

令和元年6月24日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10547

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞中のシグナル阻害による抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Antitumor effect by signal inhibition in cancer-related fibroblasts

研究代表者

原 賢康 (HARA, MASAYASU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80528860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん組織における血管新生を誘発する因子は必ずしも癌細胞のみから分泌されているわけではない。本来は悪性化したわけではない宿主由来の生体組織、特に癌関連間質細胞(CAF)も癌の血管新生に一役買っている。

今回我々が明らかにしたものは、CAFから腫瘍細胞の血管新生を促進する経路としてCAF細胞の中でErkのリン酸化が大きく影響していることである。このErkのリン酸化を抑制することで、血管新生を亢進させる炎症性サイトカイン：IL-6のCAFからの分泌のみならず、CAFからの血管新生因子：VEGF産生が抑制された。Erkリン酸化を抑制したCAFは血管内皮細胞の増殖を亢進しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまでの癌細胞に主眼を置いた研究と異なり、癌の周辺に存在する間質細胞由来の癌進展を促進する機序の解明を目的としている。癌の間質細胞のひとつ、癌関連間質細胞(CAF)からは癌細胞よりも多くの血管新生因子が放出されているとされているが、今回の我々の研究でそのCAFからの血管新生因子放出にCAFの細胞内でのErkのリン酸化が大きく影響していることが明らかとなった。Erkのリン酸化を抑制したCAFは血管内皮細胞の増殖を促進しないことが明らかとなった。今後この機序をより強力に抑制することで、癌細胞内の血管新生を更に抑えることが可能となり、現在よりも強力な化学療法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Not only cancer cells, but also cancer stromal cells promote angiogenesis in cancer. By now, many investigators revealed the angiogenesis caused by cancer cells. However, to suppress the angiogenesis in cancer, clarification of the mechanism of angiogenesis caused by cancer stromal cell is also necessary.

We revealed one of the most important cancer-stromal cells, CAF (Cancer-Associated fibroblast) promotes several kind of angiogenetic factor. In this study, we clarified that the blockage of Erk phosphorylation in CAF caused the suppression of the secretion of inflammatory cytokine: IL-6 and one of the angiogenetic factor: VEGF from CAF. We also revealed that CAF whose Erk phosphorylation was blocked did not promote co-cultured endothelial cells' proliferation, whereas normal CAF stimulated their proliferation.

Further study to block the Erk phosphorylation effectively will be useful to suppress angiogenesis caused by stromal cells in cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 CAF 血管新生 bevacizumab

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

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の化学療法として、血管新生を抑制する抗血管新生剤は治療の根幹を成している。これらは放出された血管新生因子を抑制する治療薬であるが、その放出機序までの解明はなされていない。更に放出する細胞そのものも従来は癌細胞によると考えられてきた。近年、癌間質細胞のうち、癌関連線維芽細胞 (CAF) がこの血管新生因子の放出に関わっていること、その放出量も当初考えられていたものよりもはるかに多いことが言われ始めていた。これら CAF からの血管新生因子の放出の機序を明らかにした研究はみられなかった。

### 2. 研究の目的

“癌”を形成するものは癌細胞単独ではない。これらのうち、特に癌関連線維芽細胞 (CAF) から分泌される VEGF 以外の血管新生因子の存在が、bevacizumab における耐性獲得や biomarker が存在しないといった問題を説明する上で重要と考える。

そこで、CAF 化の機序、癌細胞の増殖への作用を明らかにしていきたい。signal、分泌タンパクを解析することで、CAF 化したことによる活性化し獲得した機能を明らかにし、その分泌の signal である STAT3 を抑制することで、標的と考えている CAF 由来の血管新生因子の分泌が抑制できるかどうかを確認し、実際に抗血管新生作用を発揮できるかを、更には抗腫瘍効果を発揮できるかを明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) CAF から分泌される、VEGF 以外の血管新生因子を以下の手順で検討する。

