

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08344

研究課題名(和文) テネイシンCの乳癌の癌間質形成における役割

研究課題名(英文) Roles of tenascin-C in stromal formation of breast cancers

研究代表者

吉田 利通 (Yoshida, Toshimichi)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80166959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：テネイシン-C(TNC)は、癌進展において重要な役割を担っていると考えられる、癌間質に高発現している。本研究は、筋線維芽細胞、癌関連線維芽細胞を含めた線維芽細胞、腫瘍関連マクロファージ(など)からなる乳癌間質の形成に、TNCがどのように関わっているのかを明らかにすることが目的である。TNCは、マクロファージに対しては遊走促進、サイトカイン発現の増強ならびにM1レパートリーへの誘導を行っており、線維芽細胞に対しては筋線維芽細胞形質への移行、収縮能の増強ならびにTNC産生の誘導を行っていることが明らかになった。これらにより、TNCは乳癌間質形成に重要な貢献を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tenascin-C (TNC) is highly expressed in cancer stroma which may be responsible for cancer progression. The aim of this study is to clarify TNC roles in formation of the breast cancer stroma composed of fibroblasts, including myofibroblasts and cancer-associated fibroblasts, and macrophages. In macrophages, TNC promotes the migration, cytokine expression, and induction to M1 repertory. TNC also enhances myofibroblast trans-differentiation, gel contraction activity, and TNC production in fibroblasts. Thus, TNC may significantly contribute to the stromal formation of the breast cancer.

研究分野：人体病理学

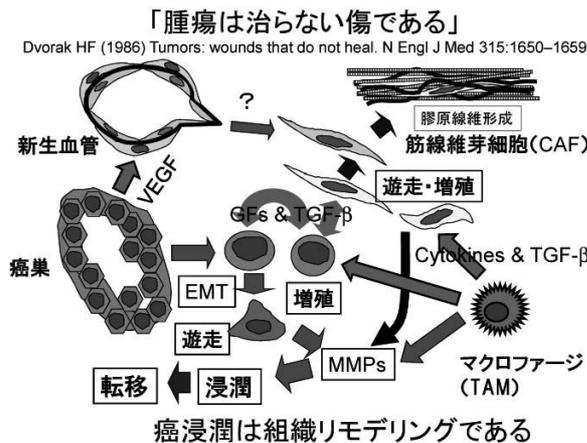
キーワード：テネイシン - C 癌間質 マクロファージ 筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

1986年にDvorakによって'Tumors: wounds that do not heal.'と題する総説がNEJMに発表され、癌間質と創傷治癒過程の肉芽組織との類似性と、腫瘍進展における間質形成の重要性が示された(文献1)。この概念は発表からおよそ30年経つが、今でも腫瘍研究の重要な方向性のひとつである。この間に間質の腫瘍進展への作用として、「防御的」から「促進的」な側面が強調されるようになってきた。

我々は細胞外マトリックス(ECM)糖タンパクのひとつ、テネイシンC(Tenascin-C, TNC)が高発現する乳癌では患者の予後が悪いことを報告した(文献2)。続いて、癌組織に発現するTNCは、癌細胞に対して上皮-間葉移行の誘導、細胞遊走・細胞増殖の促進、Matrix metalloproteinases(MMPs)産生の誘導などの効果を示すことを明らかとし、TNCが癌細胞の浸潤・転移など癌細胞側の進展を促進していることを世界に先駆けて証明してきた。他方、心筋病変、血管病変、関節病変、肝線維症、肺線維症など組織リモデリングが活発な組織で高発現し、さまざまな細胞に働きかけ、組織リモデリングを促進していることを明らかとした。

乳癌の間質で発現するTNCは、他の病変でみられる組織リモデリングと同様に、癌間質の組織リモデリングを促進し、癌細胞に働く以外に癌間質形成を介して、癌進展を促進していると考えられる。



2. 研究の目的

本研究では、筋線維芽細胞、癌関連筋線維芽細胞(CAF)を含めた線維芽細胞、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、腫瘍血管からなる癌間質の形成にTNCがどのように関わっているのかを明らかにすることが目的である。

