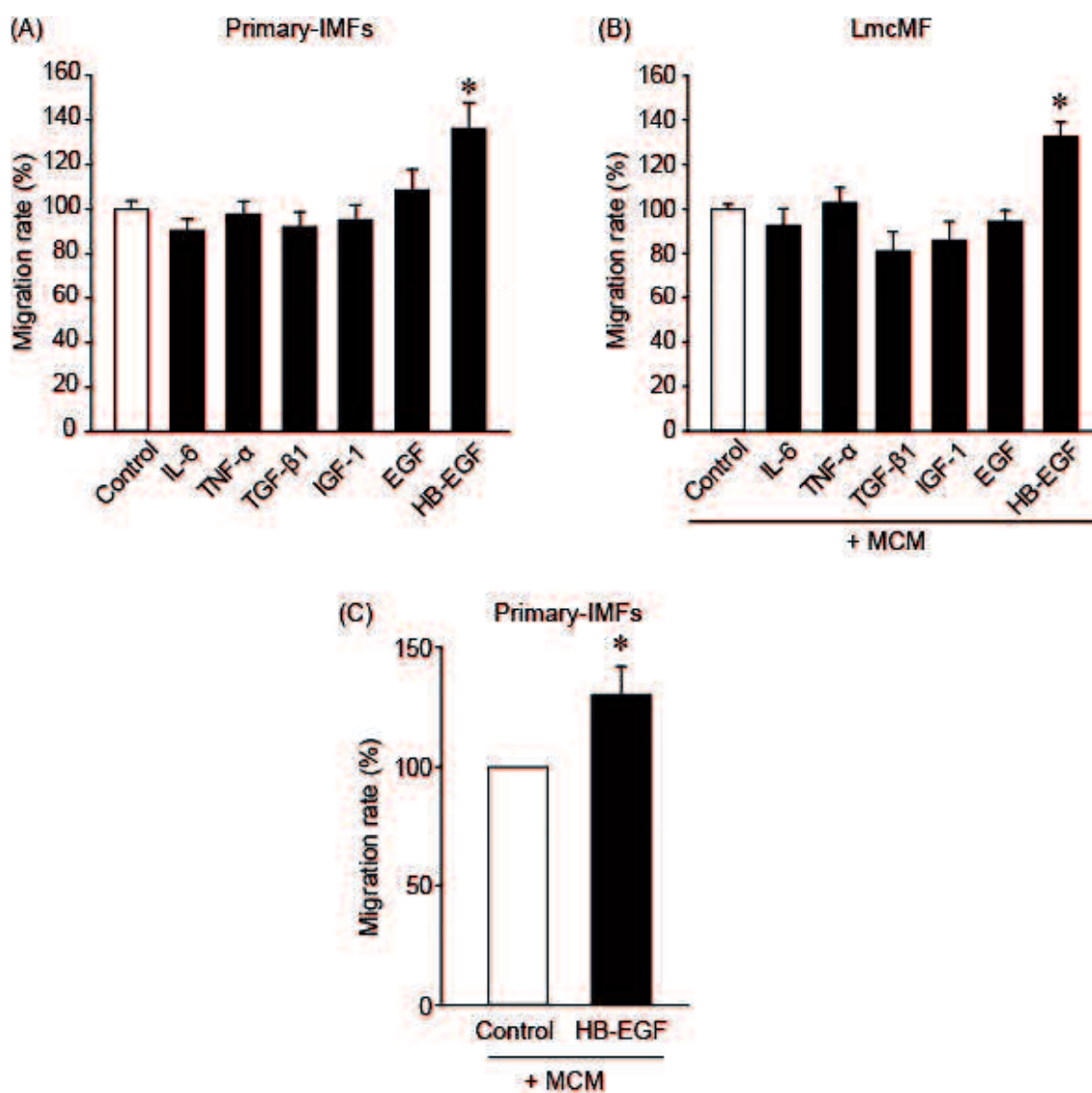


図 34 IMFの遊走に対する各種サイトカインの作用

(A, B) 各種サイトカイン (10 ng/ml) 処置による Primary-IMFs (A) (N=12, in duplicate) および LmcMF (B) (N=4~12, in duplicate) の遊走率の変化を wound healing assay により検討した。(C) HB-EGF (10 ng/ml) 処置による Primary-IMFs の遊走率の変化を Boyden chamber assay により検討した。N=3。遊走率は培養上清無処置 (A) および MCM 処置 (B, C) を 100 % としてその相対値で示した。
* : $P < 0.05$ (培養上清無処置群 (A) および MCM 処置群 (B, C) との比較)。

5-2-5 aMoC1 培養上清中の HB-EGF 含有量の検討

これまでの結果から、KCM による IMFs の遊走促進に HB-EGF が関与する可能性が示唆された。そこで、MCM および KCM の HB-EGF 含有量について ELISA 法により検討した。その結果、MCM と比較して KCM において、有意差はないものの HB-EGF 量の増加傾向が認められた (図 35)。

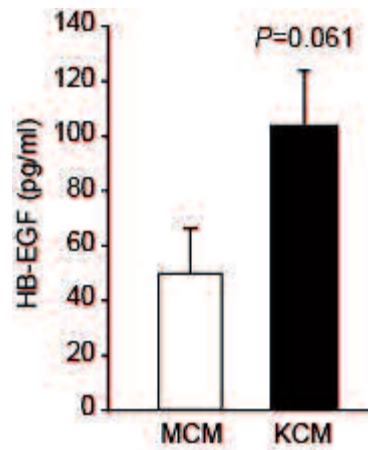


図 35 aMoC1 培養上清中の HB-EGF 含有量の変化

MCM および KCM 中の HB-EGF 含有量を ELISA 法により検討した。N=7, in triplicate。P=0.061 (MCM との比較)。

5-2-6 KCM および HB-EGF による IMFs の細胞内シグナルの変化

KCM および HB-EGF による IMFs 遊走促進に関与する細胞内シグナル伝達機構について、western blotting 法により検討した。LmcMF を各培養上清および HB-EGF で処置し、15 分後の ERK1/2, JNK1/2, AKT, YAP, GSK-3 β , S6 Kinase (S6K), p38 MAPK, STAT3 のリン酸化レベルを検討した。その結果、ERK1/2, JNK1 のリン酸化レベルの上昇および p38 MAPK の上昇傾向が、KCM および HB-EGF の両方で共通して認められた (図 36 A, B, 図 37, 図 38)。また、Primary-IMFs においても LmcMF と同様に KCM および HB-EGF による ERK1/2 および JNK1 のリン酸化レベルの上昇が認められたが、p38 MAPK のリン酸化レベルの上昇は認められなかった (図 36 C, D, 図 39, 図 40)。以上の結果から、KCM 中の HB-EGF を介した IMFs の遊走促進には、ERK1/2 および JNK1 シグナルの活性化が関与している可能性が示唆された。

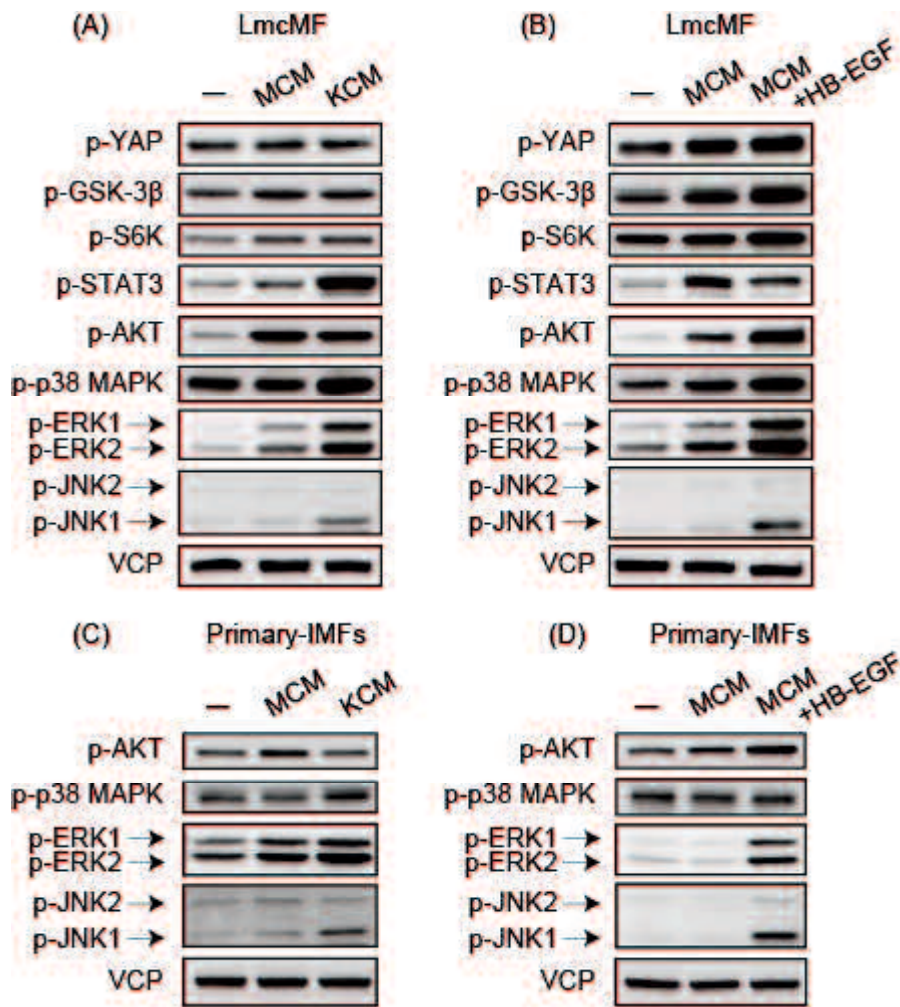


図 36 KCM および HB-EGF による IMFs の細胞内シグナルの変化

MCM または KCM (15 分間) (A, C) および MCM 存在下での HB-EGF (10 ng/ml : 15 分間) (B, D) 処置による LmcMF (A, B) および Primary-IMFs (C, D) におけるシグナル伝達経路活性の変化を western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例を示した。N=5~7 (A), 3~4 (B), 5~10 (C), 6~7 (D)。

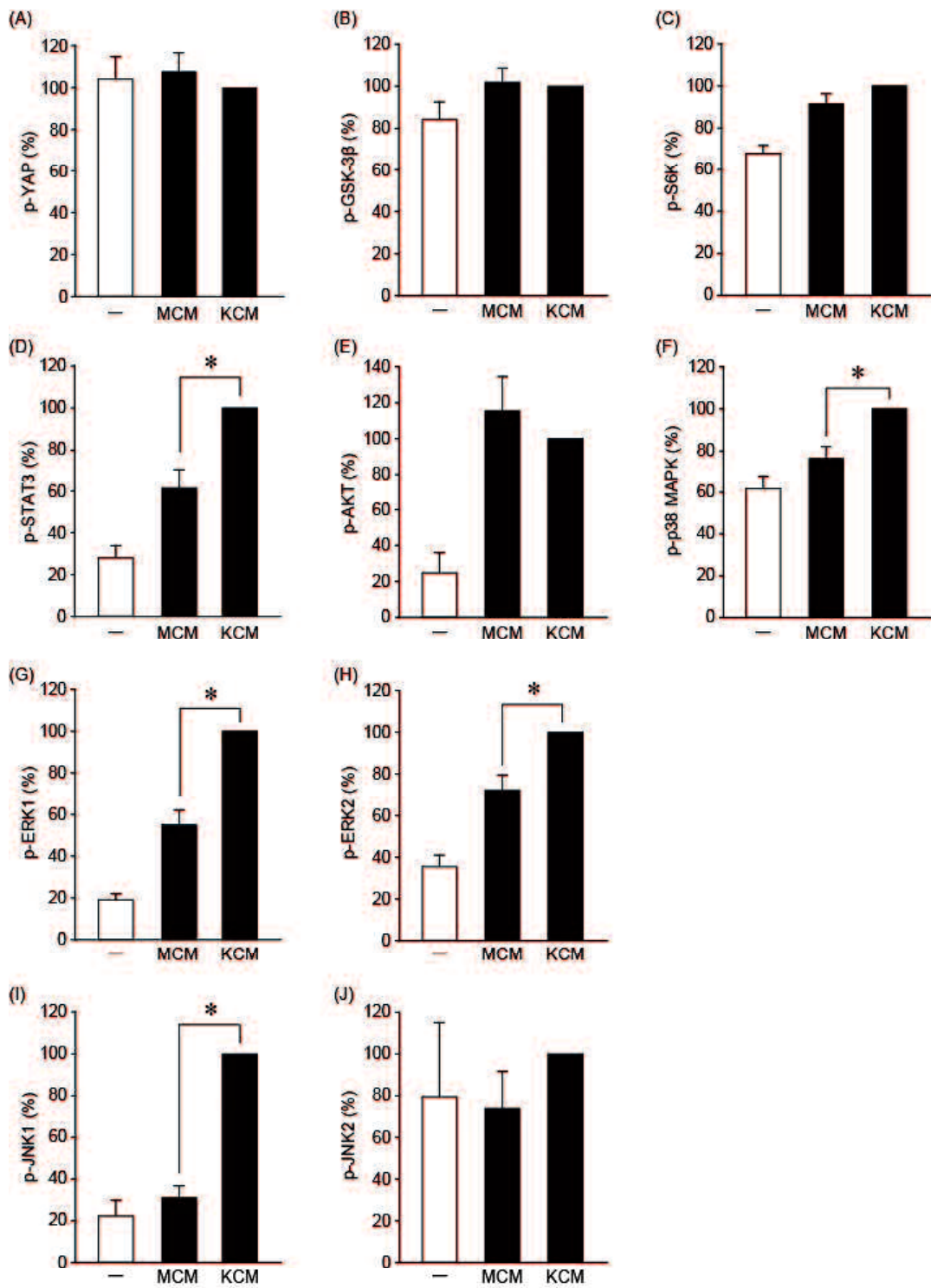


図 37 KCM による LmcMF の細胞内シグナルの変化

図 36 (A) の定量図。KCM 処置群を 100% としてその相対値で数値化し、グラフ化した。* : $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。N は図 36 に示した。

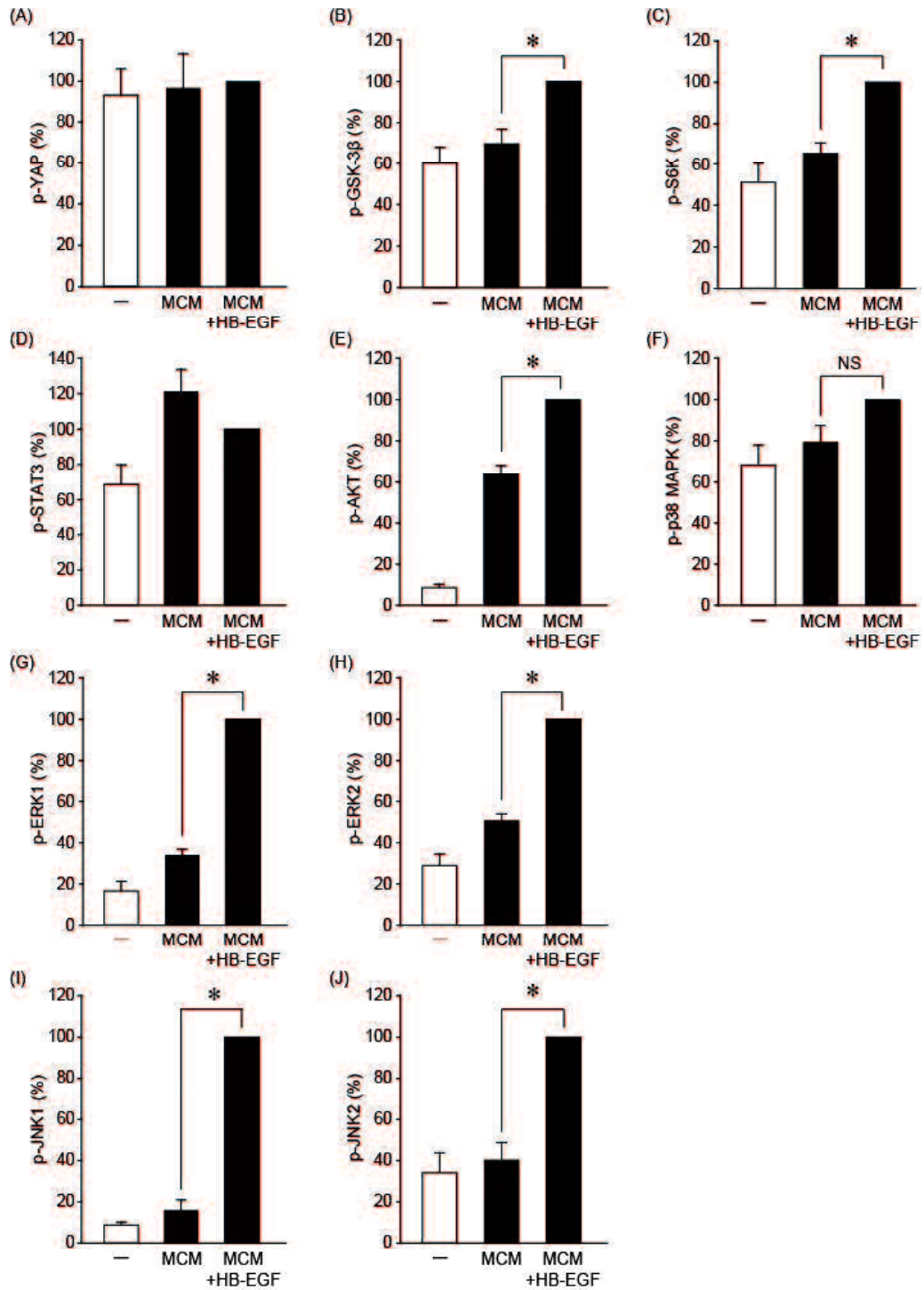


図 38 HB-EGF による LmcMF の細胞内シグナルの変化

図 36 (B) の定量図。MCM 存在下での HB-EGF 処置群を 100% としてその相対値で数値化し、グラフ化した。*: $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。N は図 36 に示した。

