

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19419

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化による腫瘍進展促進：PAI-1の関与の検討

研究課題名(英文) Inhibition of PAI-1 limits chemotherapy resistance of lung cancer through suppressing myofibroblasts characteristic of cancer-associated fibroblasts.

研究代表者

益田 武 (Masuda, Takeshi)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：80747890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：背景；肺癌の抗癌剤への耐性化にCancer-associated fibroblast：CAFが注目され、CAFの中でもMyofibroblastへ分化したMyofibroblastic (MF)-CAFはこの耐性に強い関与が認められる。目的；PAI-1抑制によるCAFのMF形質抑制により化学療法への耐性が抑制できるかを検討した。結果；癌細胞をCAFと共培養すると、共培養しない場合よりも抗癌剤の効果が減弱したが、PAI-1阻害によりCAFのMF形質を抑制した場合は、その効果が増強した。結論；PAI-1は腫瘍内にMF-CAFを有し、化学療法に耐性を示す肺癌に対する治療標的となり得る。

研究成果の概要(英文)：Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is associated with the differentiation of fibroblast into myofibroblasts (MF). Fibroblasts in the tumor stroma are called cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs with MF phenotype promote chemotherapy resistance. Here, we investigated whether inhibition of PAI-1 suppresses the MF phenotype of CAFs and results in increased chemosensitivity in lung cancer. We found that PAI-1 inhibition in CAFs co-cultured with lung cancer cells increased the effects of chemotherapy. Our data suggest that inhibition of PAI-1 increases the chemosensitivity of lung cancer cells by suppressing the MF phenotype of CAFs. Hence, PAI-1 might be a promising therapeutic target for patients with chemoresistant lung cancer with CAFs.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 癌関連線維芽細胞 PAI-1 筋線維芽細胞 化学療法

1. 研究開始当初の背景

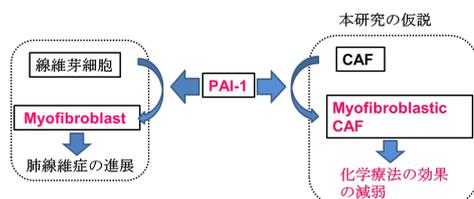
肺癌の悪性度は高く、抗癌剤への耐性化を呈する頻度も多いことから、他の癌腫に比べて治療成績は未だ不良である。この肺癌の悪性度や抗癌剤に対する耐性化に寄与する因子として、癌間質に存在する癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast : CAF) が注目されている。CAF は様々な分子機構を介して腫瘍細胞の浸潤、増殖、転移能を促進しており (Shimoda M, et al. Semin Cell Dev Biol 2009)、その中でも筋線維芽細胞 (Myofibroblast; MF) へ分化したものの (Myofibroblastic-CAF; MF-CAF) は腫瘍進展をより強く促進し、化学療法への耐性に関与することが報告されている (Hu M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は血管内皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞や腫瘍細胞などから産生される分子量 47-kDa の糖タンパクであり、plasminogen activator の活性化を阻害する線溶系の抑制因子として機能している。PAI-1 は肺線維症の研究においては、線維芽細胞から MF への分化に関わることで肺線維症を進展させることが報告されており (Huang WT, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012)、我々の研究室でも同様の実験結果を得ている (Omori, et al. PLoS One. 2016)。

2. 研究の目的

これらの研究成果を踏まえて、私は、PAI-1 が肺線維症において線維芽細胞の MF への分化に関わるのと同様に CAF が MF-CAF へ分化する過程にも関与し、その結果として腫瘍進展や化学療法への抵抗性の獲得が促進されるのではないかと仮説を立てた。私達の研究室では既に、肺癌細胞株を用いた腫瘍モデルを用いて、腫瘍間質を含む宿主細胞から産生される PAI-1 が腫瘍血管新生と腫瘍進展を促進することを見出し、PAI-1 阻害剤の使用で腫瘍血管新生と腫瘍進展が抑制されることを明らかにしている (Masuda, et al. Mol Cancer Ther. 2013)。