癌間質を形成する線維芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞について、1)それらの細胞の局在とTNC沈着の分布との関連について、免疫組織化学的手法を用いて組織学的に検討を行い、2)それらの培養細胞へTNCを添加し、表現型の変化、増殖・遊走能への

影響、間質を形成する細胞外マトリックスタンパクの発現や微小環境を形成するサイトカイン産生の変化を観察し、TNCが癌間質の形成にどのように関わっているかを明らかとする。加えて、それぞれの細胞で利用されるTNCレセプターやシグナリングを明らかとしたい。

3. 研究の方法

(1) TNCの線維芽細胞の表現型、増殖、遊走への影響とそのシグナリング

線維芽細胞の組織学的検討

筋線維芽細胞のマーカーとして α -Smooth muscle actin(α -SMA)の発現、癌関連筋線維芽細胞のマーカーとしてPodoplaninなどの発現を免疫染色しTNCの分布と比較した。

TNCによる線維芽細胞の表現型の変化に関する細胞生物学的検討

乳線維芽細胞の初代培養細胞を購入し、TNC添加後の α -SMA, podoplanin, caveolin-1などの発現の変化を、蛍光抗体法、Western blot法で解析した。

TNC添加に伴うECMタンパク産生の変化

線維芽細胞のコラーゲンなどの産生を定量PCR法で検討した。

TNCレセプターとシグナリング

レセプター阻害剤・中和抗体およびシグナル阻害剤を培養細胞に作用させ、形質変化の抑制を観察した。

(2) TNCによるマクロファージの活性化、増殖、遊走への影響とそのシグナリング

組織学的検討

乳癌組織におけるマクロファージの局在と癌間質のTNCとの沈着との関連について組織学的に検討を行った。

TNCによるマクロファージの表現型の変化に関する細胞生物学的検討

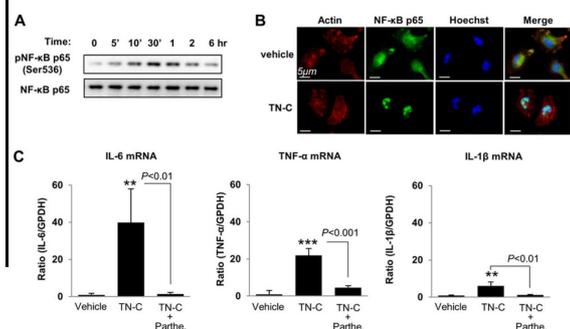
マウスの腹腔内マクロファージとGM-CSFで誘導されたマウスマクロファージを用いた。遊走能の促進作用、マクロファージの活性化を表面マーカーとサイトカインmRNAレベルで検討を行った。

4. 研究成果

マクロファージに対するTNCの効果

ヒト乳癌組織では多数のマクロファージの浸潤がみられ、TNCの沈着部位に集積していた。

マウスの腹腔内マクロファージはTNC存在下で遊走が促進され、TNC添加はInterleukin(IL)-6及びmonocyte chemo-

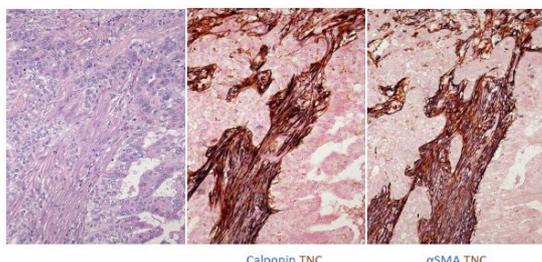


attractant protein(MCP)-1 の発現レベルを上昇させた。この系ではインテグリン $\alpha v\beta 3$ の接着斑の形成を促し、FAK と SRC のリン酸化の増強を伴っていた。また、このシグナルは NF κ -B のリン酸化と核への移行を誘導し、NF κ -B, SRC やインテグリン $\alpha v\beta 3$ の阻害剤はいずれも TNC が誘導するマクロファージの IL-6 産生を抑制した。

