

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18416

研究課題名(和文) 癌内線維芽細胞による癌悪性化におけるNotchシグナルの役割

研究課題名(英文) Roles of Notch signaling in tumor malignancy induced by carcinoma-associated fibroblasts

研究代表者

ワリ ナディラ (Wali, Nadila)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90751868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CAFsによるNotchシグナルの役割を明らかにする事を試みた。申請者のグループで樹立されたヒト乳癌由来のCAFsを用い、Notch関連因子の遺伝子発現をReal-time PCRで検討した。その結果、対照のヒト正常乳腺由来線維芽細胞と比較して、Notchシグナルが活性化し、活性化線維芽細胞能を媒介していることが示唆された。この結果より、CAFsにおけるNotchシグナルの活性化がCAFsの癌促進に寄与している可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞に焦点をあてた治療は、悪性化した癌細胞においては高頻度に治療抵抗性の表現型を促進することが知られている。癌微小環境に多数存在する線維芽細胞が癌悪性化に促進していることより、癌内の線維芽細胞で異常に活性化しているシグナルを解明し、癌治療に応用する試みは、今後の癌治療学において治療抵抗性などの厄介な問題を克服するために極めて重要な立ち位置をしめると思われる。

研究成果の概要(英文)：Roles of Notch signaling in CAFs were investigated. The real-time PCR and Western blot analysis indicated activation of Notch signaling in CAFs. Inhibition of Notch signaling attenuated activated fibroblastic traits in CAFs. Activated Notch signaling might mediate CAFs' tumor-promoting ability in vivo.

研究分野：癌生物学

キーワード：癌微小環境 線維芽細胞 Notch シグナル 乳癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去30年間の癌研究は、癌細胞における遺伝子変異や、シグナル伝達の異常のメカニズムの解析を中心に行われてきた¹。しかしながら癌塊は癌細胞に加えて、間質に存在する線維芽細胞、炎症細胞や血管内皮細胞などの多数の非癌細胞により構成されている。これらの間質細胞が、癌細胞の増殖、細胞死、血管新生、浸潤や転移に強く影響していることが最近の研究により明らかにされている^{2,3}。癌の悪性化は、癌塊内の癌細胞と間質細胞間の相互作用により誘導促進されることより、ヒト癌の生物学的研究を癌診断学や治療学に応用する為には、癌塊内で起こっている現象を、癌細胞や間質細胞別に、分子レベルで理解することが不可欠である。

申請者の所属する研究グループは、患者乳癌塊より CAFs を抽出し、この細胞が非癌部に存在する線維芽細胞と比較して、癌塊中で stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) を高発現し、癌血管新生や癌細胞の増殖を顕著に促進することを明らかにした^{2,3}。加えて、癌化の過程において、SDF-1 と TGF-beta の autocrine signaling の獲得が、CAFs の癌の進展促進能の誘導と維持に必須であることを示した⁴。また、癌進展過程で CAFs は近傍の乳癌細胞に作用し、癌細胞の周囲組織への浸潤能、血管外脱出能や遠隔臓器へのコロニー形成能を促進し、結果的に転移能を著明に亢進することを明らかにした。

これらの知見から、申請研究では、CAFs が Notch シグナルの誘導を介して、癌微小環境や癌細胞を活性化し、転移能を促進するという着想に至った。研究代表者は、順天堂大医学部・病理・腫瘍学にて申請研究に着手した。

Notch シグナルの活性化が活性化筋線維芽細胞への分化や、乳癌幹細胞の未分化能の促進に重要であることが知られている。申請者は、CAFs が癌微小環境内の Notch シグナル活性化の発信源として作用し、癌微小環境を活性化し癌細胞の悪性化に関与していると推測している。最近の申請者のグループの研究結果より、CAFs が SDF-1 や TGF-beta シグナル以外にも Notch リガンドの発現を亢進していることがわかっている(未発表データ：研究計画・方法参照)。申請研究では、CAFs 由来 Notch リガンドが Notch 受容体陽性の近傍の細胞に作用し、Notch シグナルを活性化する可能性を調査した。CAFs 由来 Notch リガンドは近傍の線維芽細胞や CAFs に作用し CAFs への分化促進やその表現型の維持に関与し、癌促進的な微小環境の構築に寄与しているかもしれない。

2. 研究の目的

間質細胞で高発現している Notch リガンドは、その受容体を介して血球細胞や上皮細胞などの数々の細胞に juxtacrine の様式でシグナルを誘導し、分化や増殖を誘導することが明らかにされている。また Notch シグナルの亢進が癌幹細胞の未分化能の維持や、癌転移能の亢進に寄与することも知られている。申請者は、発生や器官形成において上皮-間質細胞の相互作用に重要な役割を演じている Notch シグナルは、癌細胞と間質細胞との相互作用にも重要であることを想像し

