

がん組織を構成する線維芽細胞の起源

The origin of fibroblast recruited into cancer-induced stromal tissue

石井 源一郎, 落合 淳志

Genichiro Ishii and Atsushi Ochiai

^a 国立がんセンター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部

要旨 ヒトがん組織は、がん細胞とそれらを取り囲む多種類の間質細胞（線維芽細胞、血管構成細胞、免疫担当細胞）から構成される。線維芽細胞は、がん間質形成過程において動員される主な細胞であり、線維芽細胞の増生所見はがん組織において見られる一般的な現象である（desmoplastic reaction）。また、がん間質に動員された線維芽細胞の性状はがんの悪性度と相関することが示されている。そのため、がんの悪性像を理解するには、がん細胞のみならず線維芽細胞の生物像をも把握することが重要であると考えられる。本稿では、がん組織形成過程における線維芽細胞の起源・動員機構に焦点を当て概説する。

キーワード：線維芽細胞、がん組織、がん間質、骨髄細胞

1. はじめに

線維芽細胞は、臓器間質を充填する間質細胞である。形態学的には紡錘形を呈するが、ある種の病的環境によりその細胞形態は変化する。実際創傷治癒過程では、線維芽細胞は大きさを増し、細胞質の好塩基性が強くなる。線維芽細胞は、正常組織では比較的規則正しく配列している。しかしひとたび損傷が加わると損傷部に動員され、錯綜した配列を示すようになる。そしてコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を始め、創傷治癒過程の中で重要な働きを果たす。線維芽細胞は、このような創傷治癒組織（いわゆる肉芽組織）以外の病的組織にも動員され、多彩な機能を有していることが判明してきた。がん組織形成過程においても、線維芽細胞は多数動員され、がんの進展に関与することが知られている。本稿では、がん組織形成過程における線維芽細胞の起源・動員機構に焦点を当て概説する。

2. がん組織に動員される線維芽細胞

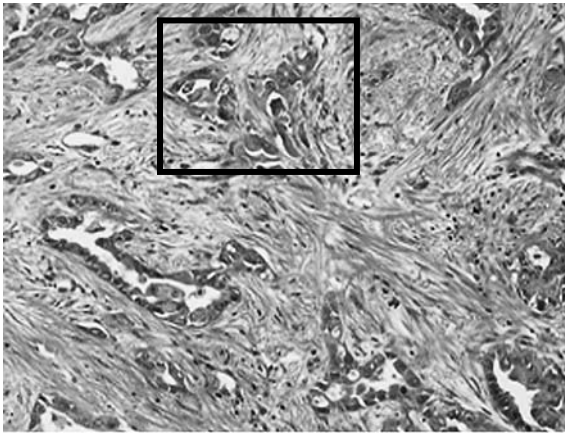
がん細胞の増殖に伴い、周囲には多数の間質細胞が動員される。それらはリンパ球、マクロファージ、好中球などの免疫担当細胞、新生血管を構成する血管内皮細胞、周皮細胞、および線維芽細胞であり、がん特異的な微小環境を提供している。免疫担当細胞¹⁾あるいは新生血管²⁾ががん進展に重要な役割を果たしていることについては異論を差しささむ余

地はないものの、がん間質組織内に最も多量に存在する線維芽細胞の役割については諸説様々であった。近年では、線維芽細胞は細胞外マトリックス、細胞増殖因子、プロテアーゼの産生および活性化機構を介してがん細胞の増殖・浸潤に促進的に機能していると言われている^{3~8)}。線維芽細胞はがん間質内に取り込まれると、定常状態とは異なる錯綜配列を呈する。この現象は desmoplastic reaction と呼ばれ、がん組織に普遍的に見られる現象である（図1）。実際のがん組織においては、がん細胞とこれら線維芽細胞は様々な割合で混在しており、スキルスタイプの胃癌の様に線維芽細胞が大半を占めるようながん組織も希ならず認められる。

