

論文内容要旨

Mesenchymal stem cells induce tumor stroma formation and epithelial-mesenchymal transition through SPARC expression in colorectal cancer

(MSCは大腸癌細胞におけるSPARC発現を介して腫瘍間質の形成やEMTを誘導する)

Oncology Reports, 2021, in press.

主指導教員：田中 信治 教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：伊藤 公訓 教授

(広島大学病院 総合診療医学)

副指導教員：相方 浩 准教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

内藤 聡雄

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

大腸癌において癌と間質の相互作用により腫瘍発育が促進されることが知られているが、我々は以前、大腸癌において間葉系幹細胞（MSC）が腫瘍間質に遊走し、癌関連線維芽細胞（CAF）に分化した結果、腫瘍の発育進展を促進することを報告しており、またマイクロアレイ解析を行い、大腸癌細胞を MSC と直接接触培養することで SPARC をはじめとする EMT 関連遺伝子の発現が上昇することを報告している。本研究では癌細胞と間質の直接接触により癌細胞において発現が上昇する EMT 関連遺伝子のひとつである SPARC に着目し、大腸癌の発育進展に対して SPARC がどのように影響を与えるかを、臨床検体、細胞株、マウスモデルを用いて検討した。実験方法としてはまず、ヒト大腸癌外科切除標本 42 検体を用いて以前のマイクロアレイ解析で発現上昇を認めた EMT 関連遺伝子（SPARC, PTX3, FN1, FSTL1, LGALS1）について免疫組織学的評価を行い、臨床病理学的特徴や予後との関連を解析した。次にヒト大腸癌細胞株 KM12SM (WT) を用いて SPARC 発現抑制株（shSPARC）を作成し、MSC との相互作用による SPARC の腫瘍発育に対する影響を評価するため、WT もしくは shSPARC の癌細胞の単独培養もしくは MSC との共培養を行った際の増殖能や遊走能をタイムラプスシステムで評価した。さらに、大腸癌同所移植マウスモデルを用いて BALB/c マウスの盲腸壁に WT もしくは shSPARC の癌細胞の単独移植もしくは MSC との共移植を行い、6 週後に腫瘍発育、EMT、間質反応などに与えた変化を免疫組織学的評価および RNA シークエンスを用いて解析した。実験結果としては、T 因子、N 因子、Stage の高い症例で癌細胞における SPARC の発現を有意に認めており、癌細胞において SPARC の発現した症例で SPARC の発現していない症例と比較して有意に予後不良となっていた。*in vitro* では MSC との共培養により shSPARC 株はコントロール株に比べて増殖能や遊走能が有意に抑制されたが、癌細胞のみの培養では抑制は認めなかった。このことから、癌細胞における SPARC 発現が癌細胞の増殖能と遊走能を促進しており、SPARC の機能に癌細胞と MSC の直接的な接触が重要であることが示された。また、*in vivo* では shSPARC 株と MSC の共移植群で WT 株と MSC の共移植群に比べてマウスの体重減少や腫瘍の増大、リンパ節転移が有意に抑制されていた。さらに腫瘍組織を免疫組織学的に Ki-67、CD31、Lyve1、 α -SMA、type I collagen、fibronectin、E-cadherin を用いて増殖能や血管新生能、間質反応、EMT について評価すると、MSC との共移植により shSPARC 株で WT 株に比べて増殖能や血管新生能、間質反応、EMT が有意に抑制され、腫瘍微小環境との相互作用が抑制されたが、癌細胞のみの移植ではそれらの変化は認めなかった。さらに、移植腫瘍における遺伝子発現に対する SPARC の影響を調べるため WT 株と MSC の共移植腫瘍と shSPARC 株と MSC の共移植腫瘍を用いて RNA シークエンスにより GO 解析、pathway 解析、GSEA 解析を行ったところ、shSPARC 株と MSC の共移植腫瘍において WT 株と MSC の共移植腫瘍と比較して間質反応や血管新生、EMT に関連する遺伝子群やシグナル伝達経路の発現が抑制されていた。以上の実験結果から、癌細胞と間質の直接接触により癌細胞での SPARC 発現が上昇し、EMT や間質反応が誘導されることで大腸癌が発育進展していることが示唆された。SPARC は大腸癌の進行や転移と関連しており、大腸癌の良好な予後マーカーであるだけでなく、大腸癌治療における有望な標的分子となり得ると考える。