

大橋和明 論文内容の要旨

主 論 文

Biological Differences Between Ovarian Cancer-associated Fibroblasts and Contralateral Normal Ovary-derived Mesenchymal Stem Cells

卵巣癌関連線維芽細胞と対側の正常卵巣由来間葉系幹細胞における
生物学的特性の相違に関する検討

大橋和明、李桃生、三浦生子、長谷川ゆり、三浦清徳

ANTICANCER RESEARCH 42 巻 4 号 1729-1737 頁 2022 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程医療科学専攻
(主任指導教員：三浦清徳教授)

緒 言

悪性腫瘍には癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblasts: CAFs) とよばれる細胞が存在し、液性因子を介して癌細胞の増殖、浸潤、転移などに関わる細胞として注目されている。一方、骨髄、胎盤等から分離される間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) は形態、機能等が CAFs と類似しており CAFs は主に MSCs 由来である可能性が指摘されている。様々な癌腫において CAFs に関する報告があるが、卵巣癌における CAFs に関する報告は少ない。そこで本研究では、卵巣癌の癌関連線維芽細胞 (Ovarian Cancer-Associated Fibroblasts: OCa-CAFs) を分離・培養し、対側の正常卵巣由来間葉系幹細胞 (Normal Ovary-derived MSCs: NO-MSCs) との生物学的特性の相違を検討することで卵巣癌に関する新たな知見を得ることを目的とした。

対象と方法

本研究は倫理委員会の承認と患者の同意を得て実施された (承認番号：19012122)。対象は卵巣癌 IA 期の 6 例 (漿液性癌 1 例, 明細胞癌 3 例, 粘液性癌 1 例, 類内膜癌 1 例) で、平均年齢(±標準偏差)は 56.2(±5.7)歳であった。それぞれの患者から卵巣癌および対側の正常卵巣組織を採取して培養し、増殖した細胞の形態、増殖速度、細胞表面マーカー、microRNA 量、発現している遺伝子の相違について検討した。

1) OCa-CAFs と NO-MSCs の分離・培養

同一患者から採取した卵巣癌および対側の正常卵巣組織を 1mm³ 以下に細切し、培養容器に接着させ medium を添加して 5% CO₂、37°C の条件で培養した。

2) 免疫細胞染色ならびに Western blot 法による細胞表面マーカーの検討

1) で分離・培養したそれぞれの細胞において、CAFs の細胞表面マーカーとして報告されている α -SMA、PDGFR- α 、FSP-1 の発現を免疫細胞染色で検討した。それぞれの初期継代株 (twice-passaged: P2) と晩期継代株 (ten times-passaged: P10) におけるこれらの細胞表面マーカーの発現量を Western blot 法を用いて検討した。

3) リアルタイム RT-PCR 法による卵巣癌に関連する microRNA 量の検討

OCa-CAFs と NO-MSCs それぞれの初期継代株(P2)と晩期継代株(P10)において、卵巣癌の進展との関連が報告されている miR-142-3p、miR-152-3p、miR-200a-3p の発現量

をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量した。内部コントロールには U6 snRNA を用いた。

4) Microarray 解析法を用いた網羅的遺伝子発現解析

OCa-CAFs と NO-MSCs それぞれの初期継代株(P2)より Total RNA を抽出し、Microarray 解析法を用いて有意な変動を示す遺伝子を抽出した。本解析における閾値は $p\text{-value}<0.05$, $|\log \text{fold change}|>2$ を有意な変動とした。

5) 統計学的解析

定量データは平均 \pm 標準偏差で表記し、有意差検定には Mann-Whitney U 検定を用いて $p\text{-value}<0.05$ で統計学的有意差ありと判定した。

結 果

1) OCa-CAFs および NO-MSCs の分離・培養

それぞれの組織片から培養 5 日以内に線維芽細胞に類似した細胞が増生し約 2 週間で confluent に至った。OCa-CAFs(P2)と NO-MSCs(P2)の平均倍加時間 (\pm 標準偏差)はそれぞれ $40.6\pm 6.6\text{hr}$ vs $37.3\pm 2.9\text{hr}$ であり増殖速度に有意差は認められなかった ($p=0.827$, Mann-Whitney U 検定)。

2) 免疫細胞染色解析および Western blot 法による細胞表面マーカーの検討

免疫細胞染色解析では、OCa-CAFs(P2)と NO-MSCs(P2)は、いずれも Vimentin 陽性かつ Cytokeratin 陰性であった。 α -SMA は OCa-CAFs(P2)強陽性、NO-MSCs(P2)弱陽性であった。PDGFR- α と FSP-1 は、いずれの細胞でも弱陽性であった。Western blot 法では、OCa-CAFs(P2)における α -SMA の発現量が NO-MSCs(P2)におけるそれに比較して有意に上昇していた ($p=0.006$, Mann-Whitney U 検定)。継代を重ねると、 α -SMA の発現量は OCa-CAFs(P10)において有意に低下していたが ($p=0.004$)、NO-MSCs(P10)では変化を認めなかった ($p=0.810$)。PDGFR- α および FSP-1 では同様の変化を認めなかった。

3) リアルタイム RT-PCR 法による卵巣癌に関連する microRNA 量の検討

NO-MSCs(P2)と比較して OCa-CAFs(P2)において、miR-142-3p の発現量は有意に上昇していたが ($p=0.004$, Mann-Whitney U 検定)、miR-152-3p および miR-200a-3p の発現量には有意差を認めなかった(それぞれ $p=0.332$ および $p=0.746$)。そして、継代培養を重ねると、OCa-CAFs(P10)における miR-142-3p および miR-200a-3p の発現量は有意に低下していたが(それぞれ $p=0.003$ および $p=0.004$)、NO-MSCs(P10)においては変化が認められなかった。

4) Microarray 解析法を用いた網羅的遺伝子発現解析

NO-MSCs(P2)と比較して OCa-CAFs(P2)において 2 倍以上の発現量の変化を示す遺伝子 21 個が同定された (発現上昇は 17 個、発現低下は 4 個)。3)で検討した microRNA との関連を検証し、*FOXF2* が miR-142-3p の標的遺伝子であった。

考 察

卵巣癌組織から OCa-CAFs を分離して安定的に培養することができた。OCa-CAFs と NO-MSCs は類似の形態を呈し、増殖速度に有意差は認められなかった。そして、両者には、21 個の遺伝子で発現量の有意な変化が認められた。また、OCa-CAFs(P2)では α -SMA および miR-142-3p の発現量が有意に上昇していたが、継代培養を重ねることで NO-MSCs(P2)と同等の発現量まで低下したことから、OCa-CAFs は癌細胞との相互作用をもつ可能性が示唆された。以上より、卵巣癌進展の分子生物学的機序を解明する手がかりとして、OCa-CAFs は有効なターゲットになり得ると考えられた。