

乳癌微小環境における
成熟脂肪細胞の形質変化に関する検討
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

土方 浩平
修了年 2020年
指導教員 越永 從道

【背景】

癌組織には様々な間質細胞が存在し、癌細胞との相互作用により癌微小環境を形成し、浸潤、転移、血管新生などに影響を与えることが明らかにされている¹。乳癌組織は周囲に脂肪組織が豊富に存在し、その癌微小環境において脂肪組織の関与が考えられる。脂肪組織は主に成熟脂肪細胞で構成されるが、他に血管内皮細胞 (Vascular endothelial cell : EC)、Pericyte、間葉系間質細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell : MSC) などの間質細胞が存在しており、これらの細胞が乳癌微小環境へ影響することが予想される。Kidd ら²は、マウスにおいて脂肪組織の近傍にマウス乳癌細胞株を移植し、形成された乳癌組織内の EC と Pericyte が脂肪組織由来であることを報告した。また、Muehlberg ら³は、マウス脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem/stromal cell : ASC) とヒト乳癌細胞を混合しマウスの乳腺周囲脂肪体 (乳腺 Fat pad) へ移植すると、腫瘍径が増大することを報告した。一方で、脂肪組織の主要構成細胞である成熟脂肪細胞が乳癌微小環境へ及ぼす影響については、いまだ明らかにされていない部分が多い。Andarawewa ら⁴や Tan ら⁵は、ヒト乳癌組織の辺縁では成熟脂肪細胞は脂肪滴が小さいなど形態の違いを示すことを報告しており、乳癌微小環境における周囲の成熟脂肪細胞の関与が示唆される。しかし、乳癌微小環境における生体内の成熟脂肪細胞の挙動について検討した報告はこれまでにない。

【目的】

成熟脂肪細胞の運命追跡ができる遺伝子改変マウスを用いて、乳腺 Fat pad にマウス乳癌細胞株を移植し、乳癌微小環境における成熟脂肪細胞の形質変化の有無について検討した。

【方法】

1. 実験動物

実験には、C57BL/6-Tg (Adipoq-cre/ERT2) 1Soff/J B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm9} (CAG-tdTomato) Hze/J マウス (Adipoq-CreERT2/tdTomato マウス) を使用した。Adipoq-CreERT2/tdTomato マウスは Sassmann ら⁶により報告されたタモキシフェン存在下で成熟脂肪細胞特異的に tdTomato を発現するレポーターマウスである。すべての動物実験は日本大学動物実験運営内規 (動物実験計画書承認番号 : AP15M005-3、AP19MED009-1、AP17M023、AP17M023-1、AP19MED005-1)、日本大学遺伝子組換え実験実施規定 (遺伝子組換え実験計画書整理番号 : 2015 医 1-3) に従い実施した。

2. マウス乳癌細胞株

Adipoq-CreERT2/tdTomato マウスに移植可能で腫瘍形成する C57BL/6 マウス由来乳癌細胞株 E0771⁷ を実験に使用した。

3. 蛍光免疫組織化学染色法

Adipoq-CreERT2/tdTomato マウスを 4% Paraformaldehyde 含有 Phosphate buffered saline (PBS) (4%PFA) にて灌流固定し検体を摘出後、凍結切片標本を作成した。その後、各種抗体を用いた蛍光免疫染色を間接蛍光抗体法で行った。

4. 成熟脂肪細胞特異的な tdTomato 発現の解析

Adipoq-CreERT2/tdTomato マウス (雌性、7 週齢) を実験に用いた。タモキシフェンを 5 日間投与後、主要臓器を摘出し凍結切片標本を作成した。その後、成熟脂肪細胞

