

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 3 0 年 6 月 2 0 日現在

機関番号 : 3 2 6 2 0

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2015 ~ 2017

課題番号 : 1 5 K 1 9 4 3 0

研究課題名 (和文) 非小細胞肺癌における癌関連肺線維芽細胞による癌進展のメカニズムの解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of cancer progression by cancer-associated lung fibroblasts in non-small cell lung cancer

研究代表者

米尼万 吐拉甫 (Miniwan, Tulafu)

順天堂大学・医学 (系) 研究科 (研究院) ・博士研究員

研究者番号 : 0 0 7 3 9 5 3 4

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) : 肺癌組織中の癌関連線維芽細胞(CAF)の機能解析及びより効果的なCAFを標的とする薬剤の開発につながる新たな知見の創出を目標とした。CAFの生理機能活性を制御するCAF特異的マーカーの中でもCAFで高発現しているITGA11が、CAFに強く発現しCAFの遊走能活性の亢進に関わっていることを解明した。また、CAFに発現するITGA11を介してCAFから産生されるファイブロネクチンが機能に作用することを発見した。CAFに発現するITGA11は再発の予測マーカーとしても期待さえ、CAFを介する癌の進展を制御するための新たなCAF標的創薬につながる基盤研究となった。

研究成果の概要 (英文) : Cancer-associated fibroblasts (CAF) are major component cells in cancer stroma and play a crucial role in accelerating tumor progression interact with cancer cells. Our purpose is to develop new findings, which are led to functional mechanism of cancer-associated fibroblasts (CAF) in lung cancer tissues and development of effective at targeted drugs. CAF-specific markers that regulate the physiological functional activity, it was elucidated that ITGA 11 highly expressed in CAF and is involved in the enhancement of the migration activity. We also found that fibronectin produced from CAF via ITGA 11 expressions. ITGA 11 expressed in CAF is as well expected as a predictive marker of recurrence. Our results provide additional evidence that ITGA11 can modulate cancer associated fibroblast activity and may play a role in lung cancer developments. ITGA11 may be an attractive therapeutic target of cancer stroma to block the lung cancer invasion.

研究分野 : 呼吸器内科

キーワード : 癌関連肺線維芽細胞 非小細胞肺癌 CAF特異的マーカー CAFの生理機能活性 CAF標的創薬

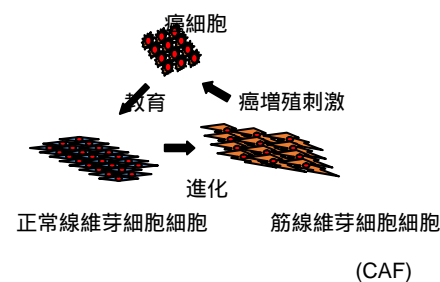
1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本における癌死の第一位である予後の悪い癌種であり、進行を防ぐ為のより効果的な治療法の解明が急務である。これに対し近年、生体内における癌細胞の増殖、浸潤、転移などの生物学的多様性が、近接する癌間質によって規定されていることが示唆されてきた。癌間質の主な構成成分である線維芽細胞は、癌関連肺線維芽細胞：CAF と称され、これらの研究より CAF は、癌治療の新たな標的として世界的な注目を集めている。実際に癌間質線維芽細胞(CAF)の病理形態像の検討より、CAF の存在様式が癌悪性度と強く相関していることが数多く報告されている (Cancers (Basel). 2013 Jan 31;5(1):149-69)。さらに CAF と癌細胞との共培養やマウスへの混合移植モデルを用いた研究によって、CAF が癌の進展を多面的に促進させる事が実証されつつある。そこで肺癌化学療法の奏効率をより効果的に上げるためには、肺癌細胞を取り巻く癌間質、とりわけ CAF を対象としたより多面的なアプローチが必要と考えられる。

CAF は、本来の肺臓器固有の線維芽細胞が、癌細胞の増殖や進展により変化し、活性化された筋線維芽細胞の特性を持つと考えられている。癌細胞は、癌塊のなかで線維芽細胞を筋線維芽細胞に変化させ、後にその癌筋線維芽細胞よりの増殖促進シグナルを受け、より悪性の癌細胞に変化させている。つまり、癌細胞と線維芽細胞は、癌内で共に進化していると考えられ、癌細胞は、間質組織との密接な連携のもとにはじめて生存可能であり、癌細胞-癌間質相互作用は、まだまだこれから発展する分野である（表1）。今後さらに癌間質の各種細胞間の相互作用を理解することにより、従来とは、全く異なった新たな治療戦略や診断法に発展する可能性が高い従来の肺癌細胞のみを標的とした治療法概念にとらわれず CAF により維持

される癌微小環境を含めた包括的標的治療が癌死因の第一位である肺癌の予後を飛躍的に改善させることが期待される。本研究成果は、CAF を標的とした分子標的治療法の確立に基盤形成をなす研究である。将来的に肺癌患者の実地治療に多大なる効果が期待され癌患者の生命予後の改善につながり学術的意義は非常に大きい。

