

主論文の要旨

Akt-Girdin Signaling in Cancer-Associated Fibroblasts Contributes to Tumor Progression

〔 癌関連線維芽細胞における Akt-Girdin シグナリングは
腫瘍進展に関与する 〕

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

(指導：室原 豊明 教授)

山村 由美子

【緒言】

腫瘍の進展には、癌細胞自身の性質、特性だけではなく、これを取りまく腫瘍微小環境の影響が重要であることが最近注目されてきている。癌細胞においては、以前から、PI3K-Akt pathway が増殖や転移に強く関与することが報告されているが、腫瘍微小環境における Akt signaling pathway に関しては、未だ明らかにされていない。Akt の基質である Girdin は、癌細胞・血管内皮細胞・神経前駆細胞などの移動・増殖に機能することが明らかにされている。今回、Girdin が Akt によってリン酸化を受けるセリンをアラニンに置換させた変異型 Girdin knockin マウス(SA マウス) を用いて、腫瘍微小環境における Akt signaling pathway の役割につき検討を行った。

【対象及び方法】

まず、ヒトの乳癌検体の免疫組織染色にて、腫瘍微小環境における Girdin の発現およびリン酸化を検討した。次に、野生型マウス(WT マウス)および SA マウスに、マウス肺癌細胞(LLC ; Lewis Lung carcinoma cell)を皮下移植して腫瘍サイズの経時的計測を行い、腫瘍組織の免疫組織染色を施行した。また、それぞれのマウスから単離してきた fibroblasts を細胞生物学的に解析し、これらの fibroblasts を LLC と混ぜて、もしくは、LLC 単独で、WT マウスへ皮下移植した。同様に、fibroblasts と LLC との共移植実験は SA マウスへも施行した。さらに、Cancer associated fibroblast (CAF) における Girdin のリン酸化が腫瘍増大に及ぼす影響を検討するため、WT マウスおよび SA マウスから CAF をフローサイトメトリーにて単離培養し、in vitro での移動能の評価をするとともに、LLC と混ぜて WT マウスへ皮下移植した。最後に、tomato 陽性の CAF と LLC を WT マウスへ皮下移植し、day14 および day21 の腫瘍組織における tomato 陽性の CAF の割合を解析した。

【結果】

ヒトの乳癌検体の免疫組織染色では、乳癌細胞のみならず、腫瘍血管内皮細胞や CAF においても、Girdin が発現し、リン酸化されていることが確認できた。正常組織部分では、CAF における Girdin の発現率は 40%弱、リン酸化されている確率は 15%程度であるのに対して、腫瘍組織では Girdin の発現率は 63%、リン酸化されている確率は 40%弱と、有意に高いことが確認された(Figure 1)。マウスへの LLC の皮下移植実験において、SA マウスでは WT マウスと比較して有意に腫瘍の増大が抑制されていた。次に、腫瘍微小環境において、どの細胞が腫瘍増大に必要な環境を作り出しているのかを検討するため、免疫組織染色を施行したところ、腫瘍血管面積は両群で有意差を認めなかったが、CAF の数は SA マウス群で有意に少なかった。CD68 陽性マクロファージの数は両群で差は認められなかった(Figure 2)。In vitro assay では、SA マウスから単離した fibroblasts は、WT マウスから単離した fibroblasts と比較して、増殖能および細胞運動能が有意に低下していた。しかし、浸潤能に関しては、有意差は認められなかった(Figure 3)。次に、fibroblasts における Girdin のリン酸化が

腫瘍の増大を促進させる働きがあるのかを検討するため、LLC 単独、あるいは、fibroblasts と LLC を混ぜて WT マウスの皮下に共移植した。LLC 単独群と比較して、WT マウスの fibroblasts を混ぜて移植した群では、以前からの報告通り、腫瘍を増大する効果が認められたが、SA マウスから単離してきた fibroblasts を用いた群は、WT マウスの fibroblasts を用いた群と比較して有意に腫瘍の増大が抑制されていた。この腫瘍組織を用いて免疫組織染色をしたところ、SA マウスの fibroblasts と LLC を移植した群で CAF の数が有意に少ないことが確認された。また、同様にそれぞれのマウスから単離してきた fibroblasts と LLC を SA マウスにも皮下移植したところ、この実験系でも、SA マウスの fibroblasts と LLC を共に移植した群で有意に腫瘍増大が抑制されていた (Figure 4)。さらに、フローサイトメトリーでマウスから CAF を単離し、LLC と共に WT マウスへ移植した実験においても、SA マウスから単離した CAF を用いた群では WT マウスから得られた CAF を用いた群と比較して腫瘍の増大は抑制されており、腫瘍組織における CAF の数も有意に少ないことが確認された。また、SA マウスから単離してきた CAF は *in vitro* assay において、TGF- β 1 刺激下での細胞移動能が WT マウスの CAF と比較して有意に低下していた。PDGF 刺激では、統計学的有意差は認められないものの、SA マウスの CAF で細胞移動能が低下している傾向が認められた。SDF-1 刺激では移動能に差は認められなかった (Figure 5)。LLC と共に皮下移植した tomato 陽性の CAF は、Day14 では腫瘍組織の CAF の 56% であったのに対し Day21 では 16% まで減少していることが確認された (Figure 6)。

【考察】

変異型マウスを用いた腫瘍移植実験において、CAF における Girdin のリン酸化が癌細胞の増殖に重要であることが確認された。Figure 4 の実験で示したように、SA マウスに対して LLC と fibroblasts と共移植した場合も、WT マウスに移植した時と同様な結果が得られたことより、移植を受けたマウス側の CAF、腫瘍血管内皮細胞、免疫細胞などにおける Girdin のリン酸化の関与は少なく、共に移植した fibroblasts や CAF において Girdin がリン酸化されていることが腫瘍の増大を促進しているのではないかと考えられた。Girdin の上流にあるシグナルなど詳細なメカニズムは、今回検討できていないが、Girdin はアクチンに結合し、そのリモデリングを調整していることから、CAF の収縮に関与して腫瘍の増大に必要な細胞外マトリックスのリモデリングを促している可能性が考えられる。その他の注目すべき点として、Girdin は未熟な血管内皮細胞に発現し、そのリン酸化が血管新生に重要であることが以前に報告されているが、今回の研究では、腫瘍血管の定量で有意差は認められなかったことがあげられる。この理由としては、腫瘍組織内への血管内皮細胞の導入には Girdin のリン酸化はあまり関与しておらず、本研究では検討できていないが、腫瘍血管の透過性など、機能的な役割に関わっている可能性があると考えている。

【結語】

癌細胞のみならず、腫瘍微小環境、特に CAF において、Akt によって Girdin がリン酸化されることが腫瘍増大に重要であることが示され、腫瘍微小環境における Akt signaling pathway の役割が明らかになった。