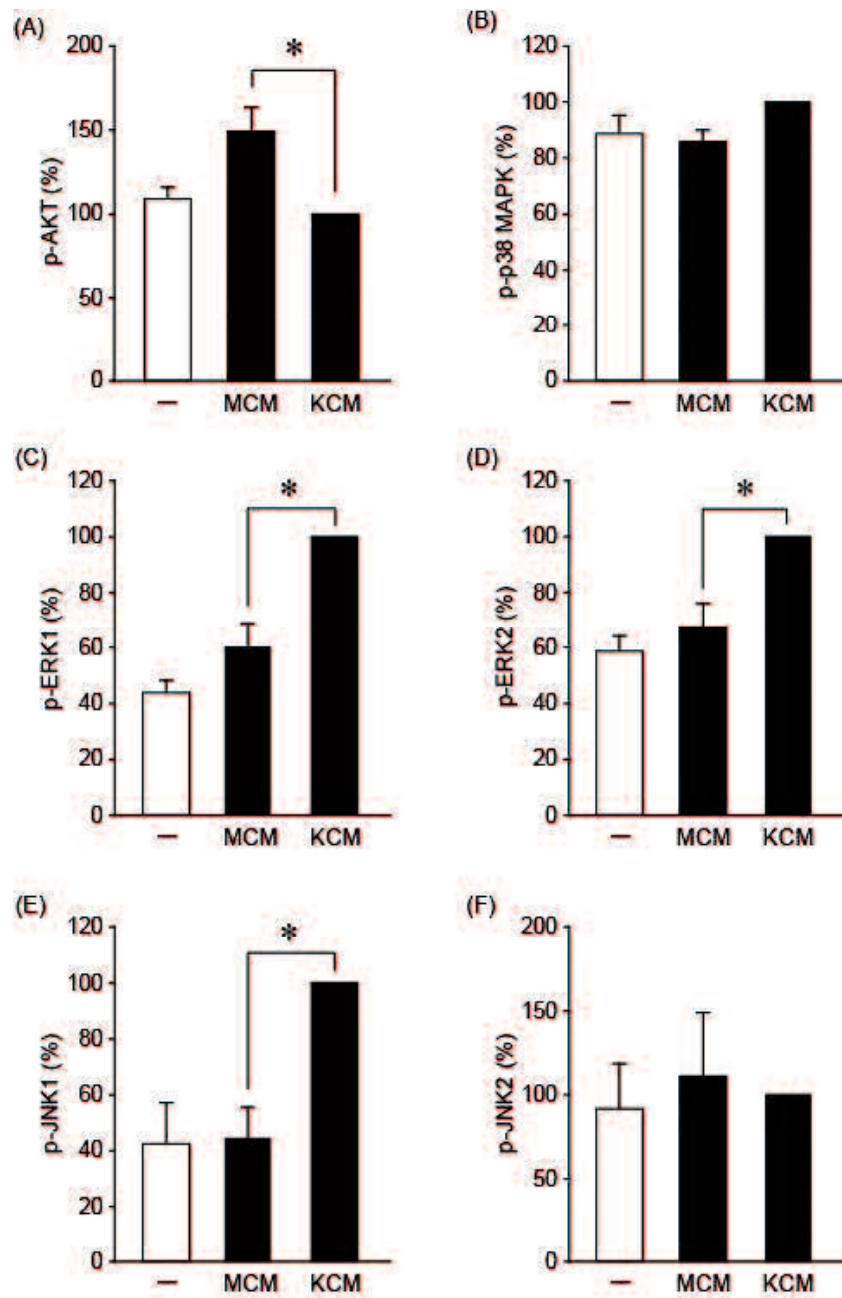


図 39 KCM による Primary-IMFs の細胞内シグナルの変化

図 36 (C) の定量図。KCM 処置群を 100%としてその相対値で数値化し、グラフ化した。*: $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。N は図 36 に示した。

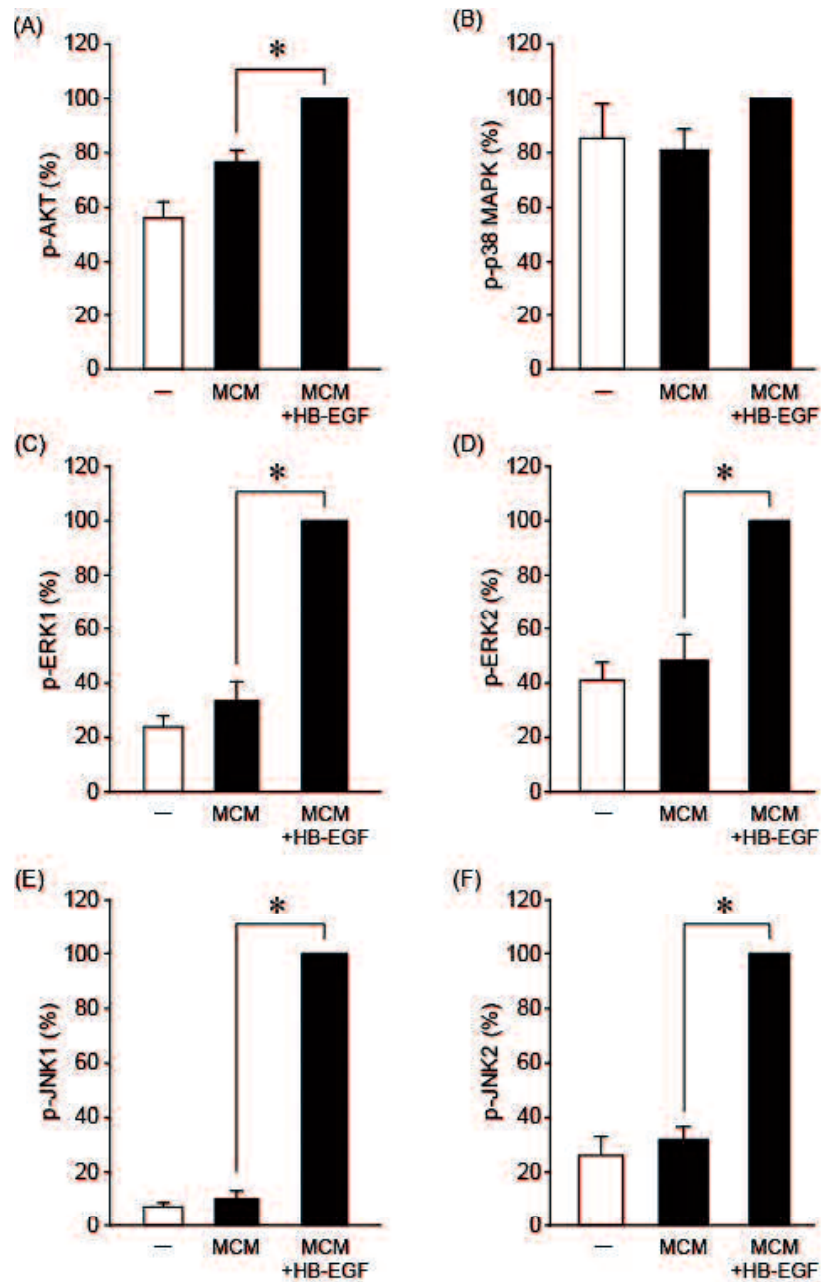


図 40 HB-EGF による Primary-IMFs の細胞内シグナルの変化

図 36 (D) の定量図。MCM 存在下での HB-EGF 処置群を 100% としてその相対値で数値化し、グラフ化した。*: $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。N は図 36 に示した。

5-2-7 IMF_s の遊走促進への ERK, JNK シグナルの関与

各種阻害剤を用いて、MCM および KCM による IMF_s の遊走促進に対する ERK および JNK シグナルの関与を wound healing assay により検討した。その結果、ERK 阻害剤 FR180204, JNK 阻害剤 SP600125 のいずれによっても KCM による LmcMF の遊走促進が阻害された (図 41)。一方, LmcMF の無刺激時の遊走および MCM による遊走促進も, FR180204 および SB203580 により阻害されたが, その阻害効果は KCM に対する阻害効果より軽度であった (図 41)。以上の結果から, ERK および JNK シグナルは, IMF_s における定常状態の遊走, MCM および KCM による遊走促進のどちらにも関与していると考えられる。

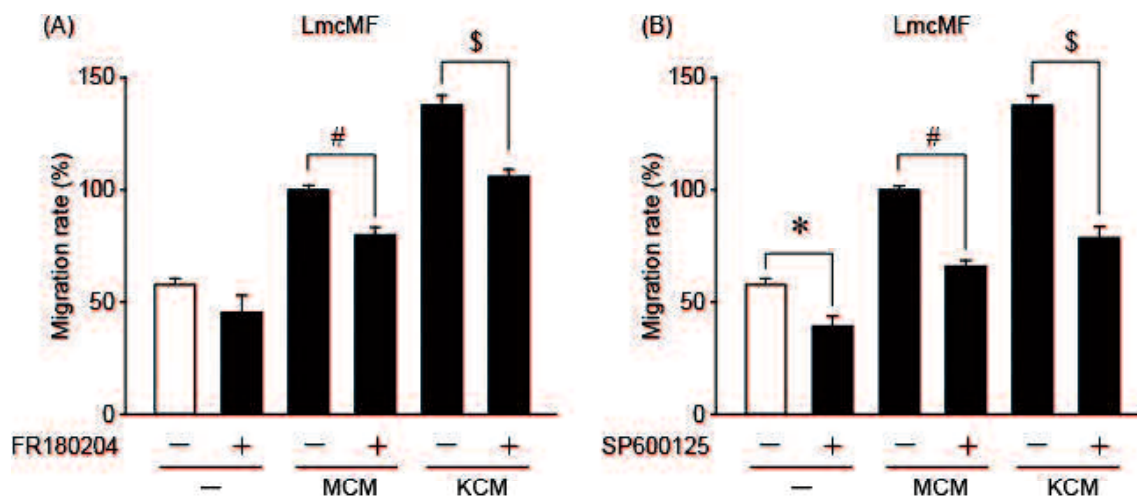


図 41 KCM による IMF の遊走促進に対する ERK 阻害剤および JNK 阻害剤の作用

KCM 処置による LmcMF の遊走促進に対する FR180204 (1 μ M) (A) および SP600125 (1 μ M) (B) の作用を wound healing assay により検討した。各阻害剤は 30 分間前処置した。遊走率は阻害剤で処置していない MCM 処置群を 100 % としてその相対値で示した。N=6~10, in duplicate。* : $P < 0.05$ (培養上清無処置群との比較)。# : $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。\$: $P < 0.05$ (KCM 処置群との比較)。

5-2-8 ERK, JNK シグナル活性化への ErbB 受容体の関与

KCM による ERK1/2 および JNK1 のリン酸化レベルの上昇に対する ErbB 受容体の関与を検討するため、ErbB1,2,4 阻害剤である Dacomitinib を用いて western blotting 法により検討した。その結果、LmcMF における KCM による ERK1/2 および JNK1 のリン酸化レベルの上昇は、Dacomitinib により有意に阻害された (図 42 A, 図 43 A~C)。また、Primary-IMFs における KCM による ERK1/2 のリン酸化レベルの上昇も、Dacomitinib により有意に阻害された (図 42 B, 図 43 D, E)。一方、Primary-IMFs における KCM による JNK1 のリン酸化レベルの上昇は、Dacomitinib により有意では無いが阻害傾向が認められた (図 42 B, 図 43 F)。

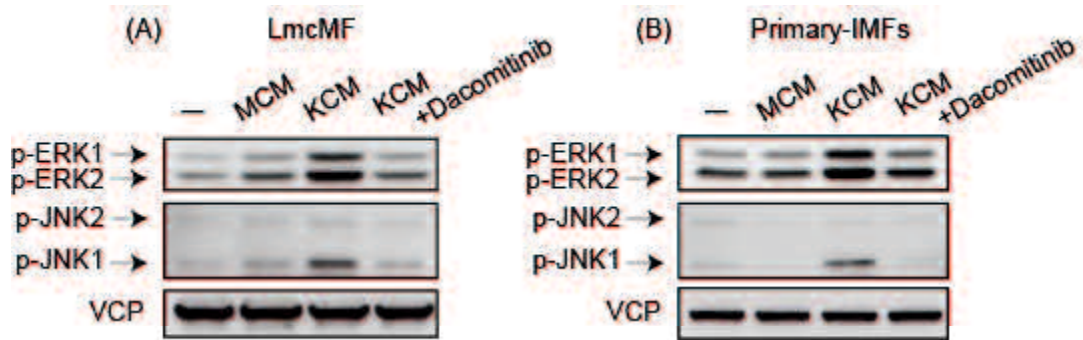


図 42 ERK, JNK シグナル活性化への ErbB 受容体の関与

KCM (15 分間) 処置による, LmcMF (A) (N=5) および Primary-IMFs (B) (N=4) の ERK1/2 および JNK1 のリン酸化レベル上昇への Dacomitinib (1 μ M : 30 分間前処置) の作用を western blotting 法により検討した。なお, 比較対象として MCM (15 分間) 処置による変化を観察した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部を示した。

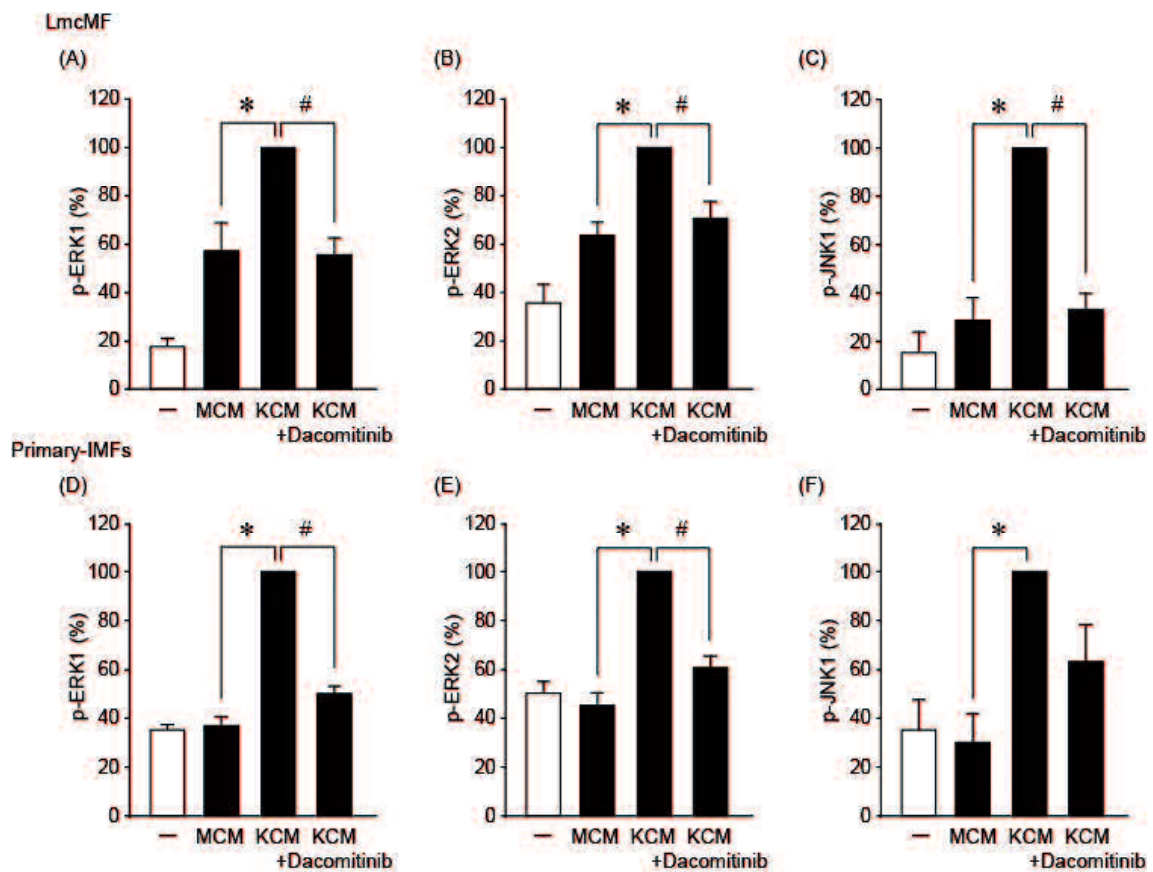


図 43 ERK, JNK シグナル活性化への ErbB 受容体の関与

図 42 の定量図。KCM 処置による LmcMF (A~C) および Primary-IMFs (D~F) の ERK1 (A, D), ERK2 (B, E) および JNK1 (C, F) のリン酸化レベル上昇に対する Dacomitinib の作用を, KCM 存在下での HB-EGF 処置群を 100 %としてその相対値で数値化し, グラフ化した。*: $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。#: $P < 0.05$ (KCM 処置群との比較)。N は図 42 に示した。

5-2-9 KCM による IMFs 遊走促進に対する ErbB 受容体阻害剤の作用

ErbB 受容体阻害剤を用いて、KCM による IMFs の遊走促進に対する受容体の関与を検討した。Dacomitinib により KCM による Primary-IMFs および LmcMF の遊走促進が阻害された (図 44)。一方、IMFs の定常状態における遊走および MCM による遊走促進に対して、Dacomitinib は影響を与えなかった。以上の結果から、KCM 中の HB-EGF による IMFs の遊走促進には ErbB 受容体を介した ERK および JNK シグナルの活性化が関与していることが示唆された。