本研究では、この PAI-1 阻害薬を用いながら、PAI-1 の腫瘍進展や化学療法への耐性獲得への関与が、血管新生のみならず CAF から MF への分化も介することを証明することを目標としている。



3. 研究の方法

(1) 肺癌組織内の癌細胞または間質の細胞から産生される PAI-1 が CAF の MF 形質 α -SMA 発現に関与するかどうかを解明する。

肺癌組織の中で PAI-1 を産生する細胞を同定するために、肺癌組織のパラフィン切片を PAI-1 抗体で免疫染色し、PAI-1 発現細胞を同定する。

肺癌組織内の MF-CAF の割合と PAI-1 発現量に関連があるかどうかを調べるために、MF マーカーである α -SMA 抗体で肺癌組織切片を免疫染色し、肺癌組織内の PAI-1 陽性面積と α -SMA 陽性面積の割合を求め、この両者に相関があるかどうかを検討する。

(2) PAI-1 が CAF の MF 形質に関与するかどうかを *in vitro* で検討する。

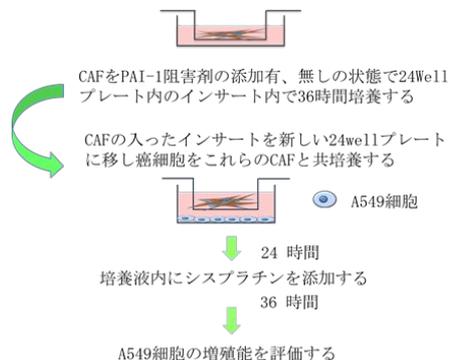
肺腺癌患者から得られた CAF を用いて、PAI-1 が CAF の MF 形質に直接関わっているかどうかを検討するため、CAF の培養液に PAI-1 阻害剤を添加した場合に添加しなかった場合と比較して、CAF の α -SMA 発現が抑制されるかどうかを quantitative real-time PCR (qRT-PCR) により調べる。

更に、CAF の一部は元々肺に存在する肺線維芽細胞であり、この肺線維芽細胞は腫瘍微小環境で TGF- β 刺激を受け、MF 形質を獲得していると考えられる。よって、ヒト肺線維芽細胞 (MRC-5) とマウス肺線維芽細胞 (MLF) の培養液に TGF- β を添加し、PAI-1 阻害剤を添加した場合に肺線維芽細胞細胞の α -SMA 発現が抑制されるかどうかを qRT-PCR により調べる。

(3) CAF の MF 形質維持に PAI-1 がどのような機序を介して関わっているかを検討する。

この目的のため、CAF の培養液に、PAI-1 阻害剤を添加した場合としなかった場合で、どのような蛋白の発現量に変化があるかを定量的質量分析により検討した。

(4) PAI-1 阻害を介した CAF の MF 形質抑制により化学療法の感受性が増加するかどうかを検討する。具体的な方法は以下の Figure で示す。



また、我々は TGF- β 刺激を与えた肺線維芽細胞においても PAI-1 抑制は同様の効果

が得られるかどうかを検討した。ここでは、癌細胞として PC-9 に対して Afatinib を、LLC 細胞に対してシスプラチンを投与した。

(5) ヒト肺癌組織において、癌間質の MF - CAF の割合と相関する PAI-1 発現量が肺癌進展に関係があるかどうかを調べる。

*, $p < 0.05$ 、NS: not significant.

4. 研究成果

(1)

PAI-1 発現細胞の同定

1. 対象

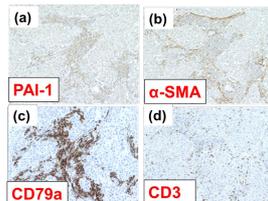
2001 年から 2011 年に当院で手術を施行された肺腺癌症例の中で、腫瘍間質に線維芽細胞の増殖が認められ、研究に検体利用の同意を得られた症例を対象にした。