ている。申請研究では、癌微小環境の主要な構成細胞である癌内繊維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts; CAFs) が Notch シグナルを介して、癌微小環境を活性化し乳癌を悪性化する分子機構を明らかにし、診断や治療に役立てたい。

3. 研究の方法

90%の癌患者の死亡は癌転移再発に起因する。申請研究では癌微小環境中の CAFs が Notch シグナルの誘導を介して、癌微小環境の活性化や癌悪性化に寄与していることを明らかにする。癌浸潤・転移を克服できる社会実現の達成に向けて、次の目標 ~ を設定して戦略的にアプローチした。CAFs による癌微小環境の活性化における Notch シグナルの役割を明らかにする。加えて、CAFs による癌浸潤・転移促進における Notch シグナルの役割を明らかにする。そして患者乳癌と CAFs を共移植した前臨床マウスモデルを使用し、Notch シグナル抑制剤の効果を検討する。以上より、CAFs による癌悪性化における Notch シグナルの役割を3ヵ年計画で研究した。

4. 研究成果

本研究では、CAFs による癌微小環境の活性化における Notch シグナルの役割を明らかにする事を試みた。申請者のグループで樹立されたヒト乳癌由来の CAFs を用い、Notch 関連因子の遺伝子発現を Real-time PCR で検討した。その結果、対照のヒト正常乳腺由来線維芽細胞と比較して、Notch リガンド Jag1 と Notch ターゲット Hes1 と Hes4 の発現が著明に亢進していた。また、Notch 受容体である Notch3 の発現が中等度上昇していた。この結果より、恒常的な Notch シグナルの活性化が、CAFs の活性化線維芽細胞能や癌促進能を媒介していると想像される。また、シグナルを送る CAF に発現している Notch リガンドが、シグナルを受け取る CAF に発現している Notch を活性化し、Notch シグナルを誘導していることが推測された。一方、シグナルを受け取った CAF も Notch リガンドを発現し、Notch の活性化を介してシグナルを送った CAF に Notch シグナルを誘導し、CAF 間で相互的な Notch シグナルの活性化が起こっていることが想像される。

申請者は、Jag1 や Notch3 の発現が shRNA により抑制された CAFs を作製した。予期したように shRNA による Notch シグナルの抑制は、Notch intracellular domain3 (NICD)3 や Hes1 蛋白の発現量の低下や活性化線維芽細胞のマーカーである alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) の発現量の低下を示した。対照的に、Jag1 や Notch3 を過剰発現した乳腺由来線維芽細胞は、Notch シグナルの亢進および活性化線維芽細胞能の増加を示した。以上の結果より、CAFs で亢進している Notch シグナルが CAFs の線維芽細胞活性化能を媒介している可能性が示唆された。

これらの CAFs で発現した Notch リガンドが癌細胞で発現している Notch に作用し、癌細胞の浸潤・転移を促進していることが予期される。マウスモデルを使用した in vivo 実験を施行したが再現性のあるデータが得られていない。今後、再現性のあるデータを得るために繰り返しの実験が必要である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

1. 招待講演: ワークショップ講演 乳癌内線維芽細胞と癌浸潤・転移 折茂 彰、伊藤 恭彦、目澤 義弘、Kaidiliavi Sulidan、Nadila Wali、竹田 省、奥村 康、竹田 和由、樋野 興夫、浜田 道昭、松村 優子 第27回日本癌病態治療研究会 6月1日2018年 千葉
2. English oral presentation: CAFs boost mammary cancer invasion and metastasis via formation of the epithelial and mesenchymal tumor cell cluster. Akira Orimo, Yasuhiko Ito, Yoshihiro Mezawa, Kaidiliavi Sulidan, Nadila Wali, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura 第76回日本癌学会学術総会 9月28-30日2017年横浜
3. English oral presentation, Akira Orimo, Nadila Wali, Yasuhiko Ito, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura, CAFs boost mammary cancer metastasis via increasing the cell-cell adhesion 第75回日本癌学会学術総会 10月8日2016年横浜
4. Poster presentation, Carcinoma-associated fibroblasts raise highly metastatic human breast cancer cells via an autocrine signaling loop mediated by CEACAM5 and CEACAM6-Src., Yuko Matsumura^{1,2)}, Yasuhiko Ito¹⁾ Nadila Wali¹⁾, Takumi Ito¹⁾, Kaoru Mogushi⁴⁾, Yasuhisa Terao²⁾, Satoru Takeda²⁾, Ko Okumura³⁾, Kazuyoshi Takeda³⁾, Okio Hino¹⁾, and Akira Orimo¹⁾ 第75回日本癌学会学術総会 名古屋、10月9日2015年

〔図書〕(計1件)

1. 折茂彰, 松村優子, 本多一貴, Nadila Wali, がん内線維芽細胞とがんの悪性化 Vol.33 No.5 73-80 癌小環境と標的治療 実験医学 羊土社 2015年

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 折茂彰

ローマ字氏名: ORIMO, Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。