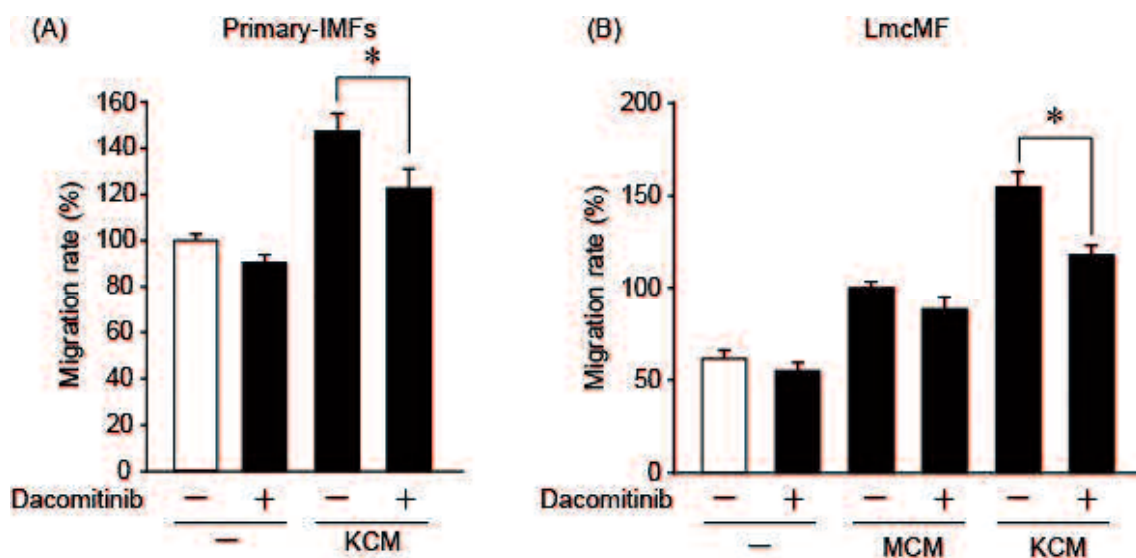


図 44 KCM による IMFs の遊走促進に対する ErbB 受容体阻害剤の作用

MCM および KCM 処置による Primary-IMFs (A) (N=14~20, in duplicate) および LmcMF (B) (N=4, in duplicate) の遊走促進に対する Dacomitinib (1 μ M : 30 分間前処置) の作用を wound healing assay により検討した。遊走率は Dacomitinib で処置していない培養上清無処置群 (A) および MCM 処置群 (B) を 100% としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (KCM 処置群との比較)。

5-2-10 HB-EGF による IMFs 遊走促進に対する ErbB1 および ErbB4 の関与

これまでの結果から、HB-EGF による IMFs の遊走促進には、ErbB 受容体を介した ERK および JNK シグナルの活性化が関与していることが示唆された。一方、HB-EGF は ErbB1 および ErbB4 のリガンドであるため、IMFs の遊走促進において、ErbB1 および ErbB4 のいずれの受容体が関与するのかを検討した。

KCM および HB-EGF による IMFs の遊走促進に対して、ErbB1 阻害剤である Gefitinib は影響を与えなかった (図 45A, B)。また、すでに示したとおり ErbB1 特異的なリガンドである EGF は IMFs の遊走に影響を与えなかった (図 34 A, B)。以上の結果より、KCM および HB-EGF による IMFs の遊走促進には、ErbB1 は関与しておらず、ErbB4 が寄与していることが示唆された。

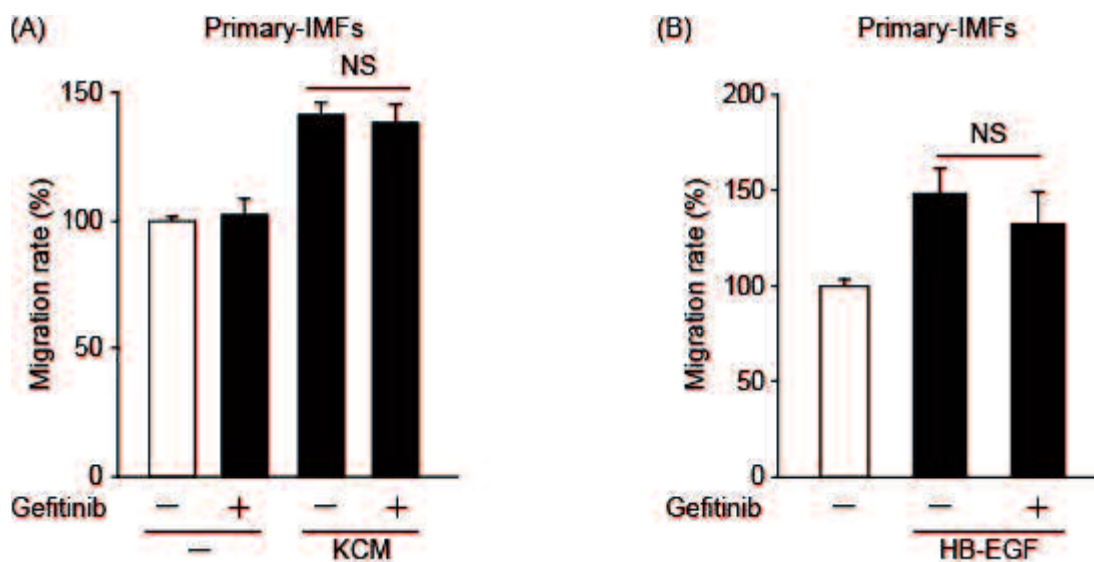


図 45 KCM および HB-EGF による IMFs の遊走促進に対する ErbB1 受容体阻害剤の作用

KCM (A) (N=14~16, in duplicate) および HB-EGF (10 ng/ml) (B) (N=8, in duplicate) による Primary-IMFs の遊走促進に対する Gefitinib (1 μ M : 30 分間前処置) の作用を wound healing assay により検討した。遊走率は Gefitinib で処置していない培養上清無処置群を 100 % としてその相対値で示した。

5-2-11 ERK, JNK シグナル活性化への ErbB1 の関与

これまでの結果から, KCM 中の HB-EGF は, ErbB4 を介して ERK および JNK を活性化し, IMFs の遊走を促進していることが示唆された。一方, ERK および JNK は ErbB1 により活性化されることが知られている[144]。そこで, KCM および HB-EGF による ERK および JNK シグナルの活性化における ErbB1 の関与を, ErbB1 阻害剤である Gefitinib を用いて検討した。その結果, KCM および HB-EGF による ERK1/2 および JNK1 のリン酸化は, Gefitinib により完全に阻害された(図 46 A, B)。以上の結果から, KCM および HB-EGF による ERK および JNK のリン酸化は, ErbB1 を介していることが明らかになった。

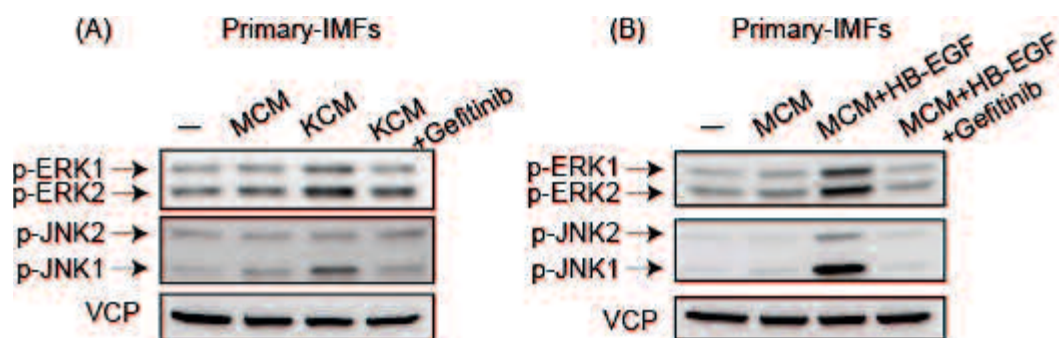


図 46 ERK, JNK シグナル活性化への ErbB1 受容体の関与

MCM (15 分間) 処置に対する, KCM (15 分間) (A) および HB-EGF (10 ng/ml : 15 分間) (B) 処置による Primary-IMFs の ERK1/2 および JNK1 のリン酸化レベル上昇への Gefitinib (1 μ M : 30 分間前処置) の作用を western blotting 法により検討した。なお, 比較対象として MCM (15 分間) 処置による変化を観察した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例を示した。N=2。

5-2-12 スクラッチ刺激により ERK および JNK シグナルは活性化される

KCM および HB-EGF による ERK および JNK シグナルの活性化は、主に ErbB1 を介していることが明らかになった (図 46)。この結果は、ErbB1 は IMF_s 遊走促進には関与しないが (図 34, 図 45), ERK および JNK シグナルの活性化が IMF_s の遊走に関与する (図 41) という結果と矛盾する。この矛盾点を解明するため、ERK および JNK シグナルの阻害が定常状態の IMF_s の遊走を阻害した点に注目した (図 41)。Wound healing においては、ERK シグナルの活性化が細胞間で伝播されることが重要であることが知られている [145]。このことから、wound healing assay においては、スクラッチによる刺激のみで IMF_s の ERK シグナルが活性化している可能性が考えられる。

そこで、スクラッチ刺激が IMF_s に与える影響を western blotting 法により検討したところ、スクラッチ刺激による ERK1/2 のリン酸化レベルの上昇および JNK1 のリン酸化レベルの上昇傾向が認められた (図 47 A~D)。また、Boyden chamber assay において、EGF により IMF_s の遊走が促進された (図 47 E)。

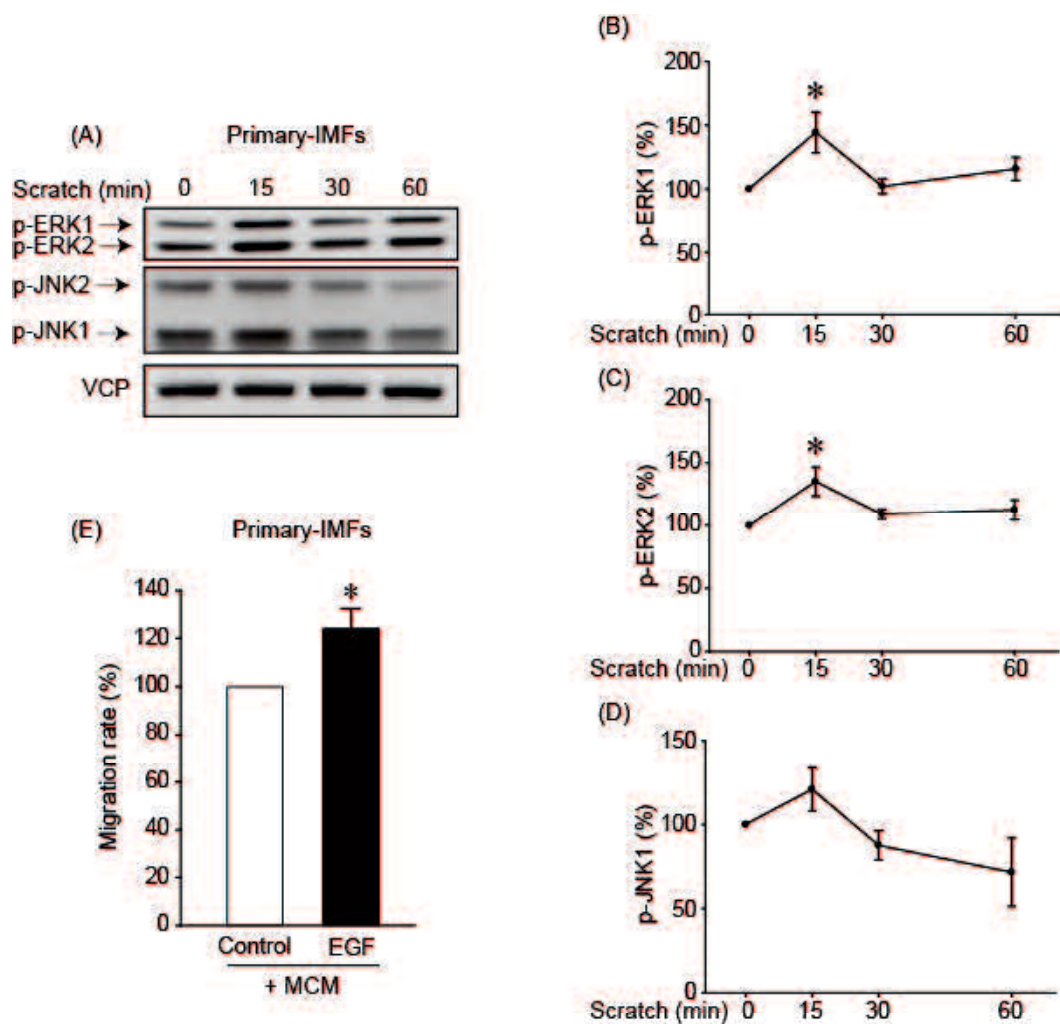


図 47 スクラッチ刺激による ERK および JNK の活性化

(A) スクラッチ刺激 (Scratch) 15, 30, 60 分後の Primary-IMFs における ERK1/2 および JNK1 のリン酸化レベルの変化を, western blotting 法により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一例を示した。N=5。(B~D) スクラッチ刺激 (Scratch) 15, 30, 60 分後の Primary-IMFs における ERK1 (B), ERK2 (C) および JNK1 (D) のリン酸化レベルの変化を, 非スクラッチ群を 100 % としてその相対値で数値化し, グラフ化した。*: $P < 0.05$ (非スクラッチ群との比較)。(E) EGF (10 ng/ml) による Primary-IMFs の遊走率の変化を Boyden chamber assay により検討した。遊走率は MCM 単独処置を 100 % としてその相対値で示した。*: $P < 0.05$ (MCM 処置群との比較)。N=4。

5-2-13 IMFの培養上清がKRasV12-aMoC1の増殖、遊走および浸潤に与える影響

以上の結果から、KRasV12-aMoC1はIMFの遊走を促進し、自身の近くに引き寄せていることが示唆された。そこで最後に、がん細胞に近づいたIMFが、がん細胞に与える影響を明らかにするため、IMFがKRasV12-aMoC1の増殖、遊走および浸潤に与える影響を検討した。

CCK-8を用いて増殖率を検討したところ、IMFの培養上清はKRasV12-aMoC1の増殖を抑制した(図48A)。一方、Boyden chamber assayにより遊走能を検討したところ、IMFの培養上清はKRasV12-aMoC1の遊走を促進した(図48B)。また、Invasion assayにより浸潤能を検討したところ、IMFの培養上清はKRasV12-aMoC1の浸潤を促進した(図48C)。

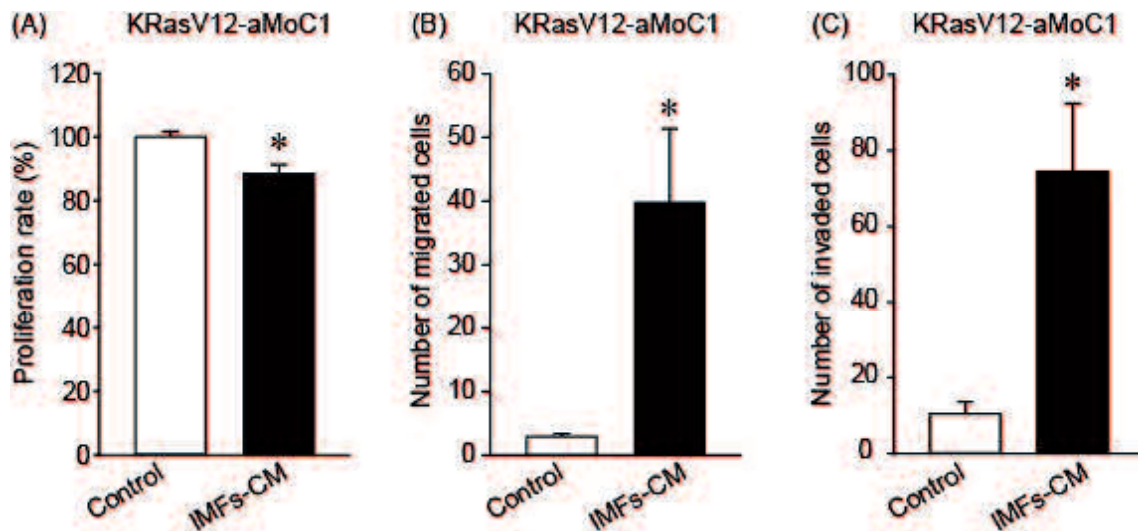


図 48 IMF 培養上清が KRasV12-aMoC1 の増殖および遊走に与える影響

IMFs 培養上清 (IMFs-CM) による, KRasV12-aMoC1 の増殖能 (A) (N=6, in duplicate), 遊走能 (B) (N=3) および浸潤能 (C) (N=3) の変化。増殖率は CCK-8 を用いて, 遊走率は Boyden chamber assay で, 浸潤能は Invasion assay で検討した。増殖率は培養上清無処置群を 100 % としてその相対値で示した。* : $P < 0.05$ (培養上清無処置群との比較)。

第3節 考察

本研究により，結腸上皮細胞において KRasV12 発現によるがん化に伴い HB-EGF 発現が上昇し，ErbB1 および ErbB4 を介して IMFs の遊走を促進し，自身の近くに引き寄せていることが示唆された。IMFs は，大腸癌のがん微小環境を構成する細胞であり，本研究によって明らかになったがん細胞による IMFs 制御機構は，がんの病態生理を理解するための重要な知見である。また，本研究において LmcMF の有用性も示され，本研究の更なる進展を含めた IMFs 研究の効率化が期待される。

5-3-1 KRasV12 が上皮細胞に与える影響

KRasV12 はがん遺伝子として知られ，様々ながんにおいて増殖や遊走，浸潤などを促進していることが知られている[133, 135, 136]。本研究においても，マウス結腸上皮細胞株 aMoC1 において，KRasV12 発現による増殖，遊走，足場非依存性増殖の促進，腫瘍形成能の獲得および接着結合の崩壊など，悪性度の上昇が認められた（図 29, 30）。さらに，KRasV12 発現によりがん幹細胞マーカーである CD44 および幹細胞性に関与する c-Myc の発現上昇が観察され（図 30 B）[146, 147]，幹細胞性の上昇が腫瘍形成能の獲得に寄与していることが示唆された。これまで，KRasV12 変異により大腸癌細胞においてがん幹細胞マーカーの発現が上昇することが報告されているが[148, 149]，KRasV12 変異は単独ではなく，APC の変異と協調して幹細胞マーカーを上昇させることが報告されている[149, 150]。一方，本研究において用いた aMoC1 は正常結腸上皮細胞を株化した細胞であるため，APC 変異は有していないと考えられる[151]。aMoC1 は，large T 抗原を用いて株化していることから，がん抑制因子である p53 が抑制されてい

ると考えられる[77]。そのため、本研究において観察された KRasV12 変異による幹細胞マーカーの上昇は、p53 抑制が協調的に働いた結果である可能性が考えられる。KRasV12-aMoC1 は、幹細胞性を獲得した結果、腫瘍形成能を有し、がん細胞様の性質を獲得したと考えられる。

