

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04943

研究課題名(和文) 癌周囲微小環境を標的とした肺癌治療の開発

研究課題名(英文) Perspective of targeting tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer

研究代表者

新谷 康 (shintani, yasushi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90572983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌浸潤・転移に関連した上皮間葉移行EMTは癌幹細胞形質の獲得にも関連している。放射線化学療法を施行した肺癌症例の残存癌組織内にEMTマーカー陽性細胞を認め、予後に関連していた。腫瘍組織を構成する細胞成分のなかで癌関連線維芽細胞CAFはさまざまなサイトカインを産生し、中でもIL-6が腫瘍間質における癌細胞のEMT誘導に関与しTGF- $\beta$ と相乗的に作用して癌細胞でEMTを誘導した。切除標本内にCAFがびまん性に増加している症例で予後不良であった。抗線維化剤はCAFを抑制し癌治療につながる可能性がある。以上より、腫瘍間質のサイトカインループ制御が癌周囲微小環境を標的とした治療になりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment is composed of different types of stromal cells that represent a key component of tumor progression. We have reported that TGF- $\beta$  signaling mediates epithelial mesenchymal transition (EMT) in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. In order to identify new targets for prevention of metastasis, it is important to understand the molecular mechanisms that drive EMT. Interaction between cancer-associated fibroblasts (CAFs) and tumor cells have shown increased tumor cell survival via several pathways including EMT. We showed that IL-6 from CAFs enhanced TGF- $\beta$  induced EMT in NSCLC cells. Furthermore, an anti-fibrotic agent significantly inhibited production of IL-6 or TGF- $\beta$  1 of CAFs, resulting in inhibition of the EMT change in NSCLC cells. In in vivo examination, the anti-fibrotic agent also suppressed the tumor progression. Targeting CAFs as a therapeutic strategy against cancer is an intriguing concept that would benefit from further study.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 癌周囲微小環境 上皮間葉移行 癌幹細胞 癌関連線維芽細胞 抗線維化剤

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織には癌細胞に加えて炎症細胞、免疫細胞のほか、血管・リンパ管の構成細胞、線維芽細胞や炎症細胞、またコラーゲンなどの細胞外基質が存在し、腫瘍微小環境を構築している。これらの細胞や間質成分は癌細胞の生存・増殖を制御し、さらには癌浸潤・転移に関連しており、癌の悪性化にきわめて重要な役割を果たしている。腫瘍周囲の微小環境は癌幹細胞の生存・分裂のニッチとして働き、癌再発の中心的な機構であると考えられる。したがって、腫瘍微小環境の分子機構、すなわち癌細胞と微小環境とのクロストークを解明し、癌の治療抵抗性を克服することが、新しい癌治療の開発に不可欠であると考えられる。

我々は、癌微小環境の機能調節に重要な役割を果たしている上皮間葉転換 EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) に注目し、癌周囲間質に含まれる EGF、FGF、KGF や TGF-β などの増殖因子やコラーゲンから誘導される EMT シグナル伝達経路について報告してきた。EMT とは、上皮細胞が上皮としての形質を失い、線維芽細胞などの間葉系の形質を獲得する現象であり、間葉系の形質を得た癌細胞は遊走能を獲得し、浸潤・転移を起こす。細胞や動物実験を用いて、EMT シグナルを制御することで、癌細胞の浸潤能、転移能を低下させることを証明した。さらに、抗癌剤や放射線に肺癌細胞長期に暴露すると EMT が誘導され、癌幹細胞様形質を獲得する一方、EMT によって抗癌剤や放射線への耐性化が誘導されることを証明し、EMT が癌の進展だけでなく、癌幹細胞様形質を獲得することで治療抵抗性においても重要な役割を果たしていることを報告した。実際に臨床検体を用いて、生検組織と放射線化学療法後の切除標本を比較したところ、上皮マーカーが減少すること、または切除標本で間葉系マーカーが発現していることを EMT 誘導と定義したところ、50 例中 20 例で EMT 誘導が観察された。無再発生存率は有意に EMT 誘導群で低値を示し、多変量解析で EMT 誘導が独立予後因子であった。

2. 研究の目的

EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態に維持し、癌幹細胞様形質獲得を抑制することができれば、外科治療や放射線治療といった局所治療だけでなく、全身治療による抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。したがって、肺癌微小環境における EMT と治療抵抗性獲得の機序を解析し、肺癌微小環境での治療標的を同定すること、微小環境での EMT を制御し得る薬剤を開発することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞株、肺切除標本からの初代培養によって癌細胞、間質細胞を得て、癌細胞と間質細胞を含めた癌周囲微小環境との反応モデル