がん組織より採取された線維芽細胞と、非がん組織由来の線維芽細胞との生物学的形質の違いは今までに多数報告されている。がん間質内の線維芽細胞はしばしば smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞へ分化しているが、非がん部では筋線維芽細胞の出現は見られない。正常乳腺組織由来の線維芽細胞は、乳がん細胞株の増殖を抑制したが、乳がん組織由来の線維芽細胞は乳がん細胞株の増殖を促進した、という報告もある。また同じがんでも、胞巣の中心あるいは胞巣周囲に出現する線維芽細胞の形態は大きく異なる。例えば、がん組織の被膜を構成する線維芽細胞は一定の方向性を示しながら存在するが、がん中心部に存在する線維芽細胞は錯綜して存在すること多い。また後者の線維芽細胞にはしばしば核分裂像も認めるが、被膜を形成する線維芽細胞にはほとんど核分裂像はない。このように、がん間質内に動員された線維芽細胞は、明らかに解剖学的、生物学的に正常線維芽細胞とは異なり、また不均一な細胞集団であると言えよう。

^a 〒277-8577 千葉県柏市柏の葉6-5-1
TEL: +81-4-7134-6855; FAX: +81-4-7134-6865
E-mail: gishii@east.ncc.go.jp
2008年2月29日受付

A



B

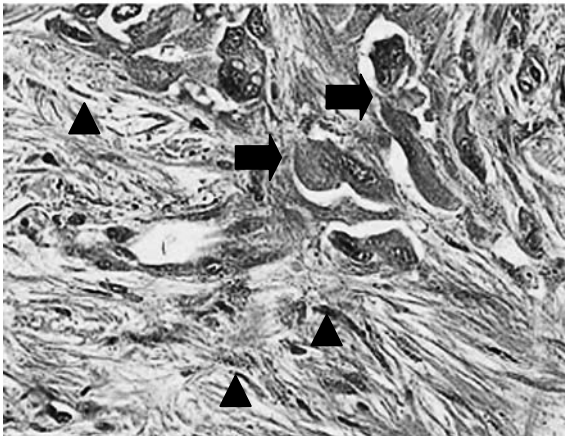


図1 A: 肺腺がんの組織像。がん細胞の周囲に、多数の線維芽細胞が浸潤している。B: 枠部の拡大。矢印はがん細胞。矢頭は、線維芽細胞。

3. がん間質内に動員される線維芽細胞には、骨髄細胞由来の線維芽細胞も含まれる (マウスモデルを用いた検討)

我々は、がん間質に動員される線維芽細胞の起源を明らかにするため、以下に示すような検討を行った (図2)⁹⁾。GFP

transgenic, RAG1^{-/-} マウス (以下 GFP-Tg) の骨髄細胞を移植した SCID マウスの皮下に、ヒト膵がん細胞株 Capan-1 を移植した。Capan-1 は、SCID マウス皮下に移植すると、腫瘍間質に著明な desmoplastic reaction を形成する。形成された腫瘍間質の中で骨髄由来の細胞集団が存在するかどうかを解析した。その結果、腫瘍間質に多数の GFP 陽性紡錘形細胞を認めた。これら細胞の一部は smooth muscle actin 陽性を示したことから、筋線維芽細胞であることが確認された。つまり、少なくともがん間質に出現する筋線維芽細胞の一部は、骨髄細胞を起源とすることが示されたのである。また、Capan-1 皮下移植後、2 週間および 4 週間後に形成される腫瘍間質を検討した。2 週間後の腫瘍間質においても、腫瘍周囲には多数の筋線維芽細胞が出現していた。腫瘍間質に動員されたすべての筋線維芽細胞に対する骨髄由来筋線維芽細胞の出現頻度は、2 週後では $12.7 \pm 9.6\%$ であるのに対し、4 週間後の頻度は $39.8 \pm 17.1\%$ と明らかに増加していた。以上の事実は、腫瘍形成早期 (2 週間) には、がん間質に動員される線維芽細胞の大半はがん胞巣周囲の間質組織由来線維芽細胞であるのに対し、腫瘍形成後期 (4 週間) では、骨髄由来の線維芽細胞が末梢血を介してがん間質の形成に参画することを意味している。