他方、癌組織ではないが心筋梗塞モデルを用いて、野生型と TNC 遺伝子ノックアウト (KO) マウスでのマクロファージの M1 と M2 のレパートリーの差も検討した。野生型では IL-6, IL-1 β , iNOS, CCL2 の発現の上昇が顕著で、TNCKO マウスでは IL-10, Mrc1, Arg-1 の発現増強が優位であった。つまり野生型のマウスでは M1 への移行が顕著であり、TNCKO では炎症が軽微で M2 分画が優位であった。骨髄細胞幹細胞から GM-CSF で分化したマクロファージを用いた検討では、TNC 添加が IL-6, IL-1 β , iNOS, CCL2 の発現を増加させ、M1 マクロファージへのシフトを促進させていた。また、TNC の添加後の M2 マクロファージへのシフトへの影響を検討した。TNC 単独では、M2 マーカーである MRC1 の発現は変化しなかったが、M2 マクロファージに誘導する IL-4 存在下では、TNC が存在すると誘導されるはずの MRC1 発現が低下した。また、M2 への誘導に関与する転写因子 IRF4 の発現は TNC 存在下では減少していた。この減少は TLR4 阻害薬により抑制され、インテグリン抗体では影響を受けなかった。TNC はマクロファージの M1 シフトの促進と M2 シフトの抑制の両方に働いており、いずれも TLR4 が関与していることが明らかとなった。

線維芽細胞に対する TNC の効果

ヒト乳癌で筋線維芽細胞マーカー (Calponin, α -SMA など) とがん関連線維芽細胞のマーカー (S100A4 と podoplanin など) の発現を確認した。癌周囲及びTNC陽性間質中にこれらを発現する線維芽細胞を認めため、TNC がこれらのタンパク発現を誘導するかどうかを解析した。



プラスチック上で培養したヒト乳癌線維芽細胞 (HMF) はコントロール群では細長い紡錘形で一定の方向性を示したが、TNC 添加群 (10 μ g/mL) では星状の細胞突起を有し無秩序に配向した。カバーガラス上では TNC 添加群は互いに凝集しクラスターを形成した。Western blot で癌関連線維芽細胞マ

ーカーのタンパク質発現を検討すると、TNC 添加で Calponin, α -SMA 発現が有意に増加し、筋線維芽細胞形質への変化が顕著であった。他のマーカーでは有意な発現上昇は観察できなかった。HMF の蛍光免疫染色では、TNC 処理でストレスファイバーの発達と Calponin および α -SMA 陽性細胞の増加が見られた。蛍光抗体法により、ヒト乳癌組織で TNC とこれら線維芽細胞マーカーの局在を再検討したが、いずれも TNC の分布と極めてよく一致していた。また、TNC 添加は HMF のコラーゲンゲル収縮能を上昇させた。さらに、TNC 添加は I 型および III 型コラーゲンの発現に変化を及ぼさなかったが、TNC の mRNA 自体の発現を増加させ、フィブロネクチンおよびシンデカン-4 をタンパク質レベルで発現を上げた。TNC の発現は筋線維芽細胞に分化していない細胞でもよく見られた。レセプターについては、阻害剤添加の実験で、シンデカン-4 とインテグリン $\alpha v\beta 3$ の関与については否定的であり、継続して究明しているところである。シグナルについても阻害剤を添加して解析を行ったが、有意なシグナル経路は判明していない。

加えて、皮膚線維芽細胞では Calponin 発現誘導は弱く、ヒト組織の乳癌皮膚浸潤部でもその傾向がみられ、乳腺線維芽細胞でこれらの形質変化はより顕著であることが示唆された。

これらより、TNC は乳腺線維芽細胞を高収縮性の筋線維芽細胞へ形質転換させ、乳癌特有の癌間質形成に寄与していると考えられた。

以上より、癌組織で高発現している TNC はマクロファージや線維芽細胞に働き、癌間質の形成に重要な効果を示していると考えられ、レセプターやシグナルを制御することにより、癌進展を抑制できる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315:1650-9.
2. Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 1995;1:1035-41.

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 11 件)

Hayasaki A, Murata Y, Usui M, Hibi T,

Ito T, Iizawa Y, Kato H, Tanemura A, Azumi Y, Kuriyama N, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Yoshida T, Isaji S. Clinical Significance of Histological Effect and Intratumor Stromal Expression of Tenascin-C in Resected Specimens After Chemoradiotherapy for Initially Locally Advanced Unresectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. 査読有, 2018 47:390-399. doi: 10.1097/MPA.0000000000001022.