##### IL-6 による癌細胞、CAF からのサイトカイン、血管新生因子分泌の変化

大腸癌腫瘍細胞、CAF、正常線維芽細胞から分泌されるサイトカイン量を培養液上清から明らかにする。この手技には一度に多種類のサイトカインに対して ELISA にて解析できる multicytokine assay を使用し、それぞれの細胞からのサイトカイン、血管新生因子のタンパクレベルでの分泌量を測定する。それらの分泌量の、IL-6 存在下、IL-6 非存在下での分泌量の差異を評価する (以下、CAF 由来の血管新生因子と記す)。サイトカインアッセイで明らかにできない場合にはマイクロアレイを用いて遺伝子レベルにて亢進している遺伝子を明らかとする予定である。

癌細胞、或いは CAF から分泌される因子は癌間質相互作用としてお互いに影響しあう可能性がある。そこで で同定した癌細胞 (或いは CAF) からのサイトカイン、血管新生因子を CAF (或いは癌細胞) に投与し、再度同様にして multicytokine assay を施行しサイトカイン、血管新生因子の分泌量の変化を測定し、癌間質相互反応によるサイトカイン、血管新生因子分泌の差異についても明らかとする。

##### 同定したサイトカイン、血管新生因子の血管新生への関与

腫瘍細胞、CAF、血管内皮細胞を共培養した状態で IL-6 を投与する。(1)と同様の解析を行うことで、より生体に近い状態で IL-6 の腫瘍内での血管新生への影響を in vitro で評価する。更に細胞培養の上清を ELISA にて解析することで実際の腫瘍内に近い環境での CAF 由来の血管新生因子の分泌量をタンパクレベルで測定する。

#### (2) 先に明らかにした血管新生因子を CAF が放出するためのシグナルを明らかとし、炎症性サイトカイン IL-6 などの関与を in vitro で明らかとする。手順は以下のものを予定している。

IL-6 の下流である JAK/STAT3 系のシグナルについて Western blotting assay で確認する。IL-6 刺激の有無別で CAF、正常線維芽細胞における IL-6 下流のシグナルを確認し、正常線維芽細胞と比較することで CAF 化の過程で起こるシグナルの変化を明らかにし、CAF の特性を検証する。特に IL-6 下流のシグナルについては恒常的に亢進している可能性がある。その場合には亢進部より上流でのシグナル抑制は無意味となるため、以下の実験で使用する薬剤としてその亢進部より下流のシグナルを抑制する薬剤を選択する必要がある。今回細胞からの IL-6 分泌を抑制することで知られている EPA を用いてシグナルを解析する。

#### (3) 同定した CAF 由来の血管新生因子が bevacizumab の効果を低下させていることを in vitro で明らかとする。

癌細胞、CAF、血管内皮細胞を共培養し、同定した CAF 由来の血管新生因子を投与した状態での bevacizumab 投与、非投与群を培養、CD34 で免疫染色を施行し血管新生を比較する。また血管内皮細胞単独の培養に対し bevacizumab を投与し、bevacizumab の抗血管新生作用をコントロールとして明らかにしておく。これらの bevacizumab の血管新生抑制効果が単独での培養に比べ、共培養時にどの程度抑制されているかを明らかにすることで、CAF 由来の血管新生因子の存在が bevacizumab 耐性獲得に関与しているかを検討する。

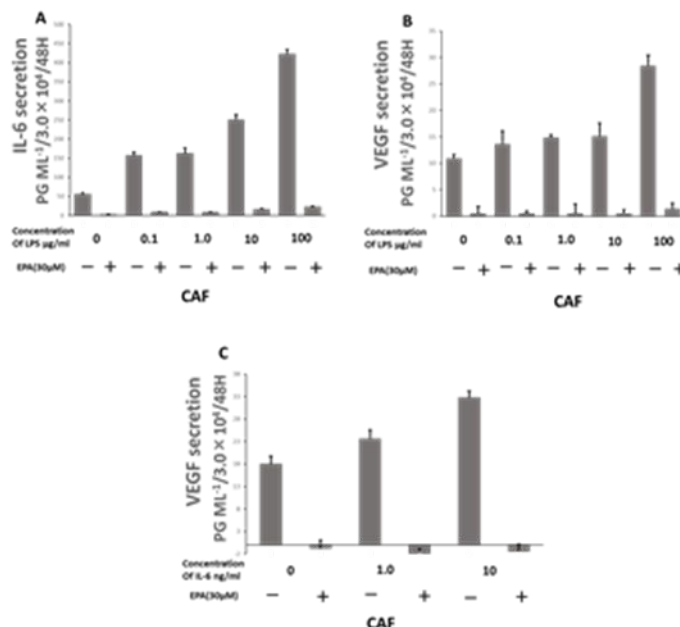
#### 4. 研究成果

##### (1) IL-6 による癌細胞、CAF からのサイトカイン、血管新生因子分泌の変化

multicytokine assay, microarray を用いて解析、CAF から IL-6, VEGF, IL-8 などの血管新生因子の放出を確認した。それぞれについてすべてを解析することは時間的に困難であったため、本研究では VEGFA について集中的に解析を行った。