次に、GFP-Tg の骨髄細胞を移植した SCID マウスの皮下に、ヒトがん細胞株 10 種類を移植した。そして形成された腫瘍組織の大きさ (TV)、腫瘍組織に占める間質成分の割合 (St)、微小血管密度 (MVD)、筋線維芽細胞に占める骨髄由来筋線維芽細胞の割合 (MF)、血管内皮細胞に占める骨髄由来血管内皮細胞の割合 (VE) を計測し、それらに相関が有るかを検討した。得られた腫瘍の組織像は、がんの種類によって異なっており、非常に多様でヒトのがん組織標本を再現するモデルとしてこのマウスの利用は適切と考えられた。特に、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 では、腫瘍間質は $31.0 \pm 9.0\%$ も占めていたが、白血病細胞株である HL-60 では、腫瘍間質は 0% であった。解析結果、腫瘍組織に占める間質成分の割合 (% St) と筋線維芽細胞に占める骨髄由来筋線維芽細胞の割合 (BMD-MF) には統計学的に有意な相関が認めら

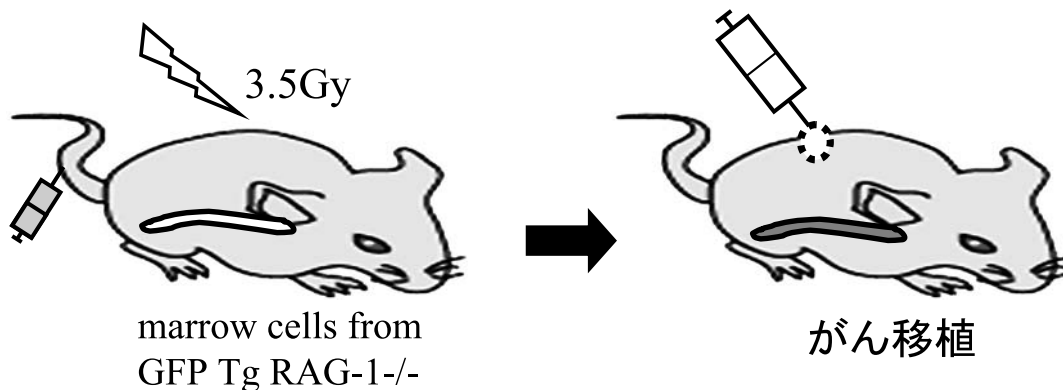


図2 GFP Tg かつ RAG-1^{-/-} マウスを作製し、このマウスの骨髄細胞を SCID マウスへ骨髄移植した。Donor 骨髄細胞の生着を確認した後、ヒトがん細胞を皮下へ移植した。

れた。以上の結果は、間質形成能の高い腫瘍では、骨髄由来線維芽細胞が高頻度に動員され、これらが腫瘍間質を構成していることを示している。また、移植により得られた腫瘍組織における間質形成の違いは、がん細胞株の種類の違いによるものと推察され、がん組織に於いて間質が形成されるメカニズムの一部にがん細胞由来の因子が大きく関わっている可能性があらためて確認された¹⁰⁾。以上の結果を、図3にまとめた。

次に我々は、がん細胞が増殖する組織微小環境、すなわち標的臓器もまた、間質形成メカニズムに影響を与えているかどうかを検討する目的で、Capan-1を、皮下、腹腔内、脾、肝、肺にて増殖させ、それぞれの組織におけるがん組織を解析した。Capan-1がん組織は、皮下組織および腹腔内では間質成分の占める割合が高度であったが、脾、肝、肺ではその割合は明らかに低度であった。次に各臓器におけるTV, St, MVD, BMD-MF, BMD-VEを計測した。その結果、間質成分の多い皮下組織、腹腔内がん組織では、BMD-MF, BMD-VEが高いことが示された。一方、間質成分の低い腫瘍組織（肝、脾、肺）では、骨髄由来線維芽細胞および血管内皮細胞は認められなかった。以上の結果は、がん細胞が増殖する