Liu L, Fujimoto M, Nakano F, Nishikawa H, Okada T, Kawakita F, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Suzuki H., Deficiency of Tenascin-C Alleviates Neuronal Apoptosis and Neuroinflammation After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Mol Neurobiol* 査読有, 2018, 印刷中
DOI: 10.1007/s12035-018-1006-z

Iwamoto Masanao, Okazaki Alice, Murata Sayaka, Hirukawa Masaki, Miyamoto Keiichi, Murata, Tomohiro, Ishikawa Eiji, Yoshida Toshimichi, Horiuchi Takashi. Peritoneal Dialysis Fluid-Induced Fragmentation of Golgi Apparatus as a Biocompatibility Marker. *Artif Organs*, 査読有, 2018, 印刷中
DOI: 10.1111/aor.13092

Matsui Y, Hasegawa M, Iino T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sudo A. Tenascin-C Prevents Articular Cartilage Degeneration in Murine Osteoarthritis Models. *Cartilage*, 査読有, 2018, 9: 80-88
DOI: 10.1080/14397595.2017.1349560

Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Liu L, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Suzuki H. Effects of Tenascin-C Knockout on Cerebral Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Mol Neurobiol* 査読有, 2018, 55: 1951-1958
DOI: 10.1007/s12035-017-0466-x

Liu L, Kawakita F, Fujimoto M, Nakano F, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Suzuki H. Role of Periostin in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice., *Stroke*, 査読有, 2017, 48:1108-1111
DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.016629

Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Liu L, Nakasaki A, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Suzuki H. Epidermal growth factor-like repeats of tenascin-C-induced constriction of cerebral arteries via activation of epidermal growth factor

receptors in rats. *Brain Res*. 査読有, 2016, 1642: 436-444
DOI:10.1016/j.brainres.2016.04.034

Fujimoto M, Shiba M, Kawakita F, Liu L, Shimojo N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Suzuki H. Deficiency of tenascin-C and attenuation of blood-brain barrier disruption following experimental subarachnoid hemorrhage in mice. *J Neurosurg*. 査読有, 2016, 124:1693-702.
DOI: 10.3171/2015.4.JNS15484.

Shimojo N, Hashizume R, Kanayama K, Hara M, Suzuki Y, Nishioka T, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may accelerate cardiac fibrosis by activating macrophages via the integrin $\alpha V\beta 3$ /nuclear factor- κB /interleukin-6 axis. *Hypertension*. 査読有, 2015, 66:757-66.
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06004.

Nozato T, Sato A, Hikita H, Takahashi A, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K, Hiroe M. Impact of serum tenascin-C on the aortic healing process during the chronic stage of type B acute aortic dissection. *Int J Cardiol*. 査読有, 2015, 15;191:97-9.
DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.05.009.

Horii R, Honma N, Ogiya A, Kozuka Y, Fukuda T, Yoshida M, Ohsumi S, Mukai H. The Japanese Breast Cancer Society Clinical Practice Guideline for pathological diagnosis of breast cancer. *Breast Cancer*, 2015, 22:59-65
DOI:10.1007/s12282-014-0549-8

[学会発表](計20件)

加藤大祐, 白木裕太, 今中(吉田)恭子, 吉田利通 Tenascin-Cは乳線芽細胞を高縮性の筋線維芽細胞へ形質転換させる 第50回日本結合組織学会学会学術大会 2018

米林 沙織, 田尻 和子, 酒井 俊, 木村 泰三, 佐藤 明, 青沼 和隆, 廣江 道昭, 吉田利通, 今中恭子 テネイシンC過剰発現マウスでの心筋梗塞病態の増悪 第49回日本結合組織学会学術大会 2017

山本大貴, 豊福優衣, 加藤大祐, 三浦典子, 大野尚仁, 吉田利通, 今中恭子 川崎病モデルマウスの冠動脈瘤形成とテネイシンCの発現 第49回日本結合組織学会学術大会 2017

服部徹也, 長谷川正裕, 海野宏至, 細井敬, 伊東直也, 今中 恭子[吉田], 吉田利通, 深井文雄, 須藤啓広 テネイシンCのペプチドであるTNIII A2の培養軟骨細胞における効果 第49回日本結合組織学会学術大会 2017