Table 1 患者背景

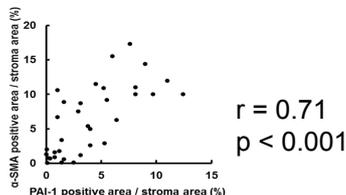
n=34	
Age	65.4 ± 0.6
Sex (Male / Female)	27 / 7
PS (ECOG 0-1 / 2-3)	32 / 2
EGFR gene mutation (+ / - / unknown)	3 / 8 / 23
T (1 / 2 / 3 / 4)	12 / 16 / 2 / 4
N (0 / 1 / 2 / 3)	20 / 8 / 5 / 1
Stage (I / II / III)	16 / 8 / 10

免疫染色により、下記 Figure のように PAI-1 は腫瘍細胞よりも腫瘍間質で高発現し、その間質の細胞は α -SMA 陽性の MF、CD79a 陽性の B リンパ球や CD3 陽性の T リンパ球であることが示された。

PAI-1、 α -SMA、CD3、CD79a の免疫染色



さらに、下記 Figure のように腫瘍内の PAI-1 発現量は α -SMA 発現量と相関が認められた。

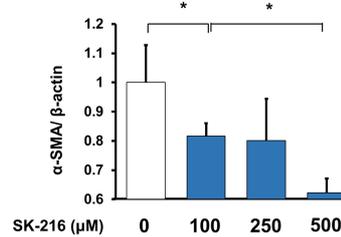


この結果から、肺癌組織において腫瘍間質内の PAI-1 発現量は α -SMA 発現量、MF-CAF の割合と関係があることが示唆された。

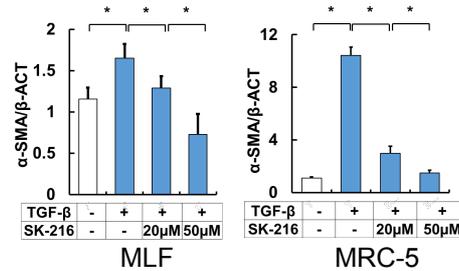
(2)

CAF に対して PAI-1 阻害剤;SK-216 の添加有り又は無しで 36 時間培養した。続いて、CAF を回収して、qRT-PCR により α -SMA 発

現量を評価した。



SK-216 による PAI-1 阻害により CAF の α -SMA 発現が抑制された。この結果により、PAI-1 は CAF の形質維持に関与していることが示された。

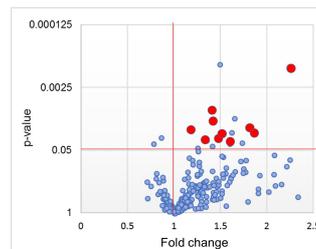


上記 Figure から、PAI-1 阻害により TGF- β 刺激による肺線維芽細胞の α -SMA 発現、つまり MF への分化も抑制されることが示された。

(3)

蛋白発現量の変化について

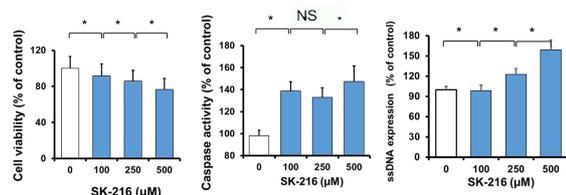
CAF を培養し、PAI-1 阻害剤を添加した 36 時間後に、iTRAQ®試薬を用いた質量分析を行った。その結果、PAI-1 阻害剤により処理された CAF ではコントロールと比較して、468 個の蛋白量に変化が認められた。



468 個の蛋白の内、18 個の蛋白は PAI-1 阻害剤により処理を受けた場合、コントロールと比較して、統計学的有意に発現量が増加していた。

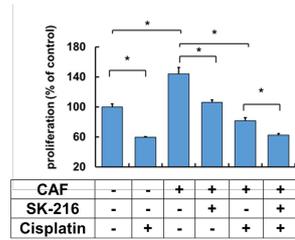
この 18 個の蛋白の内、10 個の蛋白はアポトーシスに関連した蛋白であった(上の Figure 内では、赤点で示している)。

この結果から、PAI-1 の CAF の形質維持にはアポトーシスの関与が強く疑われた。よって、CAF に PAI-1 阻害を添加した際に apoptosis が起きているかどうかを検討した。