マーカーである Perilipin A に対する蛍光免疫染色を行い、主要臓器における成熟脂肪細胞特異的な tdTomato 発現を評価した。

5. マウス乳癌細胞株の移植実験

Adipoq-CreERT2/tTomato マウス（雌性、n=3）を実験に用いた。タモキシフェンを 5 日間投与後、マウス乳癌細胞株 E0771 の移植を行った。乳腺 Fat pad への移植は、Kocatürk ら⁸の方法に準じて行った。移植から 14 日後に移植乳癌を摘出し、凍結切片標本を作成した。その後、Perilipin A、 α smooth muscle actin (α SMA)、Fibroblast-specific protein 1 (FSP1)、Cluster of differentiation (CD) 31、Neuron-gial antigen 2 (NG2)、Platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β)、Stem cell antigen-1 (Sca-1)、Delta-like 1 homolog (DLK1)、CD26 に対する蛍光免疫染色を行った。

6. 組織学的評価法

移植乳癌における tdTomato (+) 細胞、各種間質細胞マーカー (+) 細胞に対する組織学的評価を行った。成熟脂肪細胞は Perilipin A (+) 細胞として同定した。検討した間質細胞は、既報^{9 10 11 12 13 14 15 16}をもとに以下のように定義した。すなわち α SMA (+) FSP1 (+) 細胞を癌関連線維芽細胞 (Carcinoma-associated fibroblast : CAF)、CD31 (+) 細胞を EC、NG2 (+) かつ/または PDGFR β (+) 細胞を Pericyte、Sca-1 (+) DLK1 (+) または (-) 細胞を Pro-adipogenic fibroblast (PAF)、DLK1 (+) Sca-1 (-) 細胞を Reticular fibroblast (RF)、CD26 (+) 細胞を Papillary fibroblast (PF) と定義した。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、移植乳癌組織における tdTomato (+) 細胞と各種間質細胞の局在を解析した。

【結果】

1. Adipoq-CreERT2/tTomato マウスにおける成熟脂肪細胞特異的な tdTomato 発現の確認

タモキシフェンを投与した Adipoq-CreERT2/tTomato マウスから主要臓器を摘出後、凍結切片標本を作成し、Perilipin A に対する蛍光免疫染色を行い、成熟脂肪細胞特異的な tdTomato の発現を確認した。その結果、脂肪組織が存在しない肝、脾、腎、肺、卵巣の臓器実質、小腸の粘膜、粘膜下層、固有筋層には Perilipin A (+) 成熟脂肪細胞および tdTomato (+) 細胞は認められなかった。皮下脂肪組織、腸間膜脂肪組織には、脂肪滴を有しその辺縁の細胞質が Perilipin A (+) に一致して tdTomato (+) を示す成熟脂肪細胞が認められた。一方、いずれの臓器においても Perilipin A (-) の tdTomato (+) 細胞は認めなかった。

2. 移植乳癌組織内における脂肪細胞由来線維芽細胞様細胞 (Adipocyte-derived fibroblast-like cell : AFC) の同定

次に Adipoq-CreERT2/tTomato マウスの右乳腺 Fat pad へマウス乳癌細胞株 E0771 を移植し、移植 14 日後に形成された移植乳癌の凍結切片標本を用いて、Perilipin A に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、移植乳癌組織内には、Perilipin A (-) で tdTomato (+) の脂肪滴を有さない線維芽細胞様の形態を示す「脂肪細胞由来線維芽細胞様細胞 (Adipocyte-derived fibroblast-like cell : AFC)」の存在を認めた。

3. 移植乳癌組織を構成する間質細胞の同定

次に各種抗体を用いた蛍光免疫染色により移植乳癌組織を構成する間質細胞の同定を行った。その結果、乳癌組織内に CAF (α SMA (+) FSP1 (+) 細胞)、Pericyte (NG2

(+) かつ/または PDGFR β (+) 細胞)、EC (CD31 (+) 細胞)、PAF (Sca-1 (+) DLK1 (+) または (-) 細胞)、RF (DLK1 (+) Sca-1 (-) 細胞)、PF (CD26 (+) 細胞) の存在を組織学的に確認した。