組織微小環境もまた、間質形成に大きな影響を与えていることを示している。

4. ヒトがん間質内における線維芽細胞の一部は骨髄細胞由来である

今までの検討は、マウスモデルを用いた検討であった。そこでヒトがん組織においても、同様の事象がおこっているかどうかを以下の方法で検討した。外科的切除された肺には、肺静脈および肺動脈が合併切除されている。この肺静脈内の血液より、比重遠心法により単核球を採取し（図4A）、20% FCS存在下で培養した。その結果、47症例中16症例において紡錘形細胞の増殖を認めた（図4B）。一方健常人末梢血（9症例）を同様に培養しても、紡錘形細胞の増殖は認めなかった。これらの細胞は、一般的な線維芽細胞のマーカー（Collagen type I, Vimentin）に陽性を示しており、筋系および血管内皮系マーカーは陰性であった。以上より、*ex vivo*にて増殖した細胞は、骨髄細胞由来線維芽細胞と判断した。DNA microarrayの解析により、骨髄細胞由来線維芽細胞は、胎児肺組織由来のWI38, MRC5とは異なるクラスターに属していた。すなわち、骨髄細胞由来線維芽細胞は、既存組織由

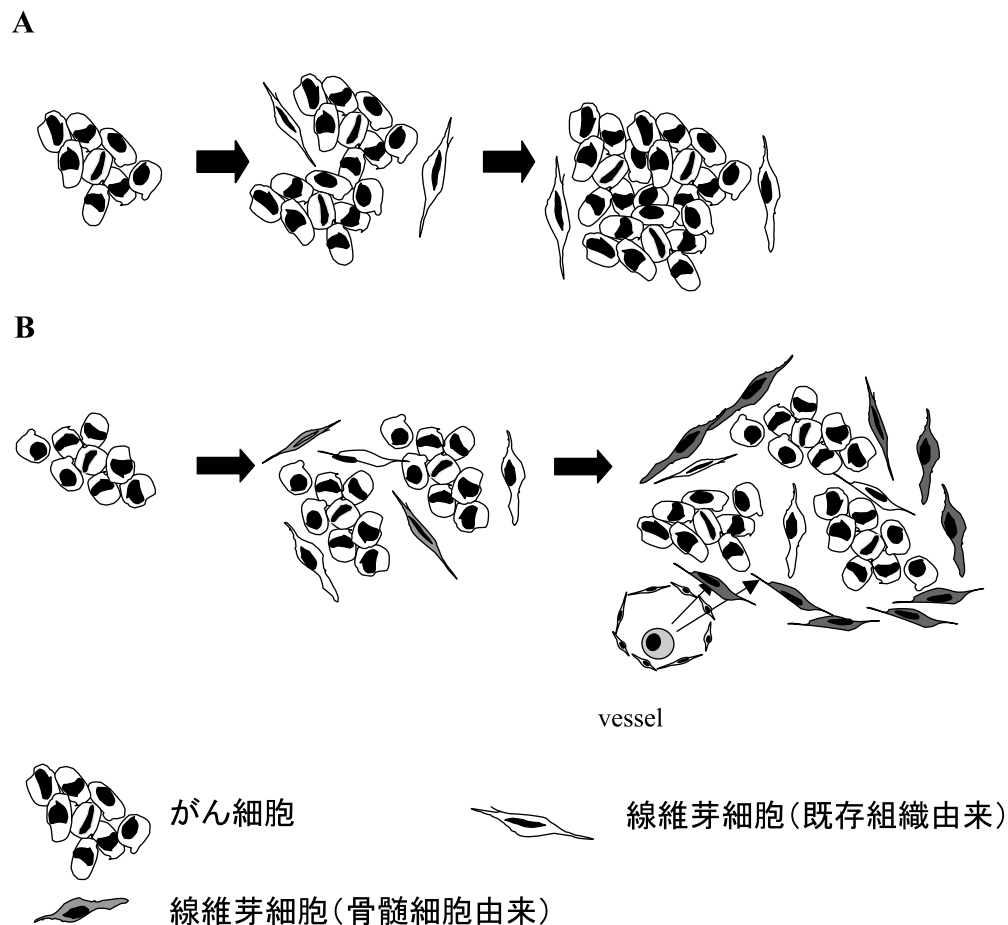


図3 A:間質細胞を動員する能力が低いがん細胞。がん細胞の増殖と共に、周囲には既存組織由来の線維芽細胞が動員される。B:間質細胞を高度に動員するがん細胞。初期は既存組織由来の線維芽細胞が主に動員されるが、やがて遠隔臓器（骨髄）由来の線維芽細胞が血流を介して多数動員される。