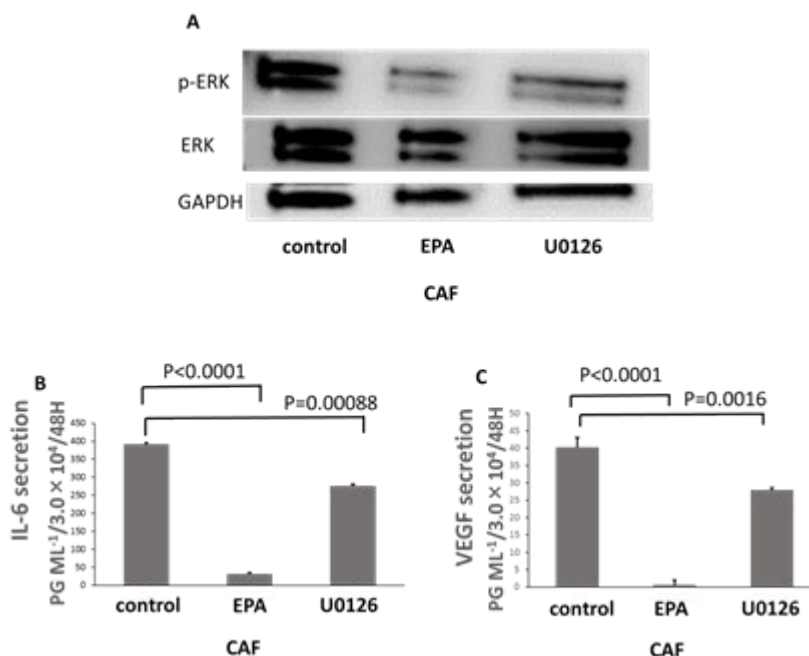
##### 同定したサイトカイン、血管新生因子の血管新生への関与

下図に示す通り、CAF からの IL-6 分泌は LPS を投与することで濃度勾配的に上昇することが明らかとなった。また EPA 投与によってこの IL-6 分泌は顕著に抑制された (A)。同様の反応は CAF からの VEGFA 分泌においても観察され (B)、CAF に LPS を投与することで CAF からの VEGFA 分泌は濃度勾配的に上昇するにもかかわらず、EPA 投与はこの VEGF 分泌を顕著に抑制した。この分泌は IL-6 分泌を抑制することで生じるものなのか、あるいは CAF に直接作用して、IL-6 とは関係なく VEGF 分泌を抑制するのかを明らかにするため、CAF に同濃度の EPA を投与した状態で IL-6 を濃度勾配にわけて投与したが、IL-6 値の上昇にかかわらず VEGFA の分泌は全く上昇しなかった。このことは EPA が CAF からの VEGFA 分泌を直接抑制していることの証明と考えられる。