5-3-2 KRasV12-aMoC1 が IMFs に与える影響

本研究において、KCM は IMFs の分化度や増殖には影響を与えなかった (図 31 A, B)。一方、KRasV12-aMoC1 において、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する TGF- β 1 や、筋線維芽細胞の増殖を促進する EGF および TNF- α の発現量上昇が観察された (図 33) [69, 152, 153]。反対に、筋線維芽細胞の分化や増殖を促進する IGF-1 については発現量の減少が観察された (図 33) [69, 152, 153]。これらの結果から、KRasV12-aMoC1 においては、分化および増殖を制御する様々なサイトカインの発現が変化し、総合的に培養上清としては IMFs の分化および増殖には影響を与えなかった可能性が考えられる。実際、MCM により上昇した Akt のリン酸化レベルは KCM において抑制されており (図 36, 37, 39)、KCM における抑制性シグナルの存在が、IMFs の増殖や分化を促進しなかった原因であると考えられる。

一方、KCM は IMFs の遊走を促進し、Boyden chamber assay により正の走化性が観察されたことから、KRasV12-aMoC1 は IMFs を引き寄せていることが示唆された (図 31 C, D)。また、KRasV12-aMoC1 において、HB-EGF の mRNA 発現量および分泌量の増加が認められ (図 33, 35)、HB-EGF による IMFs の遊走促進作用が認められたことから (図 34)、KCM による IMFs の遊走促進には、HB-EGF が関与していることが示唆された。さらに、Dacomitinib により KCM による IMFs 遊走促進作用が阻害されたことから (図 44)、HB-EGF が KCM に

よる IMF の遊走促進に関与していると考えられる。

KRasV12-aMoC1 で発現量の変化が認められたサイトカインは、様々な細胞において遊走への関与が報告されているが[154-158]、本研究では、HB-EGF を除いて IMF の遊走への影響は認められなかった (図 34)。過去の報告において、線維芽細胞で遊走を促進するサイトカインが筋線維芽細胞では遊走に影響を与えないことが示されており[159]、サイトカインによる遊走の制御には細胞種による違いが存在すると考えられる。以上のことから、KRasV12 変異により上皮細胞は様々なサイトカインの産生量を変化させ、IMF のみならずがん微小環境に存在する種々の細胞を制御していると考えられる。今後、がん微小環境を構成する各種細胞に対する KCM の作用を検討することで、より詳細ながんの病態メカニズムが解明されることが期待される。

5-3-3 HB-EGF による IMF の遊走促進機構

HB-EGF は、上皮性細胞や線維芽細胞において遊走を促進することが知られている[160-162]。本研究においても、これらの報告と同様に HB-EGF による IMF の遊走促進作用が観察された。一方、KCM による遊走促進作用は Dacomitinib により完全には阻害されなかったことから、KCM による遊走促進には HB-EGF 以外にも複数の分泌性因子が存在していることを示唆された。実際、Platelet-derived growth factor (PDGF) が筋線維芽細胞の遊走を促進することが報告されており[163]、本研究においては未検討な因子が HB-EGF と共に IMF の遊走を促進していると考えられる。

また、スクラッチ刺激により IMF における ERK および JNK のリン酸化レベルの上昇が認められたことから (図 47 A~D)、wound healing assay においては、スクラッチ刺激により ERK および JNK が始めから活性化されており、その後

ErbB1 を刺激してもこれらのシグナル伝達経路が IMF の遊走に影響を与えない可能性が示唆された。また、Boyden chamber assay では wound healing assay とは異なり、ErbB1 を活性化する EGF により IMF の遊走が促進されたことから (図 47 E)、定常状態の IMF の遊走促進には ErbB1 を介した ERK および JNK シグナルの活性化が重要であることが明らかになった。一方、wound healing assay において、ERK および JNK シグナルの阻害により、KCM による遊走促進作用は定常状態の遊走や MCM による遊走促進より強力に阻害されたことから (図 41)、ERK や JNK シグナルは他の遊走促進シグナルと相乗的に働いている可能性が考えられる。

KCM や HB-EGF においては wound healing assay によっても IMF 遊走促進作用が観察されたことから、ErbB4 依存的な別のシグナル伝達機構が存在していることが示唆された (図 49)。現在、ErbB4 特異的な阻害剤が市販されていないため、本研究では ErbB4 阻害の影響を検討できなかった。ErbB4 は、リガンドの結合により細胞内ドメインが切断され、核内に移行し、転写活性を制御することで細胞遊走を促進する機構が報告されており [164]、本研究において示唆された ErbB4 を介した IMF 遊走促進機構には、このようなメカニズムが関与している可能性が考えられる。今後は、ErbB4 のノックダウン細胞を作製するなど、ErbB4 阻害の影響について更に詳細に検討する必要がある。

HB-EGF は、がん細胞の増殖や血管新生に関与することが知られており、*in vivo* の腫瘍モデルにおいて、HB-EGF の阻害による腫瘍抑制効果が認められている [165, 166]。これらの作用に加えて、本研究から明らかになったように、HB-EGF による IMF 遊走促進機構の阻害による IMF 制御機構の崩壊が腫瘍抑制効果をもたらすことが期待される。

5-3-4 IMF_s 培養上清ががん細胞に与える影響

IMF_s 培養上清は、KRasV12-aMoC1 の遊走および浸潤を促進したが、増殖を抑制した (図 48)。がん微小環境中の筋線維芽細胞は、がん細胞の浸潤や転移を促進することが報告されており [167-169]、本研究における遊走および浸潤の促進はこれらの報告と一致する。一方、本研究の結果とは反対に、筋線維芽細胞ががんの成長に寄与することも報告されている [170]。生体内では、がん微小環境として筋線維芽細胞以外にも血管構成細胞や免疫細胞が存在しており、筋線維芽細胞は血管新生を促進することから [167, 170]、生体内においては他のがん微小環境構成細胞と協調してがんの増殖を間接的に促進している可能性が考えられる。本研究では、がん細胞と筋線維芽細胞の二者間での作用に焦点を当てて検討したが、がん微小環境では様々な細胞と複雑に作用していると考えられ、筋線維芽細胞と各種がん微小環境構成細胞の相互作用についても研究を行う必要がある。

また、がん細胞はがん微小環境中の細胞に作用し、自身の成長を促すサイトカイン産生を亢進させることが報告されている [171, 172]。本研究では、無刺激状態の IMF_s の培養上清ががん細胞に与える影響を検討したが、がん細胞から産生される因子、例えば本研究における HB-EGF により、IMF_s 培養上清の作用が変化する可能性がある。この点については、KCM や HB-EGF で刺激した IMF_s の培養上清が KRasV12-aMoC1 に与える影響を検討するなど、今後更なる検討が必要である。

5-3-5 IMF_s 研究における LmcMF の有用性

第 3 章において樹立した IMF_s 細胞株である LmcMF は、第 4 章における S1P に対する反応性について Primary-IMF_s と異なる反応性を示し、その有用性は研

究内容ごとに検討する必要性が示唆された。そこで、本章では Primary-IMFs を用いた検討と同時に、KCM および HB-EGF に対する LmcMF の反応性を検討し、LmcMF の有用性を検討した。

LmcMF では、wound healing assay において Primary-IMFs では認められなかった MCM による遊走の促進も認められた (図 32)。また、LmcMF においてのみ MCM による ERK1/2 のリン酸化レベルの上昇が認められた (図 36, 37)。これらの結果から、LmcMF は Primary-IMFs に比べてサイトカインの反応性が上昇している可能性が考えられる。一方、LmcMF において、Primary-IMFs と同様の KCM および HB-EGF による遊走促進が観察され、ERK1/2 および JNK1 も同様の反応を示したことから、本研究における LmcMF の有用性が示唆された。

5-3-6 結論

本研究により、結腸上皮細胞における KRas 変異が IMFs の遊走を促進し、自身の近くに引き寄せることで微小環境の構成を変化させ、がんの悪性化に利用している可能性が示唆された (図 49)。また、この機構には HB-EGF による ErbB1 を介した ERK, JNK シグナルの活性化および ErbB4 を介したシグナル伝達機構が関与していることが明らかになった。さらに、本研究における LmcMF の有用性も明らかになった。ErbB4 を介した、IMFs 遊走促進に関与するシグナル伝達機構についてはさらなる詳細な検討が必要であり、LmcMF を用いた効率的な研究が期待される。

今後は、大腸癌細胞が IMFs やその他の細胞へ与える影響をさらに詳細に検討することで、大腸癌における微小環境形成機構を解明し、がんの病態生理の理解およびがん微小環境を標的とした新たな抗がん戦略の一助となることが期待される。

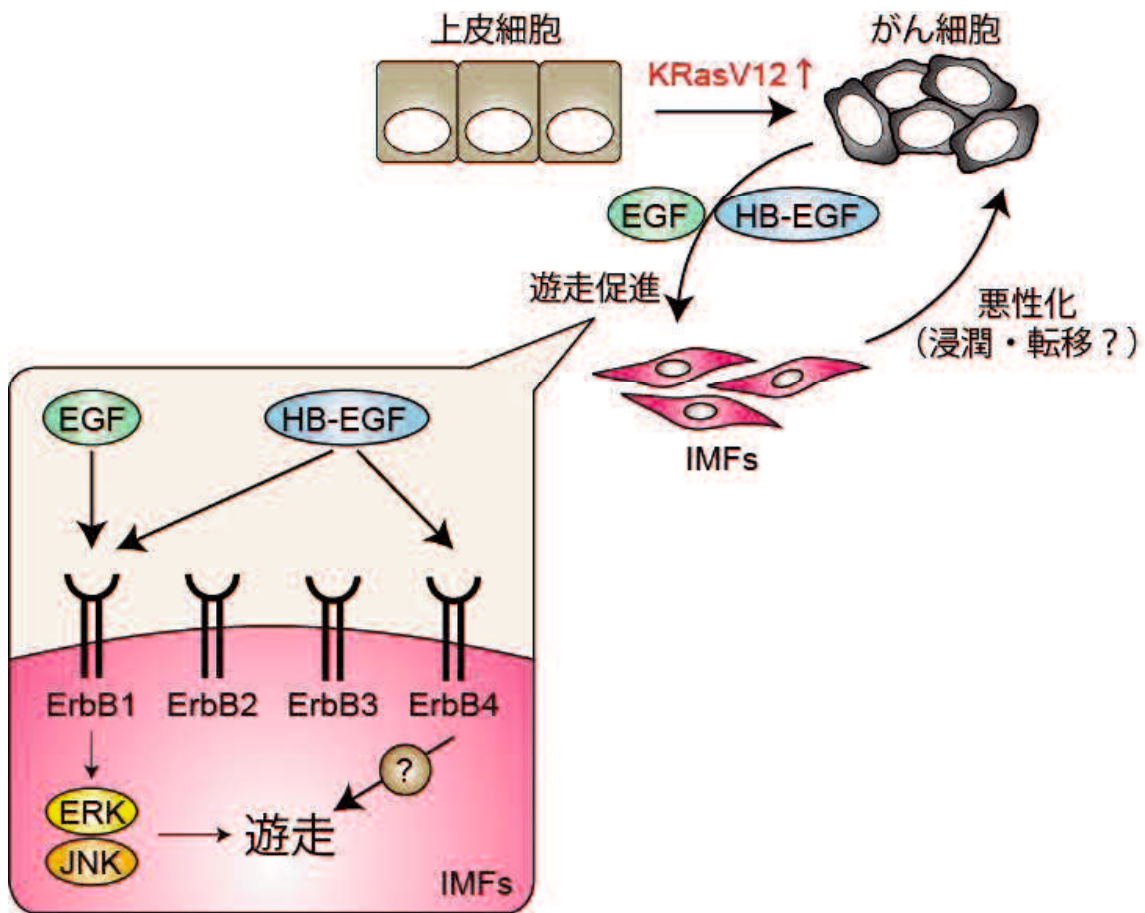


図 49 KRasV12 発現がん細胞による IMFs 遊走制御メカニズム

結腸上皮細胞において、KRasV12 発現による EGF および HB-EGF 産生量増加は、ErbB1 と ErbB4 を活性化し、ERK1/2 および JNK1 のリン酸化やその他未解明の機構を活性化することで、IMFs の遊走を促進し、自身の近くに引き寄せることでがん微小環境の形成に寄与する。また、IMFs はがん細胞の遊走や浸潤、転移を促進し、がんの悪性化に寄与する。

第6章 総合考察

近年、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するとともに、がん細胞による制御を受けたがん微小環境はがん細胞の成長を促進すると考えられてきており、がんの悪性化におけるがん細胞とがん微小環境の相互作用の重要性が注目されている。本研究はこの相互作用の解明を目指して、がん微小環境の主要な構成細胞である筋線維芽細胞に注目し、大腸癌細胞による筋線維芽細胞の制御機構を明らかにすることを目的とした。

本研究を行うにあたり、第2章および第3章では、それぞれ上皮幹細胞および筋線維芽細胞のモデル細胞の作製を行った。

第2章においては、結腸上皮幹細胞を簡便に単離するための方法としてアノイキス耐性に着目し、上皮細胞中に一部しか存在しないアノイキス耐性細胞を単離することに成功した。単離したアノイキス耐性細胞は、DCLK1 や CD133, Hopx などの幹・前駆細胞マーカーを発現しており幹細胞である可能性が示された。しかし、これらの細胞は継続培養することができず、研究に用いる為には単離・培養方法のさらなる改善が必要であることが明らかとなった。このように適切な上皮細胞モデルを作製することが出来なかったため、第4章以降の研究ではマウス結腸上皮細胞株 aMoC1 を使用した。

第3章においては、増殖が遅く寿命が短いという初代培養筋線維芽細胞の問題点を解決するため、IMFs 株化細胞の樹立を試み、成功した。異なる手法を用いて樹立した LmcMF および SmcMF の2種類の細胞株は、IMFs の細胞学的特徴を保持しており、LPS に対しても Primary-IMFs と類似した反応性を示したが、S1P 反応性は Primary-IMFs とは異なることが第4章で明らかとなった。一方、LmcMF は、第5章において KCM および HB-EGF に対して Primary-IMFs と同様

の反応性を示した。これらの結果から、LmcMF や SmcMF は IMFs の研究に有用であるが、受容体発現などが一部変化している可能性が考えられる。今後、これらの細胞株を用いた研究を行う場合は、Primary-IMFs と反応性を比較する必要性が示された。

第 4 章および第 5 章では、大腸癌細胞による筋線維芽細胞の制御機構を解明するため、上皮細胞におけるタンパク質の発現変化や変異が筋線維芽細胞制御機構に与える影響を検討した。

第 4 章では、大腸癌において発現上昇が報告されている SphK1 を正常結腸上皮細胞株である aMoC1 に過剰発現させた。SphK1 の過剰発現は、aMoC1 の表現型にはほとんど影響を与えなかったことから、細胞のがん化や悪性化には直接的には関与していないことが示唆された。一方、SphK1 により産生される SIP により筋線維芽細胞の遊走が抑制されたことから、SphK1 の過剰発現による周囲の微小環境を介した間接的ながん悪性化機構の存在が示唆された。一方、第 5 章で示したとおり、KRasV12 は aMoC1 の表現型をがん細胞様に変化させると共に、aMoC1 が筋線維芽細胞の遊走に与える影響も変化させたことから、上皮細胞における直接的な悪性化機構と、がん微小環境を介した間接的な悪性化機構の両方に関与していると考えられる。

がん細胞は、IMFs の分化やサイトカイン産生能を制御し、がん微小環境として利用している[170, 172, 173]。第 4 章および第 5 章の結果から、がん細胞による IMFs 遊走の「抑制」と「促進」という相反する制御機構の存在が示唆された。KRas の活性型変異は、大腸癌において初期段階で発生する変異であると考えられており[174]、SphK1 発現は大腸癌の悪性度と相関して上昇することが知られている[175, 176]。これらの報告から、KRasV12 を発現する初期の大腸癌細胞は IMFs の遊走を促進することで、IMFs を自身の近くに引き寄せて微小環境を構築

し、その後 SphK1 の発現上昇により IMF の遊走を抑制するようにシフトし、構築した微小環境を維持するように変化している可能性が考えられる (図 50)。第 4 章においては、SphK1 発現のみに焦点を当てて検討しているため、がん細胞において発現が変化するその他の様々な因子による総合的な作用については検討できておらず、KRasV12 と SphK1 を同時に過剰発現させるなど更なる検討が必要である。しかし、本研究により、がんのステージ段階によりがん微小環境の制御機構が異なっている可能性が示唆された。

筋線維芽細胞は、がん細胞の増殖や浸潤・転移を促進し、がんの悪性化に関与することが知られている[167]。本研究でも第 5 章において、IMFs 培養上清が KRasV12-aMoC1 の遊走・浸潤を促進した。一方、第 4 章において、IMFs 培養上清は正常 aMoC1 の増殖を抑制したことから、IMFs は正常組織において上皮細胞の増殖を抑制的に制御することで恒常性維持に寄与していると考えられる。また、IMFs 培養上清は正常 aMoC1 の増殖を 50 %程度抑制したが、KRasV12-aMoC1 の増殖を 10 %程度しか抑制しておらず、がん化した上皮細胞では IMFs による増殖抑制機構が破綻している可能性が示唆された。すなわち、がん化した上皮細胞は IMFs による増殖抑制という負の制御機構を克服し、遊走および浸潤促進という恩恵を選択的に獲得している可能性がある。また、正常組織中の線維芽細胞はがん細胞の増殖を抑制し、がん関連線維芽細胞は増殖を促進するという報告がなされており[177]、このことから、がん細胞が筋線維芽細胞に作用することで産生因子を変化させ、自身の増殖への作用を変化させる可能性が考えられる。第 4 章においては、IMFs への S1P 処置によって筋線維芽細胞が上皮細胞に与える影響は変化しなかった。しかし、KRasV12-aMoC1 培養上清を IMFs に処置することで、IMFs が産生する因子が変化し、筋線維芽細胞が上皮細胞に与える影響が変化する可能性は残っており、この点については今

後詳細な検討が必要である。

本研究により、がん細胞がステージごとに筋線維芽細胞の制御機構を変化させている可能性が示唆された。また、その制御機構として、SphK1 発現細胞による S1P を介した IMFs 遊走抑制、および KRasV12 発現細胞による HB-EGF を介した IMFs 遊走促進という二つの機構が関与している可能性を示した。また、このようにして制御された IMFs は、特にがん細胞の遊走や浸潤を促進して悪性化に寄与していると考えられる。今後は、本研究により作製されたモデル株化細胞を用いることで、がん細胞と IMFs の相互作用を効率的に検討し、さらに詳細なメカニズムを明らかにすることで、大腸癌細胞による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。