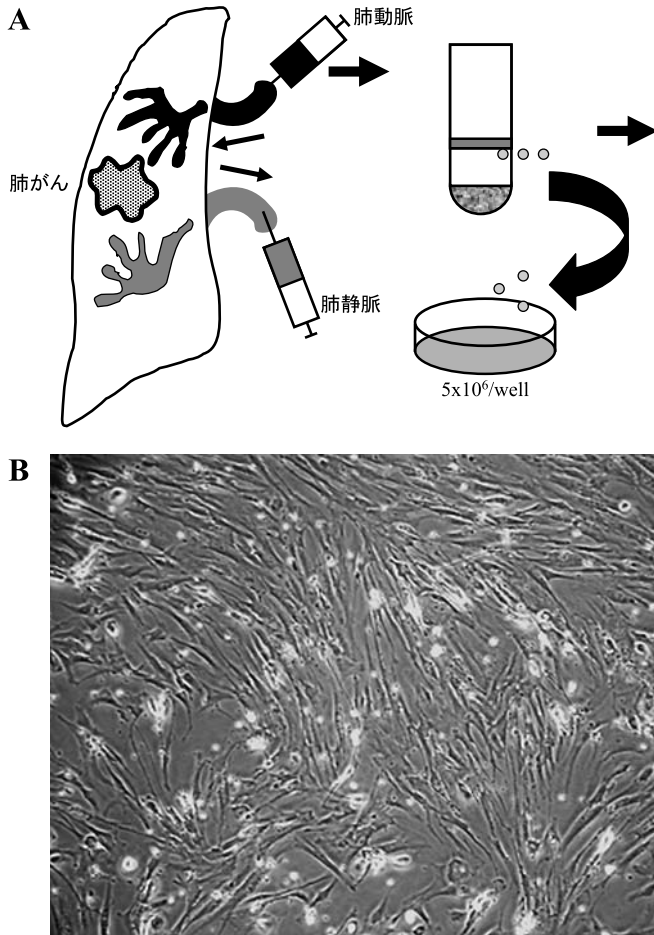


図4 A: 摘出肺の肺動脈あるいは肺静脈より血液を採取し、比重遠心法にて単核球を分離培養した。
B: 紡錘形の細胞が、錯綜配列を呈し増殖している。形態学的にも、線維芽細胞と考えられる。

来線維芽細胞とは異なる、独自の遺伝子プロファイルを有する線維芽細胞であることが示唆された。

骨髓細胞由来線維芽細胞が、がん間質に動員され、間質形成に寄与するかどうかを検討する目的で、上述した肺静脈より採取した単核球を *Carboxyfluorescein succinyl ester* (CFSE) ラベルし、担がん NOD-SCID マウスに心注した。2 日後に腫瘍を摘出した結果、腫瘍組織周囲に CFSE ラベルされた線維芽細胞を認めた。また、これらの細胞は、HLA class I 陽性であった。以上の結果より、骨髓細胞由来線維芽細胞の前駆細胞は、血中よりがん間質に動員され、がん組織内にて線維芽細胞に分化し、間質形成に寄与することが判明した。

Ex vivo にて線維芽細胞が増殖した症例と増殖しなかった症例の、臨床病理学的パラメーターを検討した。陽性症例では、陰性症例と比較して、肺がん原発巣における線維化がより高度であった。(123 mm² vs 59 mm², P=0.02) 以上の結果は、原発巣の線維化病態と、血中線維芽細胞前駆細胞の頻度が関連している可能性を示唆しているものと考えた¹¹⁾。

5. ヒトがん間質内における線維芽細胞の一部は血管外膜細胞由来である。

上記の結果を踏まえ、我々は、がん組織に動員される線維芽細胞の起源として、少なくとも 1) 既存組織由来、2) 骨髓細胞由来、の 2 種類の細胞起源を提唱してきた。しかしながら、ヒトのがん病理組織切片を顕鏡していると、しばしば血管外膜の線維芽細胞 (vascular adventitial fibroblast) が、がん間質線維芽細胞に連続的に移行している像が見られる。我々は、血管外膜線維芽細胞もまた、がん間質に動員される線維芽細胞の起源であると考えた。血管外膜組織に含まれる線維芽細胞は、血管の remodeling あるいは粥状硬化症の際、積極的に病巣部へ遊走し、病態に促進的な役割を果たしていることが報告されている。すなわち、血管外膜由来線維芽細胞は、単なる支持組織としての役割以外にも重要な生理機能を有していることが予想された。