を作成し、EMT および癌幹細胞様形質転換に関わる分子機構を分子生物学的手法によって明らかにする。

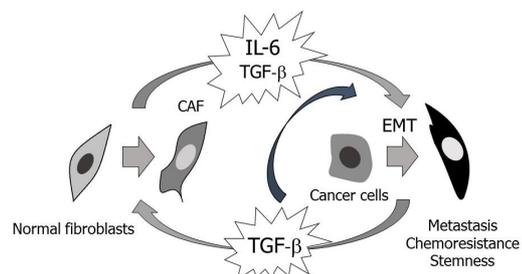
(2)細胞外基質を含めた三次元癌微小環境を再現し、癌細胞と周囲微小環境や間質細胞との相互作用によって誘導される変化を解析する。

(3)癌細胞と間質細胞を同時に接種するマウス皮下または肺への共接種モデルを用いて生体内での癌・間質相互反応を解析する。

(4)癌微小環境に選択的な分子標的治療を考案し、三次元癌微小環境モデルや動物モデルを用いて治療耐性獲得癌細胞への治療効果の検証を行い、従来の抗癌剤と組み合わせる行う集学的治療を提唱する。

4. 研究成果

(1)腫瘍組織内のさまざまな細胞のうち、固形癌間質組織を構成する細胞成分のなかで量的にもっとも主体となる線維芽細胞に着目し、手術検体から線維芽細胞を初代培養した。癌組織由来線維芽細胞は Smooth muscle actin (SMA) 陽性の筋線維芽細胞へ分化しており、癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) といわれる。癌部から採取した CAFs により、正常肺より採取した線維芽細胞に比して、癌細胞の EMT 誘導を強く誘導した。肺癌組織から採取した CAFs からはさまざまなサイトカインが産生されており、中でも炎症性サイトカインである IL-6 が腫瘍間質における癌細胞の EMT 誘導に関与し、癌細胞または微小環境で産生される TGF-β と相乗的に作用し腫瘍悪性化を引き起こすことを示した。TGF-β は、癌細胞の EMT を誘導するだけでなく、線維芽細胞を活性化の維持に関与しており、治療抵抗性に適した癌周囲微小環境へ変化していることを示した。さらに、術前に放射線抗癌剤を投与した症例では、腫瘍間質で CAFs が増加しており、CAFs が残存癌組織周囲でびまん性に増加している症例で、残存腫瘍内に EMT マーカー陽性細胞を認め、予後が不良であった。肺癌細胞は抗癌剤に暴露されることで TGF-β を分泌し、周囲の線維芽細胞を活性化させ CAFs に変化させていた。したがって、治療によって肺癌細胞が線維芽細胞を活性化し、CAFs からさまざまな EMT 誘導因子が放出され、肺癌細胞の治療抵抗性を含めた腫瘍悪性化に関与していると考えられる (下図)。以上より、CAFs が肺癌微小環境での治療標的になりえることが示唆された。

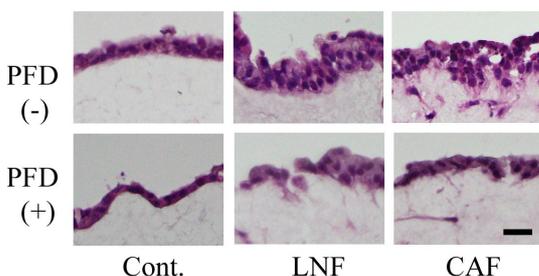


さらに、EMT が誘導された肺癌細胞は、これまで肺癌の癌幹細胞マーカーとして報告されている CD44、CD133、ABCG2、Bmi-1 などの発現が上昇することを見出した。

非小細胞肺癌はドライバー遺伝子の解析が進み、対応する分子標的薬の治療が行われる。EGF 受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) は、標準的化学療法に比べ奏効率が高いとされるが、耐性化することが知られている。EMT が EGFR 遺伝子変異の有無に関わらず、EGFR-TKI に対する耐性の機序の 1 つである可能性があり、CAF の存在によって耐性化が生じることを示した。

また、EMT は免疫抑制の誘導も行うことで癌の転移を促進すると考えられる。Programmed Death-1 (PD-1) は、T 細胞に発現しており、Programmed Death-Ligand1 (PD-L1) と結合することにより、免疫反応を抑える。癌細胞にも PD-L1 が発現しており、PD-1 と結合することで T 細胞が癌細胞を攻撃する働きを抑え、癌細胞が生き残り増殖する。そのために PD-L1 発現の高い癌は一般に予後が悪いと考えられ、PD-L1 に対する治療薬が開発され、非小細胞肺癌においてすでに治療薬として用いられている。今回、EMT 誘導転写因子を介して癌細胞の PD-L1 発現を調整されることを示し、CAF による EMT が免疫抑制誘導のメカニズムのひとつと考えられた。

