

主論文の要旨

Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis

〔 Meflin 陽性癌関連線維芽細胞は
膵癌において発癌を抑制する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：藤城 光弘 教授)

水谷 泰之

【緒言】

癌組織は癌細胞だけではなく、癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast : CAF)、骨髄由来の細胞、リンパ球など癌細胞以外の細胞を多く含んでいる。

CAF は細胞外基質の主な構成要素であり、癌細胞の増生や浸潤を促進している。CAF の産生する細胞外基質により促進される間質の線維化や硬化は膵癌のような高悪性度の癌に特徴的であり、癌細胞の悪性化や治療抵抗性を増す。標準的な CAF マーカーである α 平滑筋アクチン (α -SMA)、fibroblast-specific protein1 (FSP1)、fibroblast activation protein (FAP) 陽性 CAF の存在と癌患者の予後悪化との間に正の相関を示す論文が多く、*vitro* や腫瘍移植モデルから CAF は一様に癌発育を促進すると考えられてきた。

現在、条件付き遺伝子破壊を利用した詳細な動物実験から CAF は一様に癌を促進するという考えは否定され、CAF には多様性があり少なくとも癌促進性 CAF (cancer-promoting CAF : p-CAF) と癌抑制性 CAF (cancer-restraining CAF : r-CAF) の2種類の CAF が存在すると考えられている。P-CAF に関する報告は多いが、r-CAF の特異的なマーカー蛋白は未だ見つかっていない。腫瘍の発育に伴い p-CAF と r-CAF が相互変換するかどうかについても不明である。

当研究室は以前に、GPI アンカー型細胞膜タンパク質 Meflin (遺伝子名 ISLR) が間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell: MSC) に発現していることを発見した。さらに Meflin が MSC の未分化性を維持する機能を持つことを報告した。今回我々は線維芽細胞における未分化性の維持が腫瘍抑制性の本態 (Meflin 陽性 CAF が r-CAF の本態である) との仮説をたて、Meflin および Meflin 陽性 CAF の膵癌発育における役割について検証を行った。

【方法】

In situ hybridization (ISH) 法を用いて人およびマウス正常膵における Meflin の発現を調べた。次に人およびマウス膵星細胞 (Pancreatic stellate cells : PSC) を使用して、ウェスタンブロッティング法で Meflin の発現を検出した。野生型マウス (WT) と Meflin ノックアウトマウス (Meflin-KO) から樹立した初代培養 PSC にビタミン D 誘導体の Calcipotriol を添加して Meflin および α SMA の発現動態の変化を検出した。ヒト膵癌手術検体を使用して ISH 法で組織上の Meflin の発現を検出し、高発現・低発現群 (間質細胞の 20% をカットオフ値と設定) にわけて予後を調査した。Meflin-KO マウスと膵癌自然発症マウスモデル (KPC : Kras G12D/P53 R172H/PDX1-Cre) を掛け合わせて WT-KPC および Meflin-KO KPC の予後および表現型を調べた。また KPC Meflin-KO マウスからオルガノイドを樹立してマウス膵へ同所性移植し発育を観察した。Meflin プロモーター支配下に Cre リコンビナーゼを発現するレポーターマウス (Meflin-ZsGreen-DTR (ヒトジフテリアトキシンレセプター) - Cre: Meflin-ZDC) を使用して、Xenograft モデルにおいてジフテリアトキシンを投与し Meflin 陽性細胞特異的に細胞死を引き起こさせ腫瘍の悪性度の変化を観察した。次に細胞系譜解析 (Meflin-CreERT2

に対して Xenograft を作成) を行い腫瘍進展での Meflin 陽性細胞のマーカー分子の変遷を観察した。Meflin を overexpression させることで、線維芽細胞の形質変化を観察した。最後に WT-KPC, Meflin-KO KPC の癌間質におけるコラーゲンの配向を第二高調波顕微鏡にて観察した。

【結果】

正常膵において Meflin が膵癌の CAF の起源である PSC に特異的に発現していることを見いだした (Fig1 A-E)。PSC にビタミン D を投与することで Meflin の発現が上昇することからも Meflin が PSC のマーカーであることが支持された (Fig1 F,G)。さらにビタミン D は Meflin を介して CAF の α SMA (pCAF の代表的なマーカー) の発現を下げる (Reprogram; 間質の形質変換 (Fig1 H-J)) を示した。次に、Meflin は膵臓がんの CAF の一部の群に発現していることを見いだした。(Fig2 A-D)。また、CAF において α SMA と Meflin の発現が互いに負の相関を示すことを見いだした (Fig2 E-G)。

術後膵臓がん患者の標本において、Meflin 陽性 CAF の量の多さは良好な生存率と有意に関連した (Fig3 A,B)。Meflin-KO KPC の膵癌は野生型 KPC と比較しより未分化度で予後不良であることを見出した (Fig3C-G)。興味深いことに、Meflin-KO KPC では、野生型 KPC と比較して低分化型の膵癌が高頻度に出現することも判明した (Fig4 A-D)。膵癌オルガノイドを膵に同所性移植すると同様に分化度の低い腫瘍が発育した (Fig4E, F)。KPC から樹立した膵癌細胞株を ZDC マウスに皮下移植して Meflin 陽性細胞を特異的に除去したところ、非投与群と比較しより未分化な腫瘍ができた (Fig5 A-I)。また、Meflin 陽性細胞の細胞系譜解析をしたところ、皮下移植された膵癌の進行に伴って、Meflin 陽性 CAF が別のタイプの CAF (α SMA 陽性) に分化することも見出した (Fig 6 A-H)。最後に、Meflin を線維芽細胞において過剰発現させると α SMA を抑えること、移植実験で膵癌セルラインの増殖を抑制する効果がみられることを見いだした (Fig7 A-I)。第二高調波顕微鏡を用いた検証から、Meflin 分子の機能は間質の硬化やがん細胞の悪性化に結びつく細胞外基質の改築 (リモデリング) の抑制であることも判明した (Fig7 J-M)。

【考察】

本研究の結果は、Meflin 陽性 CAF は癌の発育過程で膵臓がんを抑制すること、がんの進行にともなって Meflin の発現が低下する可能性を示唆している。細胞系譜解析では Meflin 陽性は平滑筋アクチン陽性の CAF を生み出すことを見出した。がんの進行に伴って「がん抑制性 CAF」から「がん促進性 CAF」に変わる (形質転換) する可能性が示された。現在、米国では、既存のがん薬物療法に形質転換を引き起こすと言われているビタミン D を組み合わせた治療法の治験が複数進行中であり、それらの結果と本研究成果の関連の解明が期待される。

結論として、Meflin が PSC のマーカーであること、膵癌において Meflin は CAF に特異的に発現していることを示した。興味深いことに Meflin の発現はヒト膵癌の予後

良好の因子であった。また、Meflin は膵癌の CAF において α SMA を抑える作用を持つこと、癌の進展に関連する間質のコラーゲンのリモデリングの抑制と関連することを示した。

【結語】

以上の結果は、Meflin 陽性 CAF は、これまで本態が不明であったがん抑制性 CAF (r-CAF) であることを示している。