切除肺に付着している肺動脈より血管外膜のみを剥離し、培養を施行した。初期培養したヒト肺動脈血管外膜由来細胞は、*in vitro* で線維芽細胞類似の細胞形態であり、CD29・CD105 陽性、CD3・CD14・CD20・CD34・CD45・CD68・CD117 陰性であった。また、明らかな筋、血管分化を示すマーカーには陰性を示した。

In vitro migration assay では、がん細胞の培養上清および PDGF-bb に高い遊走能を示した。次に、血管外膜由来線維芽細胞には間葉系前駆細胞が含まれているかどうかを検討した。同一肺組織より、血管外膜および肺組織由来線維芽細胞を分離し、骨芽細胞、脂肪細胞、筋線維芽細胞への分化誘導培地にて培養を継続した。肺組織由来線維芽細胞は、筋線維芽細胞には分化したが、骨、脂肪細胞への分化はほとんど示さなかった。一方、肺動脈血管外膜由来線維芽細胞は、骨芽細胞、脂肪細胞、筋線維芽細胞への分化誘導が可能であった。このことより、ヒト肺動脈血管外膜由来細胞は間葉系前駆細胞を含んでいることが明らかとなった¹²⁾。近年、Karnoub らは、骨髓支持組織由来の間葉系前駆細胞をヒトがん細胞株と共にマウスの皮下へ移植した結果、腫瘍の転移が促進されたことを報告している¹³⁾。このことは、或る種の線維芽細胞 (間葉系前駆細胞) は、腫瘍進展に促進的な影響を与える可能性を示唆している。ヒト血管外膜由来線維芽細胞にもまた、間葉系前駆細胞が含まれていたことを考えると、がん組織内の血管周囲には、特別な微小環境が存在することが推察される。

6. おわりに

Paget は「がん細胞の種 (seed) はそれが適した土壌 (soil) でのみ発育する」と述べたが、これは多くの研究により実証された (Seed and soil theory) (図 5A)。そして、現在ではがん転移の一般的な考えとされている。我々は新たに、Seed and fertilized-soil theory を提唱する。すなわち、がん細胞転移の初期は、一部のがん細胞のみ (seed) が、その標的臓器