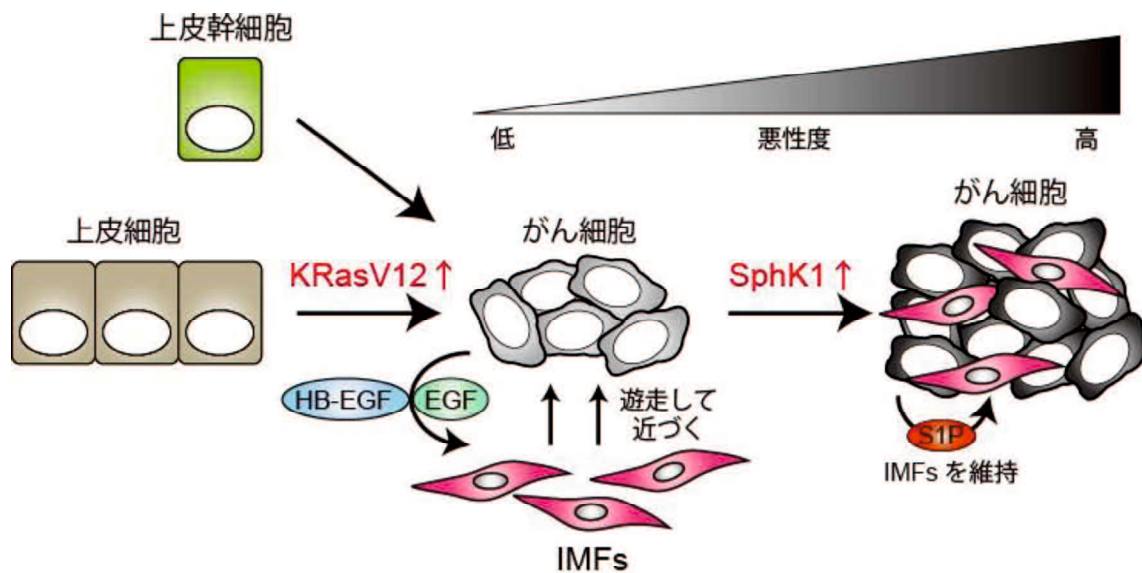


図 50 本研究の概略図

上皮細胞や上皮幹細胞は KRasV12 を発現することでがん化するが、初期段階では EGF や HB-EGF を介して IMFs の遊走を促進し、自身の近くに引き寄せることでがん微小環境を形成する。その後、がんの増悪化と相関して SphK1 の発現が上昇すると、S1P 産生を介して、引き寄せた IMFs の遊走を抑制し、自身の近くに留めることで形成したがん微小環境を維持する。

本研究で作製した、上皮幹細胞モデルや筋線維芽細胞株を用いることで、このような複雑な上皮細胞による IMFs 制御機構の詳細が解明されることが期待される。

第7章 実験材料および実験方法

7-1 細胞単離および培養法

7-1-1 マウス消化管上皮細胞単離および培養法

4~12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。マウスを麻酔した後、保定し、腹部を 70 %エタノールで消毒して開胸した。右心耳を切開後、30 U/ml のヘパリン加生理食塩水 10 ml を左心室から注入して還流させ脱血処置した。その後、開腹し、結腸組織を盲腸結合部から 3 cm 程度摘出し、腸管内をよく洗浄した。腸間膜を取り除き、腸管を切り開いて、ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有 Hanks' balanced salt solution (HBSS) で 37°C, 30 分間混合しながら処置し、これを 3 回繰り返すことで上皮層を剥離した。2 回目および 3 回目に剥離された上皮層を遠心分離後回収し、trypsin/EDTA (trypsin 0.05 %, EDTA 0.53 mM 含有 HBSS) で 37°C, 5 分間混合しながら処置した。1,500 rpm, 5 分間遠心後、沈殿した細胞を AR 細胞培地 {1 % antibiotic and antimycotic solution (AA, Invitrogen), 1 % INSULIN-TRANS-SEL-X (ITS, Invitrogen), 50 ng/ml mouse EGF (PeproTech) および 100 ng/ml mouse leukemia inhibitory factor (LIF) (ProSpec-Tany TechnoGene) 含有 Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) /F12 (Invitrogen) } で懸濁し、40 μ m のセルストレイナー (BD Biosciences) を通して単細胞にし、低付着性ディッシュ (HydroCell) に播種し、37°C, 5 % CO₂ に保ったインキュベーター (MCO-5AC, SANYO) 内で培養した。3 日後、培養液を低付着性 15 ml チューブ (Sumitomo Bakelite) に回収し、1,500 rpm, 5 分間遠心することでアポトーシスを起こした細胞の破片を取り除き、沈殿した細胞を AR 細胞培地で懸濁して低付着性ディッシュでさらに 3~5 日培養し、アノキス耐性細胞とした。なお動物の飼育ならびに使用にあたっては、山口大学の定める「国立大学法人山口

大学における動物使用に関する規則」に基づいて適正な管理のもと行った。

7-1-2 マウス腸筋線維芽細胞単離および培養法

4~12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。マウス腸筋線維芽細胞 (IMFs) は Mahida らの方法を一部変更して単離した[67]。マウスを麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた後、開腹し、結腸組織を盲腸結合部から 3 cm 程度摘出し、腸管内をよく洗浄した。腸間膜を取り除き、腸管を切り開いて、EDTA 含有 HBSS 10 ml で 30 分×3 回洗浄して上皮層を剥離した。残った結腸組織を、ピンセットを用いて粘膜層と筋層に分離し、粘膜層を 3 mm 角程度に細断して 60 mm ディッシュに押し付け、1 % AA, 10 % fetal bovine serum (FBS) を含む DMEM (Sigma Aldrich) を用い、37°C, 5 % CO₂ に保ったインキュベーター内で培養した。培養中に粘膜組織から遊走しディッシュに接着する細胞を初代培養 IMFs (Primary-IMFs) として使用した。

7-1-3 ヒト大腸癌組織由来腸筋線維芽細胞単離および培養法

1 cm 角程度に切断された大腸癌組織を HBS で 3 回洗浄し、3 mm 角程度に細断して 60 mm ディッシュに押し付け、1 % AA, 10 % FBS を含む DMEM を用いて 37°C, 5 % CO₂ に保ったインキュベーター内で培養した。培養中に粘膜組織から遊走しディッシュに接着する細胞をヒト大腸癌組織由来 IMFs (hccIMFs) として使用した。

なお、大腸癌組織は、山口大学医学部附属病院において手術を受けた患者より摘出された組織を使用した。組織の使用にあたっては、山口大学医学部附属病院の倫理審査委員会による承認を受けて適正な管理のもと行い、全ての患者において、手術前にインフォームドコンセントを得た。

HBS の組成は次の通りである。25 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) -HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl。

7-1-4 各種細胞株の培養法および培養上清回収法

一部の実験には、マウス結腸上皮細胞株 (aMoC1) [151], マウスマクロファージ様細胞株 (RAW264.7), マウス乳腺上皮細胞株 (Eph4) および胎齢 11.5 日の C57BL/6J マウスから単離したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を使用した。aMoC1 は 1 % AA, 1 % ITS, 5 % FBS を含む DMEM を用い, その他の全ての細胞は 1 % AA, 10 % FBS を含む DMEM を用いて, 37°C, 5 % CO₂ に保ったインキュベーター内で培養した。細胞の継代は培地を除去して HBS で一回洗浄した後, trypsin/EDTA (trypsin 0.05 %, EDTA 0.53 mM 含有 HBS) を加えてピペッティングすることにより細胞を剥がし行った。

培養上清を回収する細胞は, 6 well plate (TPP) に 4×10^5 cell 播き, その翌日に培地を FBS free DMEM に置換した。さらに 24 時間培養した後, 培養液を回収して室温で 3,000 g, 10 分間遠心し, 上清を使用した。また, 培養上清は最終濃度が 50 %になるように処置した。

細胞への薬物処置は, 継代した細胞を一晩培養した後に行った。なお, 必要な器具はすべて滅菌して用いた。

7-2 レンチウイルスを用いた遺伝子導入

7-2-1 プラスミドの作製

APC shRNA は, APC 遺伝子配列を標的として設計したプライマーをアニーリングした後に mCherry タグが付加された pLVmC ベクターの *ClaI/MluI* サイトに

ライゲーションすることで作製した[47]。shRNA の標的配列は以下の通りである。
なお、shAPC は shAPC#5, shAPC#6 および shAPC#7 を等量ずつ混合して用いた。

shNonTarget : 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'

shAPC#5 : 5'-GCTTTGACAAACTTGACCT-3'

shAPC#6 : 5'-GTGGATACTTTGTTACACT-3'

shAPC#7 : 5'-GGAGTGAAACTACGCTCAA-3'

SphK1 は以下に示したプライマーを用い、ヒト肺組織の cDNA を鋳型として PCR により増幅した。その後、PCR 産物を 3 × FLAG タグが付加された pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 ベクター (Takara Bio) の *EcoRI/NotI* サイトにライゲーションすることで作製した。

KRasV12 は以下に示したプライマーを用い、KRasV12 変異が認められているヒト大腸癌細胞株 SW620 の cDNA を鋳型として PCR により増幅した。その後、PCR 産物を 3 × FLAG タグが付加された pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 ベクターの *NotI/BamHI* サイトにライゲーションすることで作製した。プラスミド作製後、シーケンス解析により KRasV12 変異配列を確認した。

SphK1 : Forward : GCGGAATTCATGTCCGCTCAAGTTCTGGG

Reverse : CCCGCGGCCGCTAAGGGCTCTTCTGGCGGTG

KRas : Forward : GGGCGGCCGCGATGACTGAATATAAACTTGTGGTAG

Reverse : GCGCGGATCCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTTC

7-2-2 プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ

On ice で解凍した *E. coli* Competent Cells (XL10GOLD, Stratagene) 10 μ l にプラスミドを 0.5 μ l 加え、on ice で 30 分間静置した。恒温槽 (Dry Bath Incubator, Major Science) を用いて 42°C で 45 秒間ヒートショックを加えた後、on ice で 2

分間静置し、100 μ l の LB Broth を加え、37°C で 1 時間振とう培養した (BioShaker BR-22FP, Taitec)。その後、LB agar (100 μ g/ml ampicillin 添加) plate に播種し、37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、ガラス管に入った LB Broth (100 μ g/ml ampicillin 添加) に加え、37°C、200 rpm で一晩振とう培養した。培養液をチューブに移し、室温にて 3,000 rpm で 10 分間遠心して (Himac CR20, HITACHI)、上清を除いた後に、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。

7-2-3 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6 well plate に HEK293T 細胞を培養し、各種レンチウイルスベクタープラスミド (1 μ g)、packaging plasmid (psPAX2 ; 0.77 μ g)、VSVG coat protein plasmid (pMD2.G ; 0.43 μ g) と 2.5 μ l の Polyethylenimine “MAX” (PEI ; Polysciences) を 0.33 ml の Opti-MEM に混合した後に 30 分静置した。その後、1.5 ml の培地 (10 % FBS, 1 % AA 含有 DMEM) に加え、8 時間培養後、1.5 ml の培地に交換した。48 時間後、ウイルスを含む培地を 0.22 μ m のフィルターでろ過し、aMoC1 細胞に感染させた。その後、mCherry および ZsGreen が発現する細胞を、SH800 フローサイトメーター (SONY) を用いてソーティングし、本研究に用いた。

7-3 不死化 IMF の作製方法

Puromycin 耐性遺伝子と SV40 large T 抗原 (LT) を発現し、SV40 small t 抗原 (ST) を発現しないレンチウイルスプラスミドである EGIP-EF1a-Large T-IRES-Puro は Addgene より入手した (Addgene ID18922)。このプラスミドを用いて、上述した方法と同様に作製したレンチウイルスを Primary-IMFs に感染させ、

puromycin で 5 日間選別することで、LT を恒常的に発現する IMFs (LmcMF) を作製した。

また、Primary-IMFs を継続培養し、生存し増殖を続ける細胞を選別することで、自然不死化細胞 (SmcMF) を作製した。

7-4 細胞増殖率測定法

7-4-1 カウントによる細胞増殖率測定法

LmcMF および SmcMF を、それぞれ 35 mm ディッシュに 5×10^4 cell 播いて 3 日間培養した。培養 3 日目に血球計算盤を用いて細胞数を計測して増殖倍率を計算し、35 mm ディッシュに 5×10^4 cell の細胞数で継代し 3 日間培養した。この過程を繰り返し、継代ごとに増殖倍率を継代前の細胞数に掛け合わせていくことで細胞数の増加量を算出し、増殖能を検討した。

また、LmcMF, SmcMF をそれぞれ 5 枚の 35 mm ディッシュに 5×10^4 cell 播いて培養し、それぞれのディッシュの細胞数を 1, 3, 5, 7, 9 日後に血球計算盤を用いて計測し、増殖曲線を作成することで、接触阻止能を検討した。

7-4-2 CCK-8 を用いた細胞増殖率測定法

Primary-IMFs は 24 well plate に 2×10^4 cell, LmcMF は 6 well plate に 5×10^4 cell で播いて 24 時間培養した後、Primary-IMFs は 10 % FBS を含む DMEM で、LmcMF は 1 % FBS を含む DMEM で培地交換し、aMoC1 培養上清で処置した。aMoC1 は 12 well plate に 1×10^4 cell で播いた。各ディッシュの細胞数を播種後 1 日および 3 日後に細胞数測定用キット Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を用いて計測し、細胞の増殖率を計算した。

7-5 細胞遊走能測定法

7-5-1 Wound healing assay による細胞遊走能測定法

各種細胞を 35 mm ディッシュにコンフルエントになるように播き，FBS free DMEM で培地交換し，さらに一晩培養した。その後，イエローチップ (WATSON, 110-705Y) を用いて十字になるよう細胞を掻き取り (スクラッチ法)，FBS free DMEM で再び培地交換した後に各種試薬および培養上清で処置した。各種試薬および培養上清処置直後を 0 時間とし，時間経過による創傷部の変化を位相差顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-S, Nikon) を用いて観察した。創傷部の画像をデジタルカメラ (DS-5M-U1, Nikon) で撮影して取り込み，ImageJ (National Institutes of Health) を用いて面積を測定し数値化した。細胞の遊走率は，0 時間の創傷部の面積から各時間経過した後の創傷部の面積を引いて計測した。遊走時間は細胞の遊走能の違いから aMoC1 を 4 時間，Primary-IMFs を 12 時間，LmcMF を 6 時間，SmcMF を 8 時間とした。

なお細胞は，撮影時以外は 37°C，5 % CO₂ に保ったインキュベーター内で静置した。

7-5-2 Boyden chamber assay による細胞遊走能測定法

Boyden chamber assay は，ポアサイズ 8 μm のポリカーボネート製メンブレンインサート (Costar) を用いて行った。FBS free DMEM でインサートおよび 24 well plate を wash した後，インサートに 200 μl の FBS free DMEM で希釈した Primary-IMFs (4×10^4 cell) もしくは aMoC1 (1×10^4 cell) を播き，速やかに 800 μl の FBS free DMEM を入れた well に挿入し，37°C，5 % CO₂ に保ったインキュベーター内で静置した。2 時間後，下層 well 内の培地を目的のものに変更し，

その時点の時間を遊走開始 0 時間として、37°C、5 % CO₂ に保ったインキュベーター内で静置した。12 時間後 100 %メタノールを用いて室温、15 分間固定した後 1 時間乾燥させた。乾燥後、MilliQ で 20 倍希釈したギムザ染色液 (Muto Pure Chemicals) を用いて 15 分間染色し、MilliQ を用いて洗浄した。インサートの膜上部に残った遊走していない細胞を綿棒でぬぐい取った後スライドガラスに乗せて位相差顕微鏡を用いて観察し、遊走細胞数をカウントした。200 倍の倍率でランダムに 3~5 視野をカウントし、その平均値を遊走細胞数とした。細胞の遊走率は FBS free DMEM 存在下で遊走した細胞数を 100 %として計算した。

7-6 ソフトアガーコロニー形成試験

足場非依存性コロニー形成の検討にはソフトアガーコロニー形成試験を用いた。2.5 ml の bottom agar {1 % AA, 10 % FBS, 2.8 % NaHCO₃ (Wako), 0.75 % アガロース含有 DMEM} を 6 well plate に注ぎ、4°Cで 8 分間冷却して固めた後、その上に 1.0×10^3 cell の細胞が含まれた 1.5 ml の top agar (1 % AA, 10 % FBS, 2.8 % NaHCO₃, 0.36 % アガロース含有 DMEM) を播き培養した。2 週間後、クリスタルバイオレット染色 (Wako) を行い、形成されたコロニー数を計測した。

7-7 免疫細胞染色法

AR 細胞については、メーカーのプロトコールに従って、細胞を TACAS Slides (MBL) 上に接着・固定させた。その後、3 % skim milk 含有 PBS-T (0.05 % Tween 20 含有 PBS) を用いて室温で 30 分間振とうしてブロッキングを行い、PBS-T で洗浄後、一次抗体を加えて 4°Cで一晩振とうした。PBS-T で洗浄後、二次抗体と

して alexa Flour 488 または alexa Flour 594 (1:1,000) (Invitrogen) を用いて、遮光して室温で 2 時間振とう処置した。標本は蛍光顕微鏡 (Eclipse TE2000-S, Nikon) を用いて観察した。使用した一次抗体は表 2 に示した。

接着細胞については、microscope cover glass (Fisherbrand) 上で一晩培養した後、4 % formaldehyde を用いて室温で 20 分間、もしくはメタノールアセトン(1:1) を用いて-20°Cで 10 分間固定した。PBS-T で洗浄し、0.2 % Triton-X100 含有 PBS-T で 60 秒間脱膜化を行った後、3 % skim milk 含有 PBS-T を用いて室温で 30 分間振とうしてブロッキングを行った。PBS-T で洗浄後、一次抗体を加えて 4°Cで一晩振とうした。PBS-T で洗浄後、二次抗体として alexa Flour 594 (1:2,000) を用いて、遮光して 60 分間振とう処置した。なお、核染色には SYTOX Green (Life Technologies) (1:2,000) もしくは Hoechst 33342 (1:2,000) (Dojindo Laboratories) を用い、二次抗体と同時に 60 分間反応させた。標本は aqueous permanent mounting medium (Dbiosys) を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を用いて観察した。使用した一次抗体は表 2 に示した。