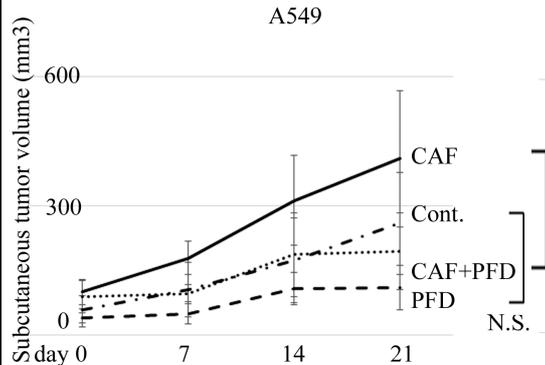
(2) 細胞外基質を含めた三次元癌微小環境を再現するために、線維芽細胞をマトリゼル、コラーゲン I を混合させた間質内で培養し、さらに癌細胞を上層で培養した。結果、生体内を模倣した癌周囲微小環境を再現できた。代表的な実験結果を下記図に示す。線維芽細胞 (正常肺 LNF、癌由来 CAF) による癌細胞増殖、間質への浸潤を評価できた。さらに、(3) で使用する薬剤の効果によって、癌細胞増殖、浸潤を抑制することを示した。



(3) 抗線維化薬 (pirfenidone) や糖尿病薬 (Metformin) による TGF- $\beta$  などの増殖因子抑制作用・抗酸化作用などの複合的な機序に注目して、癌微小環境への影響や抗癌作用について解析を行った。これらの薬物によって、

肺癌細胞株における EMT 抑制効果、肺癌細胞株における抗癌剤作用増強効果、動物モデルにおいて抗腫瘍効果を示した。下図には、免疫不全マウスに腫瘍細胞のみ (Cont)、腫瘍細胞と CAFs (CAF)、腫瘍細胞接種に

pirfenidone を投与 (PFD)、腫瘍細胞と CAFs を共接種し pirfenidone を投与 (CAF+PFD) した 4 群の腫瘍生着を示した。PFD は CAFs の腫瘍増生効果を抑制していた。さらに、腫瘍内の解析では、生着した腫瘍内の CAFs 量の減少、癌細胞に EMT 抑制、増殖抑制を免疫染色で示した。



さらに、pirfenidone が、癌細胞からの TGF- $\beta$  産生抑制および腫瘍間質内の CAFs の不活化による IL-6 産生低下によって、癌細胞の EMT を抑制し抗腫瘍効果を発揮することを見出した (現在論文作成中)。

また、癌微小環境の中で、EMT を直接制御する機序として、Podocalyxin (PODXL) の関与を同定した。PODXL をノックダウンすると TGF- $\beta$  による EMT 誘導が抑制され、過剰発現させると EMT が誘導された。PODXL は肺癌の浸潤部あるいは低分化な箇所で見られ、PODXL 発現症例は、非発現例に比べて予後が不良であった。臨床検体および肺癌細胞株の検討で、PODXL のプロモーターの脱メチル化が、PODXL の発現に関与していた。CAF との共培養によって、癌細胞の PODXL の発現が上昇した。以上より、PODXL も腫瘍微小環境内での EMT の制御に関与している可能性が示唆された。

薬剤耐性を生じやすい癌細胞に比較して、CAFs を標的とした治療には抵抗性を生じにくいと予測され、既存の癌治療に多大な相乗効果を見込めると期待される。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8件)

Kanzaki Ryu, Naito Hisamichi, Kise Kazuyoshi, Takara Kazuhiro, Eino Daisuke, Minami Masato, Shintani Yasushi, Funaki Soichiro, Kawamura Tomohiro, Kimura Toru, Okumura Meinoshin, Takakura Nobuyuki.  
Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy. Scientific Reports. 査読有、7巻、2017、10613  
DOI: 10.1038/s41598-017-10873-2  
新谷 康、舟木壮一郎、川村知裕、大瀬尚子、神崎 隆、南 正人、森井英一、奥村明之進  
胸腺癌における上皮間葉移行の臨床病理学的意義に関する解析、肺癌、査読有、57巻、2017、746-751  
DOI: <https://doi.org/10.2482/haigan.57.746>  
新谷康、奥村明之進 肺癌周囲微小環境を標的としたがん治療、日本外科学会雑誌、査読有、印刷中、2018  
Kanzaki Ryu, Ose Naoko, Kawamura Tomohiro, Funaki Soichiro, Shintani Yasushi, Minami Masato, Takakura Nobuyuki, Okumura Meinoshin.  
Stromal PDGFR- Expression is Associated with Postoperative Survival of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving Preoperative Chemo- or Chemoradiotherapy Followed by Surgery. World Journal of Surgery. 査読有、印刷中、2018  
DOI: 10.1007/s00268-018-4560-7  
Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. J Thorac Oncol. 査読有、11巻、2016.1482-92.  
DOI: 10.1016/j.jtho.2016.05.025.  
Kusumoto H, Shintani Y, Kanzaki R, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Nagatomo I, Morii E, Okumura M.  
Podocalyxin influences malignant potential by controlling epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. Cancer Sci. 査読有、108巻、2017、528-535.  
DOI: 10.1111/cas.13142.