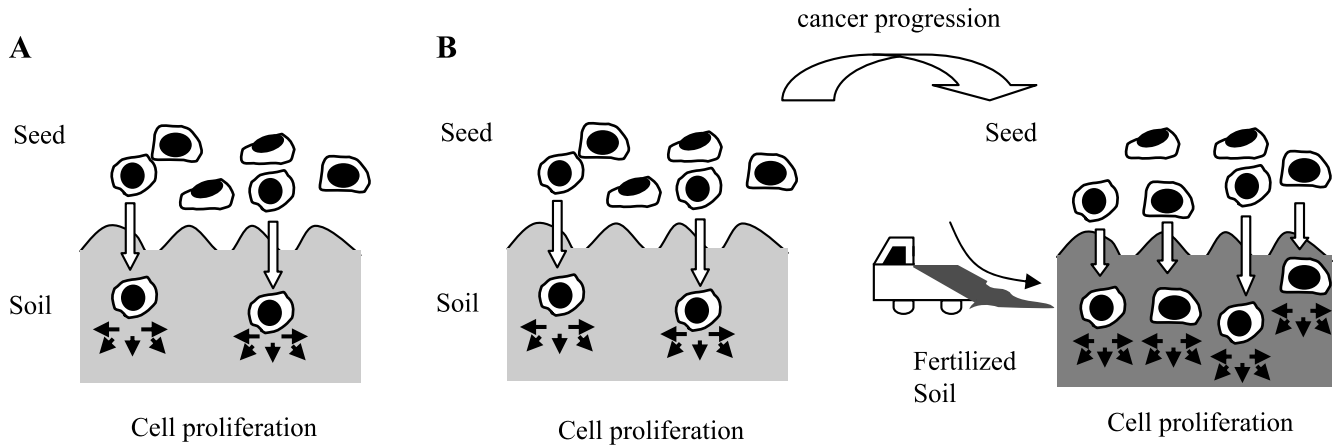


図5 A: Pagetの唱えた古典的なseed and soil theory. がん細胞の種(seed)はそれが適した土壌(soil)でのみ発育する。B: Seed and fertilized-soil theory. がん細胞転移の初期は、一部のがん細胞のみ(seed)が、その標的臓器(soil)にて増殖する。しかし、がん細胞が増殖すると共に、血中を介して骨髄由来細胞(線維芽細胞も含む)が多数動員される。これら動員された細胞は、標的臓器の微小環境を改築し、新たな微小環境を再構成する(fertilized-soil)。こうして、さらなるがん細胞の生着が可能となり、がん転移は飛躍的に促進される。

(soil)にて増殖する。しかし、一度がん細胞が標的臓器で増殖を開始すると、血中を介して骨髄由来細胞(線維芽細胞も含む)が多数動員される。これら動員された間質細胞は、標的臓器の微小環境を改築し、新たな微小環境を再構成する(fertilized-soil)。こうして、さらなるがん細胞の生着が可能となり、がん転移は飛躍的に促進される(図5B)。

以上、がん間質内の線維芽細胞の起源の不均一性を中心に、我々のデータを交えて紹介した。今後は、これら骨髄細胞由来線維芽細胞のがん間質への動員機構の解明、がん細胞に対する機能解明が重要なテーマと思われる。がん組織における間質形成のメカニズムをより明確にする事は重要であり、ひいては間質をターゲットとしたがん治療の開発に繋がるものと考えられる。

文 献

- 1) Herberman, R.B.: Cancer immunotherapy with natural killer cells. *Semin. Oncol.*, **29**, 27-30 (2002)
- 2) Folkman, J., Hahnel, P. and Hlatky, L. Cancer: looking outside the genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 76-79 (2000)
- 3) Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D. and Werb, Z.: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, **103**, 481-490 (2000)
- 4) Tlsty, T.D.: Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin. Cancer Biol.*, **11**, 97-104 (2001)
- 5) Weber, C.K., Sommer, G., Michl, P., Fensterer, H., Weimer, M., Gansauge, F., Leder, G., Adler, G. and Gress, T.M.: Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology*, **121**, 657-667 (2001)
- 6) Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Dang, T.D., Ayala, G.E. and Rowley, D.R.: Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res.*, **62**, 3298-3307 (2002)
- 7) Cheng, J.D. and Weiner, L.M.: Tumors and their microenvironments: tilling the soil. Commentary re: A.M. Scott et al., A Phase I dose-escalation study of sibrutuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1590-1595 (2003)
- 8) Barcellos-Hoff, M.H. and Ravani, S.A.: Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res.*, **60**, 1254-1260 (2000)
- 9) Ishii, G., Sangai, T., Oda, T., Aoyagi, Y., Hasebe, T., Kanomata, N., Endoh, Y., Okumura, C., Okuhara, Y., Magae, J., Emura, M., Ochiya, T. and Ochiai, A.: Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **309**, 232-240 (2003)
- 10) Sangai, T., Ishii, G., Kodama, K., Miyamoto, S., Aoyagi, Y., Ito, T., Magae, J., Sasaki, H., Nagashima, T., Miyazaki, M. and Ochiai, A.: Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. *Int. J. Cancer.*, **115**, 885-892 (2005)
- 11) Ishii, G., Ito, T.K., Aoyagi, K., Fujimoto, H., Chiba, H., Hasebe, T., Fujii, S., Nagai, K., Sasaki, H. and Ochiai, A.: Presence of human circulating progenitor cells for cancer stromal fibroblasts in the blood of lung cancer patients. *Stem Cells.*, **6**, 1469-1477 (2007)
- 12) Hoshino, A., Chiba, H., Nagai, K., Ishii, G. and Ochiai, A.: Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **368**, 305-310 (2008)
- 13) Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. and Weinberg, R.A.: Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, **449**, 557-563 (2007)