PBS の組成は次の通りである。137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄ 12H₂O。

表 2 免疫細胞染色法に用いた一次抗体

抗体および使用濃度	メーカー	カタログナンバー
CD133 (1:200)	Novus	NB120-16518
DCLK1 (1:200)	Abnova	PAB2050
E-cadherin (1:500)	BD Biosciences	610181
Vimentin (1:200)	Sigma Aldrich	V4630
α-SMA (1:200)	Sigma Aldrich	A-2547
β-catenin (1:500)	BD Biosciences	610153

7-8 免疫組織染色法

マウスから、結腸組織を盲腸結合部から 3 cm 程度摘出し、腸管内をよく洗浄し、4 % paraformaldehyde を用いて 4°C で 2 時間固定した。PBS で洗浄した後、4°C, over night で 30 % スクロースに置換し、OCT コンパウンド (Miles Laboratories) に包埋して凍結した。標本は Leica CM3050 cyostat (Leica Microsystems) を用いて 10 μm の厚さに薄切し、ポリ-L-リジンコートスライドガラスに接着させた。切片を、5 % normal donkey serum および 1 % bovine serum albumin (BSA) 含有 PBS を用いて室温で 20 分間ブロッキングし、一次抗体として anti-CD133 (1:100) (Chemicon, #MAB4310) および anti-DCLK1 (1:500) (Abnova, #PAB2050) を加えて over night, 4°C で反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として alexa Flour 488 (1:1,000) および alexa Flour 555 (1:1,000) を用いて、遮光して 60 分間室温で反応させた。PBS で洗浄後、4', 6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) を 1:1,000 で反応させ核染色を行い、Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS-SP2, Leica Microsystems) を用いて観察した。

ヒト大腸癌組織は、PBS でよく洗浄し 4 % paraformaldehyde を用いて 4°C で一晩固定した後、パラフィン包埋した。標本を 4 μm の厚さに薄切して作製した切片を、キシレンとエタノールを用いて脱パラフィン操作を行った。その後、1.4 mM クエン酸および 8.2 mM クエン酸ナトリウム含有 PBS に浸し、121°C で 5 分間オートクレーブ処理することで免疫賦活操作を行った。その後、10 % スキムミルクおよび 1 % BSA 含有 PBS を用いて室温で 30 分間ブロッキングし、一次抗体として anti- α -SMA (1:100) (Dako, #M0851) を加えて一晩、4°C で反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として alexa Flour 594 (1:500) を用いて、遮光し

て 60 分間室温で反応させた。核染色は、Hoechst 33342 (1:2,000) を二次抗体と共に反応させることで行った。PBS で洗浄後、CC/Mount (Diagnostic BioSystems) を用いて封入し、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-8100, Keyence) を用いて観察した。

7-9 フローサイトメトリー法

細胞を 96 well plate に 2×10^5 cell/well 播種し、4°C, 200 g で 5 分間遠心後、2 % FBS および 0.01 % sodium azide 含有 PBS-T (FACS Buffer) で洗浄した。その後、anti-CD16/32 (1:100) (eBioscience, #14-0161-82) で 10 分間処置することで FcR ブロッキングを行い、各種抗体 (1:100) を on ice で 30 分間処置した。各細胞は CyFlow space flow cytometer (Partec) を用いて、3,000 個の細胞を計測した。使用した一次抗体は表 3 に示した。

陽性対照として用いた脾臓細胞は、マウスの脾臓より単離した。脾臓組織を細断し、HBS と共に組織片を数回ピペッティングした後、組織片を取り除き、1,000 g で 10 分間遠心した。上清を除去した後、溶血バッファーを用いて溶血させ、さらに遠心および HBS による洗浄を行った後の細胞を用いた。

溶血バッファーの組成は次の通りである。154 mM NH_4Cl , 14 mM NaHCO_3 , 0.13 mM EDTA。混合後 pH を 7.3 に調整。

表 3 フローサイトメトリー法に用いた一次抗体

抗体	メーカー	カタログナンバー
anti-mouse CD45 rat IgG2b FITC	eBioscience	11-0451-81
anti-CD133 rat IgG1 FITC	eBioscience	12-1331-80
anti-CD326/EpCAM rat IgG2a, κ FITC	BioLegend	118207

rat monoclonal isotype control to IgG2b FITC	eBioscience	11-4031-81
rat monoclonal isotype control to IgG1 FITC	eBioscience	12-4301-81
rat monoclonal isotype control to IgG2a, κ , FITC	BioLegend	400505

7-10 RT-PCR 法による mRNA 発現量測定

7-10-1 mRNA の抽出

各種細胞を、培地除去後 HBS で洗浄し、TRIzol reagent (Invitrogen) を 250 μ l 加えて可溶化した。数回ピペティングした後、得られた細胞抽出液を 1.5 ml チューブに移し、室温で 3 分間静置した。クロロホルムを 50 μ l 加え十分に混和した後、2~3 分間室温で静置し、4°C, 15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を 100 μ l 回収してイソプロピルアルコールを 200 μ l 加え転倒混和した。10 分以上-20°C で静置した後、4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。80 %エタノールを加え、転倒混和した後、4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心した。最後に、エタノールを除去し乾燥させたのち、RNase free 超純水でペレットを溶解した。なお、total RNA 量は Nano Drop (ND-2000, Nano Drop Technologies) を用いて定量した。

7-10-2 RT-PCR 法

抽出した mRNA 0.5 μ g を PrimeScript RT-PCR kit (Takara) を用いて逆転写した。得られた cDNA を含む反応液 2 μ l に、10 \times PCR buffer II (2 μ l), dNTP Mix (0.8 μ l), PCR Forward primer (10 μ M, 0.4 μ l), PCR Reverse primer (10 μ M, 0.4 μ l), Takara Ex Taq HS (0.2 μ l), dH₂O (14.2 μ l) を加え計 20 μ l とし、サーマルサイクラー

(Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、熱変性 (94°C, 1 分間), の後に熱変性 (94°C, 30 秒間), アニーリング (60°C, 30 秒間), 伸長 (72°C, 1 分間) を 40 サイクル行い, 最後に伸長 (72°C, 2 分間) させた。なお, 用いた primer 配列は表 4 に示すとおりである。

表 4 RT-PCR に用いた Primer セット

Primer	Sequence	
Bmi1	Forward	TCCCCACTTAATGTGTGTCC
	Reverse	TTCTCCTCGGTCTTCATTGG
GAPDH	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC
	Reverse	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
Hopx	Forward	CACCACGCTGTGCCTCATCG
	Reverse	CAAAACAGCCTGGGTAAGCC
Lgr5	Forward	TAAAGACGACGGCAACAGTG
	Reverse	GAAGATCGACGATTCGGAAG
Msi1	Forward	CCTTGATTGCCACAGCCTTC
	Reverse	ATAAAAGCGACCAGGGAGAG
mTert	Forward	ACCCAGGATGTACTTTGTAAAGG
	Reverse	AGCAAACAGCTTGTTCTCCATGTC
Olfm4	Forward	GCCACTTCCAATTCAC
	Reverse	GAGCCTCTTCTCATACAC

7-10-3 Real-time PCR 法

抽出した mRNA 0.5 μ g を QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用

いて逆転写した。合成された cDNA を QuantiTect SYBR I Kit (QIAGEN) および CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、熱変性 (95°C, 15 分間), の後に熱変性 (94°C, 15 秒間), アニール (60°C, 30 秒間), 伸長 (72°C, 30 秒間) を 45 サイクルまで行った。Melt curve stage では 95°C, 15 秒間, 65°C, 5 秒間の後, 0.5°C ずつ段階的に 95°C まで上昇させた。使用したプライマーは表 5 に示した。各 mRNA 発現量は β -actin をローディングコントロールとして相対的に評価した。

表 5 Real-time PCR に用いた Primer セット

Primer	Sequence	
EGF	Forward	CCCAGGCAACGTATCAAAGT
	Reverse	GGTCATACCCAGGAAAGCAA
HB-EGF	Forward	GACCCATGCCTCAGGAAATA
	Reverse	TGAGAAGTCCCACGATGACA
IGF-1	Forward	TTCAGTTCGTGTGTGGACCGAG
	Reverse	TCCACAATGCCTGTCTGAGGTG
IL-6	Forward	CACGGCCTTCCCTACTTCAC
	Reverse	TGCAAGTGCATCATCGTTGT
TGF- β 1	Forward	TTGCTTCAGCTCCACAGAGA
	Reverse	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
TNF- α	Forward	AGACCCTCACACTCAGATCATCTTC
	Reverse	TTGCTACGACGTGGGCTACA
β -actin	Forward	GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC
	Reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGC

7-11 Western blotting 法によるタンパク質発現量測定

7-11-1 タンパク質抽出法

培養細胞の培地を除去した後、あらかじめ on ice で冷やしておいた HBS で一回洗浄し、lysate buffer を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞抽出液を on ice で 5 分間静置した後に 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、上清をタンパク質サンプルとして使用した。平滑筋組織からのタンパク質抽出は、筋線維芽細胞を単離する際に分離した筋層標本を使用した。標本を洗浄し細断した後に、lysate buffer を加えピペッティングし、on ice で 15 分静置した。その後 15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心し、上清をタンパク質サンプルとして使用した。得られたサンプルのタンパク質濃度は、BioRad DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowly 法により測定した。

使用した lysate buffer の組成は以下のとおりである。50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (pH 8.0), 1 mM Na₃VO₄, 20 mM sodium pyrophosphate, 1 % triton X-100, 1 tablet/50 ml protease inhibitor cocktail (Roche)。

7-11-2 Western blotting 法

得られたタンパク質サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動し分離した後、転写装置 (TRANS-BLOT SD, BIO-RAD) を用いて PVDF 膜 (BIO-RAD) もしくはニトロセルロース膜 (Wako) に転写した。PVDF 膜もしくはニトロセルロース膜を、3 % スキムミルク含有 TBS-T (0.05 % Tween20 含有 TBS) を用いて室温で 30 分間、もしくは 0.5 % スキムミルク含有 TBS-T を用いて室温で 1 時間振とうし (Wave-SI, TAITEC)、ブロッキング処置した後、一次抗体を 4°C で

振とうしながら一晩反応させた。洗浄後、二次抗体として HRP anti-mouse IgG, HRP anti-rabbit IgG, HRP anti-goat IgG (R&D Systems) (1:10,000) を用いて、室温で1時間反応させ、ECL (GE Healthcare) もしくは ECL Pro (PerkinElmer) で発光させ LAS3000 (FUJIFILM) を用いて観察した。使用した一次抗体は表 6 に示した。

TBS の組成は次の通りである。25 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) - HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl。

表 6 Western blotting 法に用いた一次抗体

抗体	メーカー	カタログナンバー
Actin	Santa Cruz	SC-1615
CD14	Santa Cruz	SC-9150
CD44	Bethyl Laboratories	A303-872A
Collagen Type I	Merck Millipore	234167
Desmin	Thermo Scientific	RB-9014
E-cadherin	Cell Signaling	4065
IκBα	Cell Signaling	4814
Lgr5	Abgent	AP2745D-EV
MD-2	Bio-Rad	AHP1717T
Pan-Ras	Merck Millipore	OP40
Phospho-Stat3 (Tyr705)	Cell Signaling	9145
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Cell Signaling	9234
Phospho-Akt(Ser473)	Cell Signaling	9271
Phospho-GSK-3β(Ser9)	Cell Signaling	D85E12
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Promega	V7931

Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	9216
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	9101
Phospho-YAP (Ser127)	Cell Signaling	13008
Rac1	Merck Millipore	05-389
SphK1	ECM Biosciences	SP1621
TLR4	Santa Cruz	SC-16240
Tubulin- α	Thermo Scientific	RB-9281-P0
Vimentin	Sigma Aldrich	V4630
c-Myc	Cell Signaling	D84C12
p97/VCP	GeneTex	GTX113030
α -SMA	Sigma Aldrich	A-2547
α -catenin	BD Biosciences	610193
β -catenin	BD Biosciences	610153

7-12 Rac1 活性測定法

7-12-1 GST-Pak1 beads 作製法

On ice で解凍した BL21 cells (Takara Bio) 10 μ l に pGEXTK-Pak1 70-117 ベクター (Addgene, #12217) を 0.2 μ l 加え, on ice で 30 分間静置した。恒温槽を用いて 42°C で 45 秒間ヒートショックを加えた後, on ice で 2 分間静置し, 100 μ l の LB Broth を加え, 37°C で 1 時間振とう培養した。その後, LB agar (100 μ g/ml ampicillin 添加) plate に播種し, 37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し, ガラス管に入った 5 ml の LB Broth (100 μ g/ml ampicillin 添加) に加え, 37°C,

200 rpm で一晩振とう培養した。培養液を 100 ml の LB Broth (100 µg/ml ampicillin, 2 %エタノール添加)に加えて、適宜 Nano Drop を用いて O.D.600 を測定しながら、0.1 程度になるまで 37°C, 200 rpm で振とう培養した。その後、培養液に IPTG (Inalco Pharmaceuticals) を 0.1 mM になるように加えて、37°C, 200 rpm で 3 時間振とう培養した。培養液を 50 ml チューブに移し、3,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨て沈殿した大腸菌を 40 ml の氷冷した PBS で懸濁し、3,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、20 ml の氷冷した GST buffer を加えて懸濁し、bacterio-lysis solution を加えてよく混合し-80°Cで一晩静置した。凍結液を室温で徐々に溶解した後、0.3 ml の 0.5 M MgCl₂ および 10 µl の 10 mg/ml DNase I (Worthington Biochemical Corporation) を加えて混合し、10 分間静置した。On ice で 30 秒間のソニケーションを 10 回程度行い、溶液を 2 ml チューブに分注して 15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を平衡化した Glutathione Agarose 4B (Peptron) の入ったチューブに加えて、4°Cで 30 分間混合することで GST-Pak1 を Glutathione Agarose 4B に結合させた。Glutathione Agarose 4B の平衡化は、500 µl の Glutathione Agarose 4B を 50 ml チューブに入れ、5 ml の GST buffer を加えて混合し、1,500 rpm で 2 分間遠心した後上清を取り除くことで行った。GST-Pak1 を結合させた Glutathione Agarose 4B は 1,500 rpm で 2 分間遠心して上清を捨て、10 ml の wash buffer で懸濁することで洗浄し、これを 2 回繰り返した。洗浄後の beads を 300 µl の GST buffer と 200 µl のグリセロールを混合した溶液でよく混合し、これを GST-Pak1 beads として用いた。

使用した各種バッファの組成は以下の通りである。

GST buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 0.04 % β-mercaptoethanol
1 tablet protease inhibitor cocktail (Roche) /50 ml。

Bacterio-lysis buffer : 12 mg lysozyme (PanReac AppliChem) , 25 μ l EDTA (0.5 M) , 10 μ l trypsin inhibitor lima bean (10 mg/ml ; Worthington Biochemical Corporation) , 2 ml Triton-X 100 (10 %) , to 20 ml GST buffer.

Wash buffer : 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 200 mM NaCl , 0.5 % triton-X 100 , 1 mM EDTA.

7-12-2 Rac1 活性測定法

Primary-IMFs を 10 cm ディッシュに 3×10^5 cell 播いて一晩培養し , FBS free DMEM で培地交換し , さらに 72 時間培養した。各種試薬を処置した後に氷冷した cell wash buffer で洗浄し , 500 μ l の lysate buffer を加え , on ice で 5 分間静置して細胞を可溶化させた。得られた細胞抽出液を 15,000 rpm で 5 分間遠心し , 上清に beads wash buffer で洗浄した GST-Pac1 beads を 5 μ l 加え , 4°C で 30 分間反応させた。6,000 g で 1 分間遠心し , 上清を捨て , 500 μ l の beads wash buffer で洗浄し , もう一度遠心 , 洗浄を繰り返し行った。Beads を新しい 1.5 ml チューブに移して 6,000 g で 1 分間遠心し , 上清を捨て 2 \times SDS sample buffer で希釈して western blotting 法に使用した。

使用した各種バッファの組成は以下の通りである。

Cell wash buffer : 25 mM HEPES , 150 mM NaCl , 1 mM MgCl₂ , 0.5 mM CaCl₂。

Lysate buffer : 50 mM Tris-NaOH (pH 7.4) , 100 mM NaCl , 2 mM MgCl₂ , 1 % NP-40 , 10 % glycerol , 1 tablet protease inhibitor cocktail (Roche) /50 ml。

Beads wash buffer : lysate buffer から protease inhibitor cocktail を除いたもの。

2 \times SDS sample buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 1 % SDS , 6 % β -mercaptoethanol , 2 % Glycerol。

7-13 ELISA 法

aMoC1 を 35 mm dish に 4×10^5 cell 播種し, その翌日に 750 μ l の FBS free DMEM で培地交換した。さらに 48 時間培養した後, 培養液を回収して室温で 3,000 g, 10 分間遠心し, 上清を使用した。それぞれ 200 μ l の上清を用いて, 含有 HB-EGF 量を Mouse HBEGF ELISA Kit (LSBio, #LS-F5901) を用いて計測した。

7-14 使用薬物

Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 055 : B5, HB-EGF, FR180204 (Sigma Aldrich), sphingosine-1-phosphate, W146, JTE-013, CAY10444, Y27632, SP600125 (Cayman Chemical), Dulbecco's modified Eagle's medium, Antibiotic-Antimycotic, fetal bovine serum Qualified (Invitrogen), EGF, IL-6 (Pepro Tech Inc.), TGF- β 1 (AMBiS), TNF- α , Dacomitinib (Wako), IGF-1 (Prospec-Tany TechnoGene Ltd.), Gefitinib (Santa Cruz), Rac1 inhibitor II (Merck Millipore), ECL Western Blotting Detection Reagentd (GE Healthcare), Western Lightning ECL Pro (Perkin Elmer)。

7-15 統計処理

2 群間の有意差検定には t-test を行い, 2 群を越える群間での有意差検定には one-way ANOVA を用いた後 Tukey's test を行い, 危険率 (P) が 5 %未満の場合を有意差ありとした。

引用文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108. doi: 10.3322/caac.21262. PubMed PMID: 25651787.
2. Quante M, Varga J, Wang TC, Greten FR. The gastrointestinal tumor microenvironment. *Gastroenterology*. 2013;145(1):63-78. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.052. PubMed PMID: 23583733; PubMed Central PMCID: PMC4012393.
3. Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT, Huang H, Feingersh D, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(9):846-56. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0040. PubMed PMID: 24872026.
4. Yanagisawa M, Fujimoto-Ouchi K, Yorozu K, Yamashita Y, Mori K. Antitumor activity of bevacizumab in combination with capecitabine and oxaliplatin in human colorectal cancer xenograft models. *Oncol Rep*. 2009;22(2):241-7. PubMed PMID: 19578762.
5. Li XY, Hu SQ, Xiao L. The cancer-associated fibroblasts and drug resistance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(11):2112-9. PubMed PMID: 26125276.
6. Tahara E. Abnormal growth factor/cytokine network in gastric cancer. *Cancer Microenviron*. 2008;1(1):85-91. doi: 10.1007/s12307-008-0008-1. PubMed PMID: 19308687; PubMed Central PMCID: PMC4012393.
7. Avgustinova A, Iravani M, Robertson D, Fearn A, Gao Q, Klingbeil P, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun*. 2016;7:10305. doi: 10.1038/ncomms10305. PubMed PMID: 26777421; PubMed Central PMCID: PMC4735631.
8. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010;12(5):468-76. doi: 10.1038/ncb2048. PubMed PMID: 20418870.
9. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*. 2011;19(2):257-72. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.020. PubMed PMID: 21316604; PubMed Central PMCID: PMC3060401.
10. Hosaka K, Yang Y, Seki T, Fischer C, Dubey O, Fredlund E, et al. Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(38):E5618-27. doi: 10.1073/pnas.1608384113. PubMed PMID: 27608497;

PubMed Central PMCID: PMCPMC5035870.

11. Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, et al. TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*. 2011;30(4):783-95. doi: 10.1038/emboj.2010.351. PubMed PMID: 21224849; PubMed Central PMCID: PMCPMC3041949.
12. Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW. Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(5):G684-96. doi: 10.1152/ajpgi.00474.2010. PubMed PMID: 21252048; PubMed Central PMCID: PMCPMC3094146.
13. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999;277(1 Pt 1):C1-9. PubMed PMID: 10409103.
14. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 1):C183-201. PubMed PMID: 10444394.
15. Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, Brittan M, Wright NA. Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response. *J Gastroenterol*. 2005;40(12):1089-99. doi: 10.1007/s00535-005-1727-4. PubMed PMID: 16378172.
16. Walton KL, Holt L, Sartor RB. Lipopolysaccharide activates innate immune responses in murine intestinal myofibroblasts through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(3):G601-11. doi: 10.1152/ajpgi.00022.2008. PubMed PMID: 19136385; PubMed Central PMCID: PMCPMC2660170.
17. McKaig BC, Makh SS, Hawkey CJ, Podolsky DK, Mahida YR. Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF- β 3. *Am J Physiol*. 1999;276(5 Pt 1):G1087-93. PubMed PMID: 10329998.
18. Husøy T, Knutsen HK, Cruciani V, Olstørn HB, Mikalsen SO, Løberg EM, et al. Connexin43 is overexpressed in Apc(Min/+)-mice adenomas and colocalises with COX-2 in myofibroblasts. *Int J Cancer*. 2005;116(3):351-8. doi: 10.1002/ijc.21025. PubMed PMID: 15800939.
19. Roberts HR, Smartt HJ, Greenhough A, Moore AE, Williams AC, Paraskeva C. Colon tumour cells increase PGE(2) by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation. *Carcinogenesis*. 2011;32(11):1741-7. doi: 10.1093/carcin/bgr210. PubMed PMID: 21926111.
20. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer

- therapy resistance through WNT16B. *Nat Med.* 2012;18(9):1359-68. doi: 10.1038/nm.2890. PubMed PMID: 22863786; PubMed Central PMCID: PMCPMC3677971.
21. Quante M, Wang TC. Stem cells in gastroenterology and hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;6(12):724-37. doi: 10.1038/nrgastro.2009.195. PubMed PMID: 19884893; PubMed Central PMCID: PMCPMC2902988.
 22. Barker N, Clevers H. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1681-96. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.002. PubMed PMID: 20417836.
 23. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449(7165):1003-7. doi: 10.1038/nature06196. PubMed PMID: 17934449.
 24. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-5. doi: 10.1038/nature07935. PubMed PMID: 19329995.
 25. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science.* 2010;327(5965):542-5. doi: 10.1126/science.1180794. PubMed PMID: 20110496; PubMed Central PMCID: PMCPMC4105182.
 26. Sangiorgi E, Capecchi MR. *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet.* 2008;40(7):915-20. doi: 10.1038/ng.165. PubMed PMID: 18536716; PubMed Central PMCID: PMCPMC2906135.
 27. May R, Riehl TE, Hunt C, Sureban SM, Anant S, Houchen CW. Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. *Stem Cells.* 2008;26(3):630-7. doi: 10.1634/stemcells.2007-0621. PubMed PMID: 18055444.
 28. Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, et al. A reserve stem cell population in small intestine renders *Lgr5*-positive cells dispensable. *Nature.* 2011;478(7368):255-9. doi: 10.1038/nature10408. PubMed PMID: 21927002; PubMed Central PMCID: PMCPMC4251967.
 29. Snippert HJ, van Es JH, van den Born M, Begthel H, Stange DE, Barker N, et al. Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 2009;136(7):2187-94.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.002. PubMed PMID: 19324043.
 30. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; *musashi-1*. *Differentiation.* 2003;71(1):28-41. PubMed PMID: 12558601.

31. van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, Kujala P, Haegebarth A, Stange DE, et al. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell*. 2009;136(5):903-12. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.031. PubMed PMID: 19269367.
32. Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, Henderson DE, et al. Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(1):179-84. Epub 2010/12/20. doi: 10.1073/pnas.1013004108. PubMed PMID: 21173232; PubMed Central PMCID: PMC3017192.
33. Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, Wang Q, Lu MM, Epstein JA. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*. 2011;334(6061):1420-4. doi: 10.1126/science.1213214. PubMed PMID: 22075725; PubMed Central PMCID: PMC3705713.
34. Bloemendaal AL, Buchs NC, George BD, Guy RJ. Intestinal stem cells and intestinal homeostasis in health and in inflammation: A review. *Surgery*. 2016;159(5):1237-48. doi: 10.1016/j.surg.2016.01.014. PubMed PMID: 26936524.
35. van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Nee AN, Gregorieff A, et al. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1099-104. doi: 10.1038/ncb2581. PubMed PMID: 23000963; PubMed Central PMCID: PMC3789123.
36. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ*. 2008;15(6):947-58. doi: 10.1038/cdd.2008.20. PubMed PMID: 18259194.
37. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13427-32. doi: 10.1073/pnas.0805706105. PubMed PMID: 18765800; PubMed Central PMCID: PMC32533206.
38. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-5. doi: 10.1038/nature05384. PubMed PMID: 17122771.
39. Rao GH, Liu HM, Li BW, Hao JJ, Yang YL, Wang MR, et al. Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):793-804. doi: 10.1038/aps.2013.56. PubMed PMID: 23736004; PubMed Central PMCID: PMC3674520.
40. Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, Lan HY, Su SH, Chang SC, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*. 2011;141(1):279-91, 91.e1-5. doi:

10.1053/j.gastro.2011.04.008. PubMed PMID: 21640118.

41. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013;152(1-2):25-38. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.012. PubMed PMID: 23273993.

42. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009;457(7229):608-11. doi: 10.1038/nature07602. PubMed PMID: 19092804.

43. Xie X, Teknos TN, Pan Q. Are all cancer stem cells created equal? *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(10):1111-5. doi: 10.5966/sctm.2014-0085. PubMed PMID: 25122687; PubMed Central PMCID: PMC4181401.

44. Dekaney CM, Rodriguez JM, Graul MC, Henning SJ. Isolation and characterization of a putative intestinal stem cell fraction from mouse jejunum. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1567-80. doi: 10.1053/j.gastro.2005.08.011. PubMed PMID: 16285956.

45. Zhan M, Zhao H, Han ZC. Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol*. 2004;19(3):973-83. PubMed PMID: 15168359.

46. Coles BL, Angénieux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15772-7. doi: 10.1073/pnas.0401596101. PubMed PMID: 15505221; PubMed Central PMCID: PMC524825.

47. McCaffrey LM, Macara IG. The Par3/aPKC interaction is essential for end bud remodeling and progenitor differentiation during mammary gland morphogenesis. *Genes Dev*. 2009;23(12):1450-60. doi: 10.1101/gad.1795909. PubMed PMID: 19528321; PubMed Central PMCID: PMC2701573.

48. Lin PT, Gleeson JG, Corbo JC, Flanagan L, Walsh CA. DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J Neurosci*. 2000;20(24):9152-61. PubMed PMID: 11124993.

49. Shu T, Tseng HC, Sapir T, Stern P, Zhou Y, Sanada K, et al. Doublecortin-like kinase controls neurogenesis by regulating mitotic spindles and M phase progression. *Neuron*. 2006;49(1):25-39. doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.039. PubMed PMID: 16387637.

50. Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG. Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron*. 2006;49(1):55-66. doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.040. PubMed PMID: 16387639.

51. May R, Sureban SM, Hoang N, Riehl TE, Lightfoot SA, Ramanujam R, et al. Doublecortin and CaM kinase-like-1 and leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled

receptor mark quiescent and cycling intestinal stem cells, respectively. *Stem Cells*. 2009;27(10):2571-9. doi: 10.1002/stem.193. PubMed PMID: 19676123; PubMed Central PMCID: PMC3049723.

52. Giannakis M, Stappenbeck TS, Mills JC, Leip DG, Lovett M, Clifton SW, et al. Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11292-300. doi: 10.1074/jbc.M512118200. PubMed PMID: 16464855.

53. Gagliardi G, Moroz K, Bellows CF. Immunolocalization of DCAMKL-1, a putative intestinal stem cell marker, in normal colonic tissue. *Pathol Res Pract*. 2012;208(8):475-9. doi: 10.1016/j.prp.2012.05.015. PubMed PMID: 22749579.

54. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*. 2011;192(5):767-80. doi: 10.1083/jcb.201010127. PubMed PMID: 21383077; PubMed Central PMCID: PMC3051826.

55. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-12. PubMed PMID: 9389720.

56. Ren F, Sheng WQ, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol*. 2013;19(17):2603-11. doi: 10.3748/wjg.v19.i17.2603. PubMed PMID: 23674867; PubMed Central PMCID: PMC3645378.

57. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(4):715-9. doi: 10.1016/j.biocel.2004.08.010. PubMed PMID: 15694831.

58. Mak AB, Nixon AM, Kittanakom S, Stewart JM, Chen GI, Curak J, et al. Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep*. 2012;2(4):951-63. doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.016. PubMed PMID: 23084749; PubMed Central PMCID: PMC3590846.

59. Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature*. 2009;457(7229):603-7. doi: 10.1038/nature07589. PubMed PMID: 19092805; PubMed Central PMCID: PMC3049723.

60. Itzkovitz S, Lyubimova A, Blat IC, Maynard M, van Es J, Lees J, et al. Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nat Cell Biol*. 2011;14(1):106-14. doi: 10.1038/ncb2384. PubMed PMID: 22119784; PubMed Central PMCID: PMC3292866.

61. de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, et al. Lgr5 homologues

- associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*. 2011;476(7360):293-7. doi: 10.1038/nature10337. PubMed PMID: 21727895.
62. Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, et al. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology*. 2003;37(3):528-33. doi: 10.1053/jhep.2003.50029. PubMed PMID: 12601349.
63. Guney I, Wu S, Sedivy JM. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3645-50. doi: 10.1073/pnas.0600069103. PubMed PMID: 16537449; PubMed Central PMCID: PMCPMC1450136.
64. Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):466-71. doi: 10.1073/pnas.1118857109. PubMed PMID: 22190486; PubMed Central PMCID: PMCPMC3258636.
65. Muñoz J, Stange DE, Schepers AG, van de Wetering M, Koo BK, Itzkovitz S, et al. The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J*. 2012;31(14):3079-91. doi: 10.1038/emboj.2012.166. PubMed PMID: 22692129; PubMed Central PMCID: PMCPMC3400017.
66. Scoville DH, Sato T, He XC, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology*. 2008;134(3):849-64. doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.079. PubMed PMID: 18325394.
67. Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Göke M, Gray T, Podolsky DK, et al. Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol*. 1997;273(6 Pt 1):G1341-8. PubMed PMID: 9435560.
68. Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283(3):G809-18. doi: 10.1152/ajpgi.00057.2002. PubMed PMID: 12181198.
69. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem*. 2005;280(43):36099-109. doi: 10.1074/jbc.M505291200. PubMed PMID: 16141211.
70. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059. PubMed PMID: 18242222.
71. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(5):353-63. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.04.001. PubMed PMID: 17481951.

72. Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, et al. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 2002;22(10):3389-403. PubMed PMID: 11971971; PubMed Central PMCID: PMC133789.
73. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1087-95. doi: 10.1038/ni1255. PubMed PMID: 16186825.
74. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, et al. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 2007;46(1):26-36. doi: 10.1016/j.jhep.2006.08.018. PubMed PMID: 17112629.
75. Steele SL, Wu Y, Kolb RJ, Gooz M, Haycraft CJ, Keyser KT, et al. Telomerase immortalization of principal cells from mouse collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6):F1507-14. doi: 10.1152/ajprenal.00183.2010. PubMed PMID: 20926633; PubMed Central PMCID: PMC3006301.
76. Rundell K, Parakati R. The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin Cancer Biol.* 2001;11(1):5-13. doi: S1044-579X(00)90341-9 [pii] 10.1006/scbi.2000.0341. PubMed PMID: 11243894.
77. Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol.* 2001;11(1):15-23. doi: 10.1006/scbi.2000.0342. PubMed PMID: 11243895.
78. Chen W, Possemato R, Campbell KT, Plattner CA, Pallas DC, Hahn WC. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell.* 2004;5(2):127-36. PubMed PMID: 14998489.
79. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol.* 2012;41(5):1561-9. doi: 10.3892/ijo.2012.1611. PubMed PMID: 22941386; PubMed Central PMCID: PMC3583695.
80. Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science.* 1995;269(5228):1267-70. PubMed PMID: 7544492.
81. Berthon P, Mirossay L, Ito S, Calvo F, Gespach C. Functional expression of VIP receptors in normal, immortalized and transformed mammary epithelial cells. *Life Sci.* 1992;50(11):791-8. PubMed PMID: 1311049.
82. Reeves A, Zagurovskaya M, Gupta S, Shareef MM, Mohiuddin M, Ahmed MM.

Inhibition of transforming growth factor- β signaling in normal lung epithelial cells confers resistance to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;68(1):187-95. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.12.057. PubMed PMID: 17448872; PubMed Central PMCID: PMCPMC1948025.

83. Pinchuk IV, Mifflin RC, Saada JI, Powell DW. Intestinal mesenchymal cells. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12(5):310-8. doi: 10.1007/s11894-010-0135-y. PubMed PMID: 20690004; PubMed Central PMCID: PMCPMC2975955.

84. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4219-23. PubMed PMID: 8633044; PubMed Central PMCID: PMCPMC39515.

85. Arentz G, Chataway T, Price TJ, Izwan Z, Hardi G, Cummins AG, et al. Desmin expression in colorectal cancer stroma correlates with advanced stage disease and marks angiogenic microvessels. *Clin Proteomics.* 2011;8(1):16. doi: 10.1186/1559-0275-8-16. PubMed PMID: 22141345; PubMed Central PMCID: PMCPMC3259060.

86. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *J Cell Biol.* 1998;142(3):873-81. PubMed PMID: 9700173; PubMed Central PMCID: PMCPMC2148176.

87. Kohan M, Muro AF, White ES, Berkman N. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to α 4 β 7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *FASEB J.* 2010;24(11):4503-12. doi: 10.1096/fj.10-154435. PubMed PMID: 20643910.

88. Muro AF, Moretti FA, Moore BB, Yan M, Atrasz RG, Wilke CA, et al. An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(6):638-45. doi: 10.1164/rccm.200708-1291OC. PubMed PMID: 18096707; PubMed Central PMCID: PMCPMC2267338.

89. Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maéda Y, Narita A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature.* 2009;457(7228):441-5. doi: 10.1038/nature07685. PubMed PMID: 19158791.

90. Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, et al. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology.* 2007;133(1):137-49. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.069. PubMed PMID: 17631138.

91. Montesano R, Soriano JV, Fialka I, Orci L. Isolation of EpH4 mammary epithelial cell subpopulations which differ in their morphogenetic properties. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998;34(6):468-77. PubMed PMID: 9661050.

92. Ide T. [Mechanism of cell proliferation--cell cycle, oncogenes, and senescence]. *Yakugaku Zasshi*. 2006;126(11):1087-115. PubMed PMID: 17077613.
93. Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(1):41-7. PubMed PMID: 11163149.
94. Saada JI, Pinchuk IV, Barrera CA, Adegboyega PA, Suarez G, Mifflin RC, et al. Subepithelial myofibroblasts are novel nonprofessional APCs in the human colonic mucosa. *J Immunol*. 2006;177(9):5968-79. PubMed PMID: 17056521.
95. Pinchuk IV, Beswick EJ, Saada JI, Boya G, Schmitt D, Raju GS, et al. Human colonic myofibroblasts promote expansion of CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T cells. *Gastroenterology*. 2011;140(7):2019-30. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.059. PubMed PMID: 21376048; PubMed Central PMCID: PMC3109194.
96. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-82. PubMed PMID: 10359581; PubMed Central PMCID: PMC2193086.
97. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2004;126(4):1054-70. PubMed PMID: 15057745.
98. Kohno M, Momoi M, Oo ML, Paik JH, Lee YM, Venkataraman K, et al. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2006;26(19):7211-23. doi: 10.1128/MCB.02341-05. PubMed PMID: 16980623; PubMed Central PMCID: PMC1592880.
99. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2007;115(1):84-105. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.04.006. PubMed PMID: 17561264.
100. Pyne NJ, Tonelli F, Lim KG, Long JS, Edwards J, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(1):94-100. doi: 10.1042/BST20110602. PubMed PMID: 22260672.
101. Rolin J, Maghazachi AA. Effects of lysophospholipids on tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2011;4(3):393-403. doi: 10.1007/s12307-011-0088-1. PubMed PMID: 21904916; PubMed Central PMCID: PMC3234328.
102. Li C, Zheng S, You H, Liu X, Lin M, Yang L, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptors are involved in human liver fibrosis by action on hepatic myofibroblasts motility. *J Hepatol*. 2011;54(6):1205-13. doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.028. PubMed PMID: 21145832.
103. Ohama T, Okada M, Murata T, Brautigan DL, Hori M, Ozaki H.