4. 移植乳癌組織内における AFC の形質解析

次に各種抗体を用いた蛍光免疫染色により移植乳癌組織内に存在する AFC の形質解析を行った。AFC の Pericyte マーカーの発現状況を検討した結果、NG2 (+) PDGFR β (+) tdTomato (+) 細胞、NG2 (-) PDGFR β (+) tdTomato (+) 細胞、NG2 (+) PDGFR β (-) tdTomato (+) 細胞がそれぞれ確認された。Pericyte マーカー (+) AFC と EC の局在を評価した結果、一部の Pericyte マーカー (+) AFC は、EC に付着するようにして突起を伸長し、血管構成細胞として典型的な Pericyte 様の形態を示した。一方で、EC に直接接着せず隣接するように局在する Pericyte マーカー (+) AFC も認められた。

次に AFC の MSC マーカー (PAF、RF、PF) の発現状況を検討した。その結果、移植乳癌組織内に PAF マーカーである Sca-1 (+) DLK1 (+) または DLK1 (-) を示す tdTomato (+) 細胞を認めた。一方で移植乳癌組織内に RF マーカーである DLK1 (+) Sca-1 (-) を示す tdTomato (+) 細胞や、PF マーカーである CD26 (+) を示す tdTomato (+) 細胞は確認されなかった。

次に AFC における CAF マーカーおよび EC マーカーの発現状況を検討した。その結果、移植乳癌組織内に CAF マーカーである FSP1 (+) α SMA (+) を示す tdTomato (+) 細胞や、EC マーカーである CD31 (+) を示す tdTomato (+) 細胞は確認されなかった。

【考察】

本研究において、Adipoq-CreERT2/tTomato マウスの乳腺 Fat pad へマウス乳癌細胞株 E0771 を移植した結果、14 日後の移植乳癌組織内に、成熟脂肪細胞由来で Perilipin A (-) の線維芽細胞様形態をした AFC が出現することが明らかとなった。AFC の一部は、Pericyte や PAF の形質を有することが示唆された。成熟脂肪細胞特異的レポーターマウスを用いて、成熟脂肪細胞に由来する細胞が乳癌組織内に出現することは、これまでに報告されておらず、新規性の高い研究であると考えられる。

本研究で使用した Adipoq-CreERT2/tTomato マウスは、タモキシフェン投与下において、成熟脂肪細胞特異的に tdTomato を発現することが報告されている^{6 17 18}。本研究においてもタモキシフェン投与下に、卵巣など検討したすべての主要臓器において成熟脂肪細胞以外に tdTomato (+) 細胞は認められなかった。そのため、本遺伝子改変マウスが成熟脂肪細胞特異的レポーターマウスとして使用可能であることが確認された。

乳癌細胞株移植実験では、移植 14 日後の移植乳癌組織内に AFC の出現を認めた。この細胞は、脂肪滴を有さず線維芽細胞様の形態を示し、また成熟脂肪細胞マーカーである Perilipin A を発現していないことから、成熟脂肪細胞が形質転換を起こし、新たな形質を獲得していることが示唆された。AFC の形質解析を行った結果、AFC は CAF、EC の形質を有さないと考えられた。移植乳癌組織内に CAF、EC は多数存在しており、乳癌増殖、進展に影響を与えていると考えられるが、AFC はそのような形質は有していなかった。その一方で、Pericyte の形質を有する AFC の存在が示唆され、AFC が移植乳癌組織内の新生血管の安定化に寄与している可能性が考えられた。Pericyte マーカー (+) AFC の一部は典型的な Pericyte 様の形態を示す一方で、EC に直接接着せず隣接するように局在する Pericyte マーカー (+) AFC も認めた。癌組織内の血管は Pericyte

と EC の接着が緩いとされ¹⁹、このような AFC は、癌組織の血管に特徴的な Pericyte である可能性が考えられた。

移植乳癌組織内において、PAF の形質を有する AFC の存在が示唆された。一方で、AFC は RF、PF の形質を有しないと考えられた。PAF、RF、PF は、皮膚癌における癌微小環境に対して、細胞外マトリックス産生などの関与をしている¹²とされる。そのため、移植乳癌組織内の PAF の形質を有する AFC は、細胞外マトリックス産生などを制御することで乳癌微小環境に影響を与えている可能性がある。