Fujiwara A, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Minami M, Okumura M. Pirfenidone plays a biphasic role in inhibition of epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 査読有、106巻、2017、8-16.  
DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.01.006.  
Kanzaki R, Naito H, Kise K, Takara K, Eino D, Minami M, Shintani Y, Funaki S, Kawamura T, Kimura T, Okumura M, Takakura N. PSF1 (Partner of SLD Five 1) is a Prognostic Biomarker in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Treated with Surgery Following Preoperative Chemotherapy or Chemoradiotherapy. Ann Surg Oncol. 査読有、23巻、2016、4093-4100.

[学会発表](計 13件)

Shintani Y, Funaki S, Ose N, Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Morii E, Okumura M. Clinicopathological Significance of Epithelial Mesenchymal Transition in Thymic Cancer. World Conference on Lung Cancer. 2017. Yokohama.  
Funaki S, Shintani Y, Ose N, T Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, and Okumura M. Prognostic impact of Programmed cell death-1 (PD-1) tumor-infiltrating lymphocytes and Programmed cell death-1 -ligand 1 (PD-L1) expression in thymic cancer. World Conference on Lung Cancer. 2017. Yokohama.  
Kanzaki R, Naito H, Eino D, Kawamura T, Ose N, Funaki S, Shintani Y, Minami M, Okumura M, Takakura N. Stromal PDGFR- expression influences postoperative survival of NSCLC patients receiving preoperative chemo- or chemoradiotherapy. World Conference on Lung Cancer. 2017. Yokohama.  
舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、神崎 隆、新谷 康、南 正人、奥村明之進 非小細胞性肺癌におけるPD-L1発現制御について、第117回日本外科学会定期学術集会、2017、横浜  
舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、神崎 隆、新谷 康、南 正人、奥村明之進 免疫チェックポイント経路PD-1/PD-L1の発現制御による肺癌治療法の確立、第34回日本呼吸器外科学会総会、2017、福岡

楠本英則、新谷康、木村亨、川村知裕、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進  
肺腺癌におけるPodocalyxin発現と腫瘍悪性化の検討、第33回日本呼吸器外科学会総会、2016、京都

楠本英則、新谷康、木村亨、川村知裕、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進  
肺腺癌におけるPODXL発現とEMT誘導の検討 第57回日本肺癌学会学術集会、2016、福岡

藤原綾子、新谷康、舟木壮一郎、川村知裕、福井絵里子、南正人、奥村明之進  
肺癌細胞におけるピルフェニドンのEMT抑制を介した治療効果と抗癌剤の作用増強効果についての検討、第116回日本外科学会定期学術集会、2016、大阪  
藤原綾子、新谷康、舟木壮一郎、川村知裕、福井絵里子、南正人、奥村明之進  
肺癌細胞におけるピルフェニドンのEMT抑制を介した治療効果と抗癌剤の作用増強効果、第57回日本肺癌学会学術集会、2016、福岡

Shintani Y, Funaki S, Kimura T, Fujiwara A, Kawamura T, Bessho T, Inoue M, Minami M, Okumura M. Activation of TGF $\beta$ -IL6 axis mediates chemoresistance in non-small cell lung cancer by increasing epithelial-mesenchymal transition signaling. AACR annual meeting 2015.2015. Philadelphia

新谷 康、藤原綾子、木村 亨、川村知裕、舟木壮一郎、井上匡美、南 正人、奥村明之進 上皮間葉転換EMTを標的とした肺癌治療の開発、第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会、2015、神戸

楠本英則、新谷 康、川村知裕、舟木壮一郎、井上匡美、別所俊哉、南 正人、奥村明之進 非小細胞肺癌におけるPodocalyxin の臨床学的意義、第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015、横浜  
藤原綾子、新谷 康、別所俊哉、舟木壮一郎、川村知裕、井上匡美、南 正人、奥村明之進 肺癌細胞株におけるピルフェニドンによる抗腫瘍効果の検討、第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015、横浜

南 正人 (Masato Minami)  
大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10240847

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)  
研究者番号：10379232  
京都府立医科大学・医学研究科・教授

舟木 壮一郎 (Soichiro Funaki)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50464251

川村 知裕 (Tomohiro Kawamura)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30528675

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新谷 康 (Yasushi Shintani)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：90572983

### (2) 研究分担者

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40252647