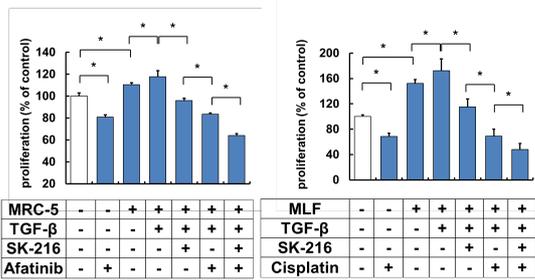


PAI-1 阻害剤を投与した場合は、投与しない場合と比較して、上記 Figure のように Cell viability の低下やカスパーゼ活性の上昇、ss DNA の増加が認められた。以上より、PAI-1 の CAF の形質維持にはアポトーシスが関与していることが示された。

(4)



CAF と共培養した A549 細胞に対するシスプラチンの効果は、CAF と共培養しない場合に比較して減弱した。一方で、A549 細胞と CAF を共培養する前に、CAF を PAI-1 阻害剤で処理した場合は、シスプラチンの効果が回復した。この結果は、PAI-1 の抑制は CAF の MF 形質抑制により癌細胞の化学療法への耐性を改善することを示している。

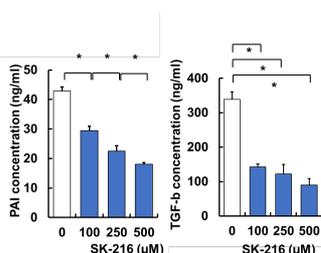


Cancer cell ; PC-9

Cancer cell ; Lewis lung carcinoma

PC-9 または LLC と TGF-β 刺激を与えた MRC-5 細胞又は MLF 細胞を共培養すると、アファチニブ又はシスプラチンの効果は、共培養しなかった場合よりも減弱した。一方で、PAI-1 阻害剤で線維芽細胞の MF への分化を抑制した場合は、化学療法の効果が改善した。この結果により、PAI-1 阻害により TGF-β 刺激を受けた線維芽細胞株の MF への分化を抑制すると癌細胞の化学療法への耐性が改善することが確認された。

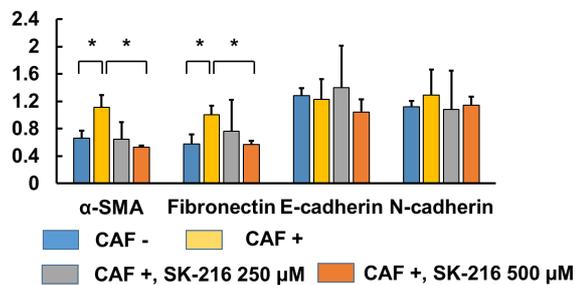
続いて、我々は、PAI-1 阻害による CAF の MF 形質抑制により、癌細胞の化学療法への耐性が改善する機序を検討した。MF-CAF は



様々な成長因子やケモカインを産生して、癌細胞の化学療法への耐性に関与することが知られている。

ここで、我々は CAF が産生する TGF-β と PAI-1 発現の関与を検討した。上記 Figure に示すように、PAI-1 阻害剤で処理された CAF に比べてコントロールの CAF の培養液中の PAI-1 と TGF-β 濃度は高値であることが確認された。

TGF-β は EMT の主な誘導因子であり、PAI-1 は TGF-β の下流で線維芽細胞の EMT に関与することが報告されている。よって、PAI-1 阻害による CAF の MF 形質抑制により、癌細胞の化学療法への耐性が改善する機序は TGF-β と PAI-1 発現量の減弱による癌細胞の EMT 抑制によるものではないかと考えられた。そこで、PAI-1 阻害剤により MF 形質が抑制された CAF 又はコントロールの CAF と共培養した癌細胞の EMT マーカー発現を qRT-PCR で評価した。



PAI-1 阻害剤により処理をされた CAF と共培養された癌細胞ではコントロールと比べて、間葉系マーカー発現の低下が認められた。

(5)