Sphingosine-1-phosphate enhances IL-1 β -induced COX-2 expression in mouse intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(4):G766-75. doi: 10.1152/ajpgi.90423.2008. PubMed PMID: 18703638.

104. Long J, Xie Y, Yin J, Lu W, Fang S. SphK1 promotes tumor cell migration and invasion in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(5):6831-6. doi: 10.1007/s13277-015-4542-4. PubMed PMID: 26662312.

105. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract.* 2015;211(8):557-69. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.010. PubMed PMID: 26092594.

106. Grant CM, Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):202-11. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.04. PubMed PMID: 25346895; PubMed Central PMCID: PMC4208065.

107. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature.* 2011;474(7351):318-26. doi: 10.1038/nature10212. PubMed PMID: 21677748.

108. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(1):G2-7. doi: 10.1152/ajpgi.00075.2005. PubMed PMID: 15961883.

109. Du J, Jiang B, Coffey RJ, Barnard J. Raf and RhoA cooperate to transform intestinal epithelial cells and induce growth resistance to transforming growth factor beta. *Mol Cancer Res.* 2004;2(4):233-41. PubMed PMID: 15140945.

110. Gibbons AV, Lin JE, Kim GW, Marszalowicz GP, Li P, Stoecker BA, et al. Intestinal GUCY2C prevents TGF- β secretion coordinating desmoplasia and hyperproliferation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013;73(22):6654-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0887. PubMed PMID: 24085786; PubMed Central PMCID: PMC3838632.

111. Wang D, Fu L, Sun H, Guo L, DuBois RN. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology.* 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.064. PubMed PMID: 26261008.

112. Oshima H, Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol.* 2012;47(2):97-106. doi: 10.1007/s00535-011-0523-6. PubMed PMID: 22218775.

113. Ikeda H, Satoh H, Yanase M, Inoue Y, Tomiya T, Arai M, et al. Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology.* 2003;124(2):459-69. doi: 10.1053/gast.2003.50049. PubMed PMID:

12557151.

114. Vogler R, Sauer B, Kim DS, Schäfer-Korting M, Kleuser B. Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* 2003;120(4):693-700. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12096.x. PubMed PMID: 12648236.

115. Inoki I, Takawa N, Sugimoto N, Yoshioka K, Takata S, Kaneko S, et al. Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(1):293-300. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.119. PubMed PMID: 16756949.

116. Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* 2005;65(9):3788-95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2311. PubMed PMID: 15867375.

117. Takashima S, Sugimoto N, Takawa N, Okamoto Y, Yoshioka K, Takamura M, et al. G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc Res.* 2008;79(4):689-97. doi: 10.1093/cvr/cvn118. PubMed PMID: 18480127.

118. Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol.* 1999;147(3):545-58. PubMed PMID: 10545499; PubMed Central PMCID: PMCPMC2151183.

119. Lee H, Deng J, Kujawski M, Yang C, Liu Y, Herrmann A, et al. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med.* 2010;16(12):1421-8. doi: 10.1038/nm.2250. PubMed PMID: 21102457; PubMed Central PMCID: PMCPMC3088498.

120. Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, et al. Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell.* 2013;23(1):107-20. doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.013. PubMed PMID: 23273921; PubMed Central PMCID: PMCPMC3578577.

121. Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, et al. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 2003;22(20):5491-500. doi: 10.1093/emboj/cdg540. PubMed PMID: 14532121; PubMed Central PMCID: PMCPMC213794.

122. Trobridge P, Knoblaugh S, Washington MK, Munoz NM, Tsuchiya KD, Rojas A, et al. TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway. *Gastroenterology.* 2009;136(5):1680-8.e7. doi:

10.1053/j.gastro.2009.01.066. PubMed PMID: 19208363; PubMed Central PMCID: PMCPMC2782436.

123. Nagahashi M, Ramachandran S, Kim EY, Allegood JC, Rashid OM, Yamada A, et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 2012;72(3):726-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2167. PubMed PMID: 22298596; PubMed Central PMCID: PMCPMC3289261.

124. Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, Yamaguchi TP, Stappenbeck TS. Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science.* 2012;338(6103):108-13. doi: 10.1126/science.1223821. PubMed PMID: 22956684; PubMed Central PMCID: PMCPMC3706630.

125. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell.* 1990;63(2):245-7. PubMed PMID: 2208284.

126. Wong MH, Hermiston ML, Syder AJ, Gordon JI. Forced expression of the tumor suppressor adenomatosis polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9588-93. PubMed PMID: 8790374; PubMed Central PMCID: PMCPMC38472.

127. Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, Kostakis A, Nikiteas N, Papavassiliou AG. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2012;314(1):1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2011.09.041. PubMed PMID: 22018778.

128. Normanno N, Maiello MR, De Luca A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? *J Cell Physiol.* 2003;194(1):13-9. doi: 10.1002/jcp.10194. PubMed PMID: 12447985.

129. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases.* 2010;1(1):2-27. doi: 10.4161/sgtp.1.1.12178. PubMed PMID: 21686117; PubMed Central PMCID: PMCPMC3109476.

130. Chang YY, Lin PC, Lin HH, Lin JK, Chen WS, Jiang JK, et al. Mutation spectra of RAS gene family in colorectal cancer. *Am J Surg.* 2016;212(3):537-44.e3. doi: 10.1016/j.amjsurg.2016.02.013. PubMed PMID: 27394063.

131. Sakurai A, Matsuda M, Kiyokawa E. Activated Ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby canine kidney cystogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287(38):31703-11. doi: 10.1074/jbc.M112.377804. PubMed PMID: 22829590; PubMed Central PMCID: PMCPMC3442505.

132. Roßner F, Gieseler C, Morkel M, Royer HD, Rivera M, Bläker H, et al. Uncoupling of EGFR-RAS signaling and nuclear localization of YBX1 in colorectal cancer. *Oncogenesis.* 2016;5:e187. doi: 10.1038/oncsis.2015.51. PubMed PMID: 26779809; PubMed Central

PMCID: PMC4728680.

133. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(4):1244-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1911. PubMed PMID: 15735008.

134. Bäumer S, Bäumer N, Appel N, Terheyden L, Fremerey J, Schelhaas S, et al. Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA in vivo overcomes therapy resistance in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(6):1383-94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2017. PubMed PMID: 25589625.

135. Pereira AA, Rego JF, Morris V, Overman MJ, Eng C, Garrett CR, et al. Association between KRAS mutation and lung metastasis in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015;112(3):424-8. doi: 10.1038/bjc.2014.619. PubMed PMID: 25535726; PubMed Central PMCID: PMC4453646.

136. Feng Y, Bommer GT, Zhao J, Green M, Sands E, Zhai Y, et al. Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterology.* 2011;141(3):1003-13.e1-10. doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.007. PubMed PMID: 21699772; PubMed Central PMCID: PMC3163826.

137. Yoshida M, Taguchi A, Kawana K, Adachi K, Kawata A, Ogishima J, et al. Modification of the Tumor Microenvironment in KRAS or c-MYC-Induced Ovarian Cancer-Associated Peritonitis. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160330. doi: 10.1371/journal.pone.0160330. PubMed PMID: 27483433; PubMed Central PMCID: PMC4970724.

138. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Cell.* 2012;21(6):836-47. doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.024. PubMed PMID: 22698407; PubMed Central PMCID: PMC3721510.

139. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6(5):447-58. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.028. PubMed PMID: 15542429.

140. Chen C, Han X, Fan F, Liu Y, Wang T, Wang J, et al. Serotonin drives the activation of pulmonary artery adventitial fibroblasts and TGF- β 1/Smad3-mediated fibrotic responses through 5-HT(2A) receptors. *Mol Cell Biochem.* 2014;397(1-2):267-76. doi: 10.1007/s11010-014-2194-0. PubMed PMID: 25185755.

141. Tang N, Zhao Y, Feng R, Liu Y, Wang S, Wei W, et al. Lysophosphatidic acid accelerates lung fibrosis by inducing differentiation of mesenchymal stem cells into

myofibroblasts. *J Cell Mol Med.* 2014;18(1):156-69. doi: 10.1111/jcmm.12178. PubMed PMID: 24251962; PubMed Central PMCID: PMCPMC3916127.

142. Chen H, Yang WW, Wen QT, Xu L, Chen M. TGF-beta induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM [corrected]. *Exp Mol Pathol.* 2009;87(3):189-94. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.09.001. PubMed PMID: 19747910.

143. Xu L, Yan DR, Zhu SL, Gu J, Bian W, Rong ZH, et al. KL-6 regulated the expression of HGF, collagen and myofibroblast differentiation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(22):3073-7. PubMed PMID: 24302189.

144. Schubert R, Geiger H, Zielen S, Baer PC. Simultaneous detection of ERK-, p38-, and JNK-MAPK phosphorylation in human adipose-derived stem cells using the Cytometric Bead Array technology. *J Immunol Methods.* 2009;350(1-2):200-4. doi: 10.1016/j.jim.2009.08.015. PubMed PMID: 19733175.

145. Hiratsuka T, Fujita Y, Naoki H, Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M. Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *Elife.* 2015;4:e05178. doi: 10.7554/eLife.05178. PubMed PMID: 25668746; PubMed Central PMCID: PMCPMC4337632.

146. Rassouli FB, Matin MM, Saeinasab M. Cancer stem cells in human digestive tract malignancies. *Tumour Biol.* 2016;37(1):7-21. doi: 10.1007/s13277-015-4155-y. PubMed PMID: 26446457.

147. Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):333-44. doi: 10.1016/j.stem.2008.02.009. PubMed PMID: 18397753; PubMed Central PMCID: PMCPMC2628721.

148. Hammond DE, Mageean CJ, Rusilowicz EV, Wickenden JA, Clague MJ, Prior IA. Differential reprogramming of isogenic colorectal cancer cells by distinct activating KRAS mutations. *J Proteome Res.* 2015;14(3):1535-46. doi: 10.1021/pr501191a. PubMed PMID: 25599653; PubMed Central PMCID: PMCPMC4356034.

149. Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min dS, Choi KY. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2):djt373. doi: 10.1093/jnci/djt373. PubMed PMID: 24491301.

150. Luo F, Pouligiannis G, Ye H, Hamoudi R, Arends MJ. Synergism between K-rasVal12 and mutant Apc accelerates murine large intestinal tumorigenesis. *Oncol Rep.* 2011;26(1):125-33. doi: 10.3892/or.2011.1288. PubMed PMID: 21573497.

151. Iwamoto T, Yamada K, Shimizu M, Totsuka M. Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Biosci Biotechnol*

Biochem. 2011;75(5):925-9. doi: 10.1271/bbb.100887. PubMed PMID: 21597185.

152. Hung CF, Rohani MG, Lee SS, Chen P, Schnapp LM. Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respir Res.* 2013;14:102. doi: 10.1186/1465-9921-14-102. PubMed PMID: 24103846; PubMed Central PMCID: PMCPMC3840605.

153. Jobson TM, Billington CK, Hall IP. Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest.* 1998;101(12):2650-7. doi: 10.1172/JCI1876. PubMed PMID: 9637698; PubMed Central PMCID: PMCPMC508855.

154. Tang CH, Chen CF, Chen WM, Fong YC. IL-6 increases MMP-13 expression and motility in human chondrosarcoma cells. *J Biol Chem.* 2011;286(13):11056-66. doi: 10.1074/jbc.M110.204081. PubMed PMID: 21278254; PubMed Central PMCID: PMCPMC3064160.

155. Liu H, Wang S, Ma W, Lu Y. Transforming Growth Factor β 1 Promotes Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells Via Up-Regulation of Connective Tissue Growth Factor. *Cell Biochem Biophys.* 2015;73(3):775-81. doi: 10.1007/s12013-015-0693-6. PubMed PMID: 27259324.

156. Li Z, Wu Z, Chen H, Zhu Q, Gao G, Hu L, et al. Induction of anterior gradient 2 (AGR2) plays a key role in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced breast cancer cell proliferation and migration. *Med Oncol.* 2015;32(6):577. doi: 10.1007/s12032-015-0577-z. PubMed PMID: 25956506; PubMed Central PMCID: PMCPMC4451465.

157. Zhou JP, Gao ZL, Zhou ML, He MY, Xu XH, Tao DT, et al. Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF- α -induced cancer cell invasion and migration in OSCC. *Am J Cancer Res.* 2015;5(5):1680-91. PubMed PMID: 26175937; PubMed Central PMCID: PMCPMC4497435.

158. Guo B, Gao J, Zhan J, Zhang H. Kindlin-2 interacts with and stabilizes EGFR and is required for EGF-induced breast cancer cell migration. *Cancer Lett.* 2015;361(2):271-81. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.011. PubMed PMID: 25790908.

159. Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol.* 2009;15(12):1431-42. PubMed PMID: 19322915; PubMed Central PMCID: PMCPMC2665137.

160. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, et al. A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J Biol Chem.* 2006;281(19):13209-16. doi: 10.1074/jbc.M509771200. PubMed PMID: 16543233.

161. Kim JM, Bak EJ, Chang JY, Kim ST, Park WS, Yoo YJ, et al. Effects of HB-EGF and epiregulin on wound healing of gingival cells in vitro. *Oral Dis.* 2011;17(8):785-93. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01836.x. PubMed PMID: 21771212.
162. Faria JA, de Andrade C, Goes AM, Rodrigues MA, Gomes DA. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;478(1):39-45. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.097. PubMed PMID: 27462018; PubMed Central PMCID: PMC4977159.
163. Kastanis GJ, Hernandez-Nazara Z, Nieto N, Rincón-Sánchez AR, Popratiloff A, Dominguez-Rosales JA, et al. The role of dystroglycan in PDGF-BB-dependent migration of activated hepatic stellate cells/myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(3):G464-74. doi: 10.1152/ajpgi.00078.2011. PubMed PMID: 21659621; PubMed Central PMCID: PMC3174534.
164. Haskins JW, Nguyen DX, Stern DF. Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci Signal.* 2014;7(355):ra116. doi: 10.1126/scisignal.2005770. PubMed PMID: 25492965; PubMed Central PMCID: PMC4648367.
165. Dateoka S, Ohnishi Y, Kakudo K. Effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in oral cancer. *Med Mol Morphol.* 2012;45(2):91-7. doi: 10.1007/s00795-011-0543-6. PubMed PMID: 22718294.
166. Sato S, Drake AW, Tsuji I, Fan J. A potent anti-HB-EGF monoclonal antibody inhibits cancer cell proliferation and multiple angiogenic activities of HB-EGF. *PLoS One.* 2012;7(12):e51964. doi: 10.1371/journal.pone.0051964. PubMed PMID: 23251664; PubMed Central PMCID: PMC3522611.
167. Mezawa Y, Orimo A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):675-89. doi: 10.1007/s00441-016-2471-1. PubMed PMID: 27506216.
168. Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Matsuoka J, Hasegawa T, Kato Y, et al. Cancer-associated orthotopic myofibroblasts stimulates the motility of gastric carcinoma cells. *Cancer Sci.* 2012;103(4):797-805. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02209.x. PubMed PMID: 22320235.
169. Yeung TM, Buskens C, Wang LM, Mortensen NJ, Bodmer WF. Myofibroblast activation in colorectal cancer lymph node metastases. *Br J Cancer.* 2013;108(10):2106-15. doi: 10.1038/bjc.2013.209. PubMed PMID: 23652304; PubMed Central PMCID: PMC3670500.
170. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth

and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034. PubMed PMID: 15882617.

171. Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, et al. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PLoS One*. 2011;6(1):e15313. doi: 10.1371/journal.pone.0015313. PubMed PMID: 21249190; PubMed Central PMCID: PMC3020942.

172. Murata T, Mizushima H, Chinen I, Moribe H, Yagi S, Hoffman RM, et al. HB-EGF and PDGF mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. *Cancer Res*. 2011;71(21):6633-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0034. PubMed PMID: 22009535.

173. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, et al. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(19):E2487-96. doi: 10.1073/pnas.1422445112. PubMed PMID: 25918379; PubMed Central PMCID: PMC4434739.

174. Zoratto F, Rossi L, Verrico M, Papa A, Basso E, Zullo A, et al. Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumour Biol*. 2014;35(7):6195-206. doi: 10.1007/s13277-014-1845-9. PubMed PMID: 25051912.

175. Liu SQ, Su YJ, Qin MB, Mao YB, Huang JA, Tang GD. Sphingosine kinase 1 promotes tumor progression and confers malignancy phenotypes of colon cancer by regulating the focal adhesion kinase pathway and adhesion molecules. *Int J Oncol*. 2013;42(2):617-26. doi: 10.3892/ijo.2012.1733. PubMed PMID: 23232649.

176. Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, Maalouf S, Uflacker A, Bielawski J, et al. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB J*. 2009;23(2):405-14. doi: 10.1096/fj.08-117572. PubMed PMID: 18824518; PubMed Central PMCID: PMC30788.

177. Zhou L, Yang K, Randall Wickett R, Zhang Y. Dermal fibroblasts induce cell cycle arrest and block epithelial-mesenchymal transition to inhibit the early stage melanoma development. *Cancer Med*. 2016;5(7):1566-79. doi: 10.1002/cam4.707. PubMed PMID: 27061029; PubMed Central PMCID: PMC4944884.

謝辞

本研究および論文の作成をすすめるにあたり，懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学共同獣医学部獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授，大浜剛准教授，獣医毒性学研究室 臼井達哉助教，獣医発生学研究室 加納聖准教授，鹿児島大学共同獣医学部獣医薬理学研究室 宮本篤教授，白石光也准教授，鳥取大学農学部獣医薬理学研究室 太田利男教授，福井大学医学部形態機能医科学講座 堀口和秀准教授，山口大学医学部先端がん治療開発学 裕彰一教授，山口大学医学部消化器・腫瘍外科学 永野浩昭教授，鈴木伸明助教，LmcMF の作製にあたりご協力して頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学研究室 堀正敏准教授，aMoC1 を供与して頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科食糧化学研究室 戸塚護准教授，に厚く感謝の意を表します。

また，公私ともに協力を賜った山口大学獣医薬理学研究室の皆様，私を暖かく見守ってくれた妻・千明，父・英明，母・裕子，兄・啓介，悟史に心より感謝の意を表します。

最後に，本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに，その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。