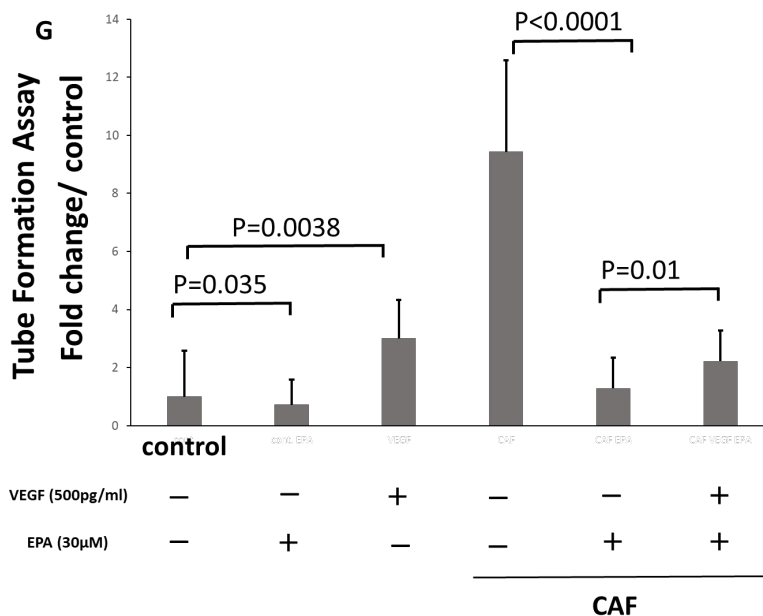
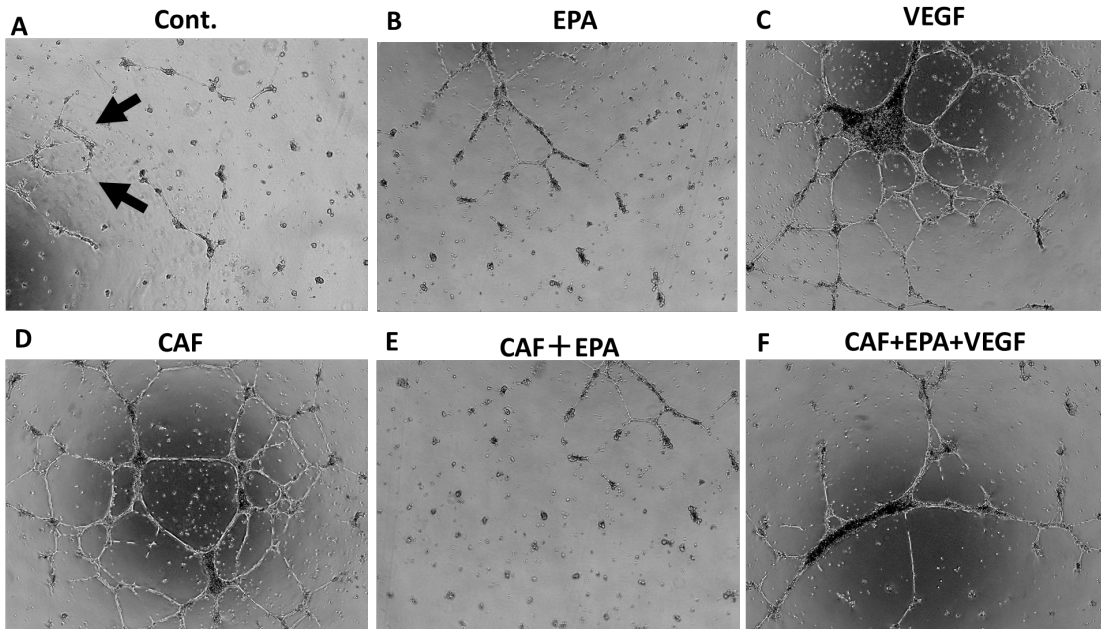
##### (2) 先に明らかにした血管新生因子を CAF が放出するためのシグナルを明らかとし、炎症性サイトカイン IL-6 などの関与を in vitro で明らかとする。

JAK/STAT 系のシグナルについて Western blot を用いて解析、EPA 投与で CAF 細胞内の ERK のリン酸化が抑制されていることが明らかとなった (A)。このことは同部のリン酸化阻害剤である U0126 を用いても同様の結果が得られ、また CAF からのタンパク分泌を部分的ではあるも抑制することが明らかとなった (B, C)。



(3) 同定した CAF 由来の血管新生因子が bevacizumab の効果を低下させていることを *in vitro* で明らかとする。

上記で予定した癌細胞、CAF, 血管内皮細胞すべての共培養では安定した血管細胞の増生が得られなかったため、癌細胞と CAF とを共培養した condition medium を血管内皮細胞に投与して血管新生への影響を *in vitro* で評価することとした。以下の図に示す通り、CAF からの VEGFA 分泌を抑制する EPA を癌細胞、CAF の共培養に投与することで血管内皮細胞の増生が抑制された (E)。この実験系に VEGFA を投与することで EPA による抑制はある程度改善したことから EPA の直接的な作用による血管内皮細胞の増生抑制ではなく VEGFA 分泌を介した抑制であると判断した (F)。