Patient characteristics	No.	PAI-1 (%) Mean ± SD	p value	
Age	65	18	2.6 ± 0.6	NS
	> 65	16	5.0 ± 0.9	
Sex	Male	24	4.3 ± 0.7	NS
	Female	7	2.6 ± 1.1	
T factor	1, 2	28	3.2 ± 0.6	0.007
	3, 4	6	7.1 ± 1.1	
N factor	0	20	3.0 ± 0.7	NS
	1-3	14	5.2 ± 1.0	
Stage		16	2.0 ± 0.5	0.002
		18	5.7 ± 0.8	

T3 と T4、stage 2 と 3 の症例では、T1 と 2、stage 1 の症例より腫瘍内の PAI-1 発現量が統計学的有意に高値であった。

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)

Otsuki T, Nakashima T, Hamada H, Takayama Y, Akita S, Masuda T, et al. Aminopeptidase N/CD13 as a Potential Therapeutic Target in Malignant Pleural

Mesothelioma. Eur Respir J. 査読有, 51: 2018. doi: 10.1183/13993003.01610-2017.

Masuda T, Hirano C, et al. The extent of ground-glass attenuation is a risk factor of chemotherapy-related exacerbation of interstitial lung disease in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Chemother and Pharmacol. 査読有, 81: 2018: 131-139. doi: 10.1007/s00280-017-3476-5.

Tokumo K, Masuda T, et al. Nivolumab-induced severe pancytopenia in a patient with lung adenocarcinoma. Lung Cancer. 査読有, 119: 2018: 21-24. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.02.018.

Fukuhara K, Nakashima T, Abe M, Masuda T, et al. Suplatast tosilate protects the lung hyperoxic lung injury by scavenging hydroxyl radicals. Free Radic Biol Med. 査読有, 106: 2017: 1-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.014.

Yamaguchi K, Iwamoto H, Sakamoto S, Horimasu Y, Masuda T, et al. AGER rs2070600 polymorphism elevates neutrophil-lymphocyte ratio and mortality in metastatic lung adenocarcinoma. Oncotarget. 査読有, 88 : 2017: 94382-94392. doi: 10.18632/oncotarget.21764.

Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, Horimasu Y, Masuda T, et al. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Dis Markers. 査読有, 2016:4759040. doi: 10.1155/2016/4759040.

Takayama Y, Hattori N, Hamada H, Masuda T, et al. Inhibition of PAI-1 Limits Tumor Angiogenesis Regardless of Angiogenic Stimuli in Malignant Pleural Mesothelioma. Cancer Res. 査読有, 76: 2016: 3285-94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1796.

Akita S, Hattori N, Masuda T, et al. MT95-4, a fully humanized antibody raised against aminopeptidase N, reduces tumor progression in a mouse model. Cancer Sci. 査読有 106: 2015: 921-928. doi: 10.1111/cas.12692.

〔学会発表〕(計6件)

益田 武、他 癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化による腫瘍進展促進:PAI-1 の関与の検討、第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、2017 年 4 月 21 日、東京

Sachiko Shioya, Noboru Hattori, Takeshi Masuda, et al. PAI-1 plays an important role in radiatiopn-induced pulmonary fibrosis, American Thoracic Society International Conference 2016, 2016/05/13, San Francisco, CA

Takeshi Masuda, et al. PAI-1 plays an important role in lung cancer progression through the association with differentiation of cancer-associated fibroblasts to myofibroblasts, American Thoracic Society International Conference 2016, 2016/05/13, San Francisco, CA

益田 武、他、癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化による腫瘍進展促進:PAI-1 の関与の検討、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 04 月 10 日、京都

益田 武、他、癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化による腫瘍進展促進:PAI-1 の関与の検討、第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015 年 11 月 26 日、横浜

益田 武、他、癌関連線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化による腫瘍進展促進:PAI-1 の関与の検討、第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、2015 年 4 月 17 日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件) ○取得状況(計0件)

〔その他〕ホームページ等

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.0bce7807760771d6520e17560c007669.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

益田 武 (Masuda Takeshi)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 80747890

(2) 研究協力者

難波 将史 (Namba Masashi)

中島 拓 (Nakashima Taku)

服部 登 (Hattori Noboru)