表1 癌内微小環境における癌細胞-CAF 相互作用



2. 研究の目的

近年の癌間質の病理形態像の検討より、癌細胞のみならず癌間質量や癌間質の遊走、増殖能の高さが患者予後と強く相関していることが数多く報告されてきた。その中でも癌間質の線維芽細胞つまり癌関連線維芽細胞 (CAF)が筋線維芽細胞へと変化する上皮間葉転換が癌の転移や増殖を促進していると考えられている。しかし現在、肺癌におけるCAFの機能解明は未だ不十分である。本研究のゴールはCAFの機能解析及びより効果的なCAFを標的とする薬剤の開発につながる新たな知見の創出である。本研究では、癌組織中の癌関連肺線維芽細胞を分離培養し、癌間質へ選択的かつ効率的に遊走し動員されるCAFの生物学的検討を非癌部の肺線維芽細胞と比較検討を行い、その現象を解明して、CAFを標的とする従来にない癌治療法につながる基盤研究として、全く新しい領域から解明することを本研究の主目的とする。癌の進展に重要な鍵を握るCAFの機能解析の結果が、分子標的治療法も含めたより効果的な治療法の解明に寄与するものと考えている。

3．研究の方法

非小細胞肺癌の手術症例より、正常肺線維芽細胞(Control 群)及び CAF の分離培養を行う。正常肺 線維芽細胞に対する CAF の生理活性機能を(1)遊走能、(2)コラーゲンゲル収縮能、(3) CAF 特異的マーカーの同定に着目し in Vitro による機能解析を行う。肺線維芽細胞の Fibronectin に対する遊走能を Boyden chemotaxis chamber 法を用いて行う。コラーゲンゲル収縮能はゲル中の肺線維芽細胞が細胞外基質の産生と収縮性ストレスファイバーとして 平滑筋アクチンを産生することによるゲルの収縮の程度を測定する。ゲルの収縮の程度が強ければ線維芽細胞の活性化が亢進したと考えられ in vitro における、癌進展及び転移に關与する CAF の分化及び活性化の仮想モデルとして採用した。また、CAF の生理機能を制御する、サイトカイン、成長因子等の同定や CAF と肺癌細胞の共培養系を構築し肺癌細胞-CAF の相互作用も含め CAF の生理機能活性に重要な CAF 特異的マーカーを探索した。CAF と肺癌細胞の共培養系を構築し肺癌細胞-CAF の相互作用を検討では CAF を含むコラーゲンゲルと A549 との共培養を行った。A549 との相互作用により CAF を含むゲルが更に活性化されると CAF 単独のゲルと比較してより収縮する。ゲルの収縮の程度を経時的に測定することにより A549 との相互作用を介する CAF の活性化を定量的に判断が可能となる。また、CAF の Conditioned media を遊走刺激因子として用い A549 の遊走能及び増殖能を検討した。CAF の機能活性化亢進に關与する細胞培養液上清のサイトカイン、成長因子の産生量も測定した。それらの細胞内伝達系制御に關わるメカニズムを究明した。

4．研究成果

研究成果として

- (1) 非癌部の正常肺線維芽細胞と比較し CAF の肺線維芽細胞の生理機能活性を特に CAF の(1)遊走能、(2) コラーゲンゲル収縮能は Control と比較して亢進していることが判明したが増殖能には差を認めなかった。
- (2) この生理機能の違いに影響を起こす CAF の特異的制御因子として我々は ITGA11 の発現が CAF で高発現していることに着目し、CAF から産生されるファイブロネクチンが機能に作用することを発見した。
- (3) 肺癌組織免疫染色でも発現が亢進している事を確認した。また ITGA11 を介する相互因子が ERK シグナルを介して CAF の遊走能の亢進に關与しており癌細胞との共培養系でもそれらの発現が亢進させることを確認しました。
- (4) 実際、CAF における ITGA11 の発現は術後早期再発と関連していたことから、ITGA11 はより CAF の制御機能に關わる臨床マーカーであることが確認された。
- (5) ITGA11 を肺線維芽細胞に Knockdown 及び強制発現し遊走能が制御されるかを確認した。Knockdown により遊走能が顕著に抑制されていることを確認した。遊走刺激因子であるファイブロネクチンが抑制されることも確認した。
- (6) CAF の Conditioned media を用い肺癌細胞株 A549 の遊走能を検討した結果、A549 の遊走能を刺激した。逆に A549 の Conditioned media は線維芽細胞の ITGA11 の発現を増強した。また、CAF と A549 を共培養した結果ファイブロネクチンの産生がさらに亢進した。

CAF の生理機能活性を制御する CAF 特異的マーカーの中でも CAF で高発現している ITGA11 が、CAF に強く発現し CAF の遊走能活性の亢進に関わっていることを解明した。ITGA11 は CAF を介する癌の進展を制御するための新たな CAF 治療標的として期待され、CAF 標的創薬につながる基盤研究となった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Miniwan Tulafu. Overexpression of Collagen11A1 as Cancer-associated fibroblasts marker of NSCLC. 第 57 回呼吸器学会総会 2017

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

米尼万 吐拉甫 (MINIWAN, Tulafu)
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・
博士研究員
研究者番号：00739534