長谷川正裕, 服部徹也, 伊東直也, 細井敬, 今中恭子[吉田], 吉田利通, 須藤啓広 関節の修復・再生 テネイン C を用いた関節軟骨の修復・変性抑制 第 49 回日本結合組織学会学術大会 (招待講演) 2017

山口和摩, 坂本善士郎, 加藤大祐, 吉田利通, 今中恭子 心筋細胞に対するテネイン C の作用 第 106 回日本病理学会総会 2017

小塚祐司 アポクリン病変と乳頭状病変-境界病変は存在するか- 第 14 回日本乳癌学会中部地方会 (招待講演) 2017

杉江知治, 佐藤永一, 宮下穰, 三上芳喜, 山口倫, 坂谷貴司, 小塚祐司, 森谷鈴子, 鈴木栄治, 垣見和宏, 森谷卓也 「それぞれの癌」難治性癌に対する治療戦略 乳腺 癌微小環境におけるトリプルネガティブ乳癌の免疫応答 第 55 回日本癌治療学会学術集会 2017

長野真由子, 齋藤佳菜子, 小塚祐司, 木本真緒, 澁澤麻衣, 今井奈央, 野呂綾, 稲上馨子, 花村典子, 石原幹也, 田丸智巳, 水野聡朗, 小川朋子 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と術前化学療法の治療効果に関する検討 第 25 回日本乳癌学会総会 2017

野呂綾, 長野真由子, 木本真緒, 今井奈央, 澁澤麻衣, 野原有起, 伊藤みのり, 山下雅子, 稲上馨子, 花村典子, 小川朋子 Important points to achieve the best result in breast conserving surgery 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017

野呂綾, 長野真由子, 木本真緒, 澁澤麻衣, 今井奈央, 稲上馨子, 花村典子, 小川朋子 造影 MRI で同定し得なかった広範な浸潤癌の一例 第 14 回日本乳癌学会中部地方会 2017

今中恭子, 吉田利通 組織リモデリングの鍵分子 第 48 回日本結合組織学会学術大会 2016 招待講演

花村典子 整容性と根治性のバランス 第 24 回日本乳癌学会学術総会 招待講演 2016

小塚祐司 乳腺疾患の両悪性鑑別診断のポイント UP-TO-DATE 乳管内上皮増殖巣 第 105 回日本病理学会総会 2016 招待講演

木村泰三, 田尻和子, 佐藤明, 酒井俊, 廣江道昭, 吉田利通, 今中恭子 テネイン C でマクロファージの M1/M2 polarization を制御し、心筋梗塞後リモデリングを促進する 第 105 回日本病理学会総会 2016

吉田利通 組織リモデリングの微小環境 - テネイン C を中心として - 第 13 回日本病理学会カンファレンス 2016 招待講演

吉田利通 癌進展と癌間質形成における

テネイン - C の役割 第 104 回日本病理学会総会 2015 招待講演

小塚祐司 乳腺乳頭状病変の病理分類 第 104 回日本病理学会総会 2015 招待講演

山下雅子, 小川朋子, 木本真緒, 今井奈央, 澁澤麻衣, 野呂綾, 由井朋, 柏倉由実, 中村卓, 岡南裕子, 花村典子, 小塚祐司 乳房温存術後乳房内再発の検討 第 23 回日本乳癌各回学術大会 2015 年 T. Yoshida, D. Kato, K. Imanaka-Yoshida. Acidic extracellular pH induces epithelial-mesenchymal transition-like change in breast cancer cells. 2015 ASCB meeting, 2015 国際学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
修復再生病理学 - 三重大学大学院医学系研究科・医学部
URL:http://www.medic.mie-u.ac.jp/pathol_matrix/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 利通 (YOSHIDA, Toshimichi)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 80166959

(2) 研究分担者

小塚 祐司 (KOZUKA, Yuji)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50378311

田中 典子(花村典子) (HANAMURA, Noriko)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号： 60437100
(削除平成 29 年 3 月 21 日)

野呂 綾 (NORO, Aya)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 00747173
(追加平成 29 年 3 月 21 日)

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()