Bochet ら²⁰は、マウス皮下に形成した Green fluorescent protein (GFP) 皮下脂肪体にマウス乳癌細胞株 4T1 を移植することで、GFP 皮下脂肪体の成熟脂肪細胞が線維芽細胞様の細胞へ変化し、CAF の形質を獲得すると報告した。この報告は、乳癌組織中に AFC が出現する点で、本研究結果と類似しているが、CAF の形質を有しているという点で異なる結果となった。この相違の理由として、Bochet ら²⁰の報告では、成熟脂肪細胞特異的レポーターマウスを用いず GFP 皮下脂肪体を移植した検討であることや、異なった乳癌細胞株を移植していることに起因している可能性がある。

本研究において、AFC が乳癌微小環境に及ぼす機能や影響、形質変化のメカニズムについては明らかにできなかった。今後、これらの点についてさらに検討を行う必要があると考える。

【まとめ】

移植から 14 日後の移植乳癌組織内において、脂肪細胞由来線維芽細胞様細胞(AFC) が出現することが明らかとなった。AFC は Pericyte、PAF の形質を有することが示唆される一方で、CAF、EC、RF、PF の形質は有しないと考えられた。乳癌微小環境において、周囲の成熟脂肪細胞が Pericyte や PAF の形質を獲得し、乳癌の進展に関与する可能性が示唆された。

【引用文献】

1. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-1437. doi:10.1038/nm.3394.Microenvironmental
2. Kidd S, Spaeth E, Watson K, et al. Origins of the tumor microenvironment: Quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*. 2012;7(2):e30563. doi:10.1371/journal.pone.0030563
3. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, et al. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):589-597. doi:10.1093/carcin/bgp036
4. Andarawewa KL, Motrescu ER, Chenard MP, et al. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer Res*. 2005;65(23):10862-10871. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1231
5. Tan J, Buache E, Chenard MP, Dali-Youcef N, Rio MC. Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):851-859. doi:10.1387/ijdb.113365jt
6. Sassmann A, Offermanns S, Wettschureck N. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis*. 2010;48(10):618-625. doi:10.1002/dvg.20665
7. Ewens A, Mihich E, Ehrke MJ. Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25(6 B):3905-3915.
8. Kocatürk B, Versteeg HH. Orthotopic Injection of Breast Cancer Cells into the Mammary Fat Pad of Mice to Study Tumor Growth. *J Vis Exp*. 2015;(96):1-8. doi:10.3791/51967
9. Houthuijzen JM, Jonkers J. Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(4):577-597. doi:10.1007/s10555-018-9768-3
10. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev Cell*. 2011;21(2):193-215. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001
11. Salzer MC, Lafzi A, Berenguer-Llargo A, et al. Identity Noise and Adipogenic Traits Characterize Dermal Fibroblast Aging. *Cell*. 2018;175(6):1575-1590.e22. doi:10.1016/j.cell.2018.10.012
12. Rognoni E, Watt FM. Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. *Trends Cell Biol*. 2018;28(9):709-722. doi:10.1016/j.tcb.2018.05.002
13. Pourteymour S, Lee S, Langleite TM, et al. Perilipin 4 in human skeletal muscle: Localization and effect of physical activity. *Physiol Rep*. 2015;3(8):e12481. doi:10.14814/phy2.12481
14. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(12):1640-

1646. doi:10.4161/cbt.5.12.3354
15. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, et al. PECAM-1 (CD31) Cloning and Relation to Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *Science (80-)*. 1990;247(4947):1219-1222.
 16. Stefanska A, Eng D, Kaverina N, et al. Interstitial pericytes decrease in aged mouse kidneys. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(6):370-382. doi:10.18632/aging.100756
 17. Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, Granneman JG. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J*. 2015;29(1):286-299. doi:10.1096/fj.14-263038
 18. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Scherer E, Tourtellotte WG, Varga J. Myofibroblasts in Murine Cutaneous Fibrosis Originate From Adiponectin-Positive Intradermal Progenitors. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(4):1062-1073. doi:10.1002/art.38990/abstract
 19. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(1):102-111. doi:10.1016/j.gde.2004.12.005
 20. Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73(18):5657-5668. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0530