がん組織における血管新生を誘発する因子は必ずしも癌細胞から分泌されているわけではない。本来は悪性化したわけではない宿主由来の生体組織も癌の進展に一役買っていることが今回の研究でさらに明らかとなった。今回の期間内に我々が明らかにし得たものは、CAF が腫瘍細胞に血管新生を提供する経路として2つあるということ、一つは癌細胞から放出される IL-6 に依存し、もう一つは CAF そのものが血管新生因子を放出するというものである。これらは今回いずれの経路も EPA で抑制されることが明らかとなった。このことは EPA が癌細胞のみならず CAF を介しても抗腫瘍効果を有することを示している。一方で EPA 自体は以前から抗腫瘍効

果を期待され臨床使用もされてきたにも関わらずその抗腫瘍効果を確固たるものとし得なかったことを鑑みても EPA 自体における抗腫瘍効果は十分ではないと考えざるを得ない。今後さらなる抗癌治療への貢献を期待する上で重要なことは今回明らかとした CAF の血管新生因子放出の機序として IL-6 を介した経路、pERK を介した経路を抑制することは、CAF を介した血管新生作用を抑制する、という点であり今後はさらにこの点を発展させ、より効率的に、かつ強力に CAF からの血管新生因子放出を抑制する手段を明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Eicosapentaenoic acid suppresses angiogenesis via reducing secretion of IL-6 and VEGF from colon cancer-associated fibroblasts. Ando N, Hara M, Shiga K, Yanagita T, Takasu K, Nakai N, Maeda Y, Hirokawa T, Takahashi H, Ishiguro H, Matsuo Y, Takiguchi S. *Oncol Rep*. 2019 Jul;42(1):339-349. doi: 10.3892/or.2019.7141. Epub 2019 May 2. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

In vitro における colon cancer-associated fibroblast から産生される IL-6 と VEGF に対する EPA の抑制効果とそれに伴う血管新生抑制

安藤菜奈子, 原賢康, 志賀一慶, 柳田剛, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 高橋広城, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司

第 26 回日本消化器関連学会週間, 2018 年 11 月 3 日 (神戸)

bevacizumab 投与における血中 VEGF 値の推移と治療効果への影響

原賢康, 柳田剛, 安藤菜奈子, 仲井希, 前田祐三, 廣川高久, 志賀一慶, 高橋広城, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司

第 56 回日本癌治療学会学術集会, 2018 年 10 月 18 日 (横浜)

Bevacizumab による大腸癌化学療法治療中患者の血漿 VEGF 値の推移

安藤菜奈子, 原賢康, 柳田剛, 前田祐三, 志賀一慶, 廣川高久, 高橋広城, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司

第 73 回日本消化器外科学会総会, 2018 年 7 月 12 日 (鹿児島)

In vitro における colon cancer-associated fibroblast から産生される IL-6 と VEGF に対する EPA の抑制効果と血管新生抑制

安藤菜奈子, 原賢康, 志賀一慶, 長崎高也, 柳田剛, 佐本洋介, 前田祐三, 大久保友貴, 齊藤健太, 高橋広城, 石黒秀行, 松尾洋一, 瀧口修司

第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 (横浜)

がん栄養療法の基礎研究 In vitro における colon cancer-associated fibroblast から産生される IL-6 に対する EPA の抑制効果

安藤菜奈子, 原賢康, 高橋広城, 志賀一慶, 長崎高也, 前田祐三, 今藤裕之, 佐本洋介, 柳田剛, 竹山廣光

第 32 回日本静脈経腸栄養学会学術集会 2017 年 2 月

In vitro における colon cancer-associated fibroblast から産生される IL6 と VEGF に対する EPA の抑制効果とそれに伴う血管新生抑制

安藤菜奈子, 原賢康, 柳田剛, 今藤裕之, 佐本洋介, 前田祐三, 志賀一慶, 長崎高也, 高橋広城, 竹山廣光

第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年 4 月 (横浜)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 志賀 一慶

ローマ字氏名: SHIGA, kazuyoshi

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 20747282

研究分担者氏名：高橋 広城  
ローマ字氏名：TAKAHASHI, hiroki  
所属研究機関名：名古屋市立大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：30381792

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。