

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08015

研究課題名(和文)大腸癌細胞による癌促進性ニッチ構築機構の解明

研究課題名(英文)Dissecting molecular mechanisms underlying formation of tumor-promoting niches by colon cancer cells

研究代表者

坂本 直人(sakamoto, naoto)

順天堂大学・医学部・客員准教授

研究者番号：10420845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、癌細胞株が正常線維芽細胞にTGF- $\beta$ シグナルを誘導し、癌促進性ニッチの代表的間質細胞である線維芽細胞(CAFs)への分化を促進することを見出した実績がある。しかしながら、CAFsニッチ形成に寄与した癌細胞由来の因子やその癌細胞自身の特性に関しては明らかではない。申請研究では、特定の癌細胞株を使用することなく、複数の大腸癌patient-derived tumor xenograft (PDX)や癌オルガノイドを樹立し、それぞれの癌促進性CAFsを誘導する能力を比較検討し、癌細胞とCAFsの相互作用を分子レベルで解明することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌塊内にCAFsが豊富に存在すると予後不良であることが疫学的調査により報告されている。しかしながら、癌細胞の悪性度とCAFsを癌塊内にリクルートしニッチを形成する能力の相関に関して、細胞および実験動物レベルでの研究報告は乏しい。申請研究の独創性はCAFsニッチを形成する能力が癌悪性化の1つの指標であることを大腸癌PDXsや癌organoidを使用し分子レベルで明らかにすることである。

研究成果の概要(英文)：Applicants found that cancer cell lines induce TGF- $\beta$  signals in normal fibroblasts and promote their differentiation into fibroblasts (CAFs), the representative stromal cells of the cancer-promoting niche. However, the factors derived from cancer cells that contributed to the formation of the CAFs niche and the characteristics of the cancer cells themselves are not clear. In the submitted study, multiple colorectal cancer patient-derived tumor xenograft (PDX) and cancer organoids were established without using a specific cancer cell line, and their ability to induce cancer-promoting CAFs was compared and examined to compare cancers. We attempted to elucidate the interaction between cells and CAFs at the molecular level.

研究分野：癌生物学

キーワード：CAFs 大腸癌 癌organoid PDXs

### 1. 研究開始当初の背景

従来、大腸癌の予後不良のマーカーとして、K-ras, Smad4 や p53 遺伝子における変異の有無が議論されてきた。最近、大腸癌遺伝子発現プロファイルをもとに、4 種類のコンセンサス分子サブタイプ (consensus molecular subtype: CMS) が報告された (Guinney J. et al., Nature Medicine, 21, 1350-1356, 2015)。興味深いことに、これらは特定の遺伝子変異には全く依存しないサブタイプ分類であり、CMS1 はマイクロサテライト不安定化と高頻度の突然変異やマイクロサテライトの不安定化による強い免疫活性化を特徴とする。CMS2 は上皮性で、WNT と MYC シグナル伝達の顕著な活性化を特徴とする。CMS3 は上皮性で、明らかな代謝調節異常を特徴とする。CMS4 は、TGF- $\beta$  シグナルの顕著な活性化、間葉系の表現型(上皮間葉移行 epithelial mesenchymal transition: EMT)および CAFs の集積や血管形成および高浸潤・転移性を特徴とし、最も予後不良のサブタイプである。この予後不良の CMS4 サブタイプに裏付けられるように、大腸癌の進展における CAFs の意義は益々明確になってきている。しかしながら、大腸癌細胞の悪性度と CAFs ニッチ形成能力との関係は明らかではない。

以前申請者らは 1 種類ヒト乳癌細胞株と正常ヒト乳腺由来線維芽細胞を免疫不全マウスの皮下に共移植後に、癌塊より移植した正常線維芽細胞を抽出し、癌促進性の CAFs に変化していることを見出した(Kojima, Y., et al., PNAS., 107, 20009-20014, 2010)。癌細胞とマウスに移植後、癌塊内での癌細胞との相互作用により線維芽細胞は経時的に癌促進性 CAFs の表現型を獲得していた。以上の結果および上記 CMS4 サブタイプの大腸癌の特性を考慮し、申請者らは以下の仮説を想像した。

CMS4 サブタイプの大腸癌は、癌進展過程で CAFs をリクルートしニッチを形成することにより悪性化する。つまり CMS4 サブタイプの大腸癌細胞は、その悪性度を維持するために、CAFs ニッチを形成する能力が他のサブタイプの癌細胞より高い。さらに、CAFs は CMS2 や CMS3 などの他のサブタイプの大腸癌細胞を悪性度の高い間葉系の CMS4 サブタイプに変換する能力を持つかもしれない。

申請者らは、40 例の大腸癌患者より外科的に切除された大腸癌原発巣組織を高度免疫不全 NOD/Scid/IL2R $\gamma$ null (NOG)マウスに同所移植し、patient-derived tumor xenograft (PDX) model を作製した。その中に、癌塊内に $\alpha$ -SMA 陽性 CAFs をリクルートし間葉系の表現型を示す CMS4 サブタイプ様の PDX が観察された。

### 2. 研究の目的

申請者らは、癌細胞株が正常線維芽細胞に TGF- $\beta$  シグナルを誘導し、癌促進性ニッチの代表的間質細胞である線維芽細胞(CAFs) への分化を促進することを見出した実績がある。しかしながら、CAFs ニッチ形成に寄与した癌細胞由来の因子やその癌細胞自身の特性に関しては明らかではない。申請研究では、特定の癌細胞株を使用することなく、複数の大腸癌 patient-derived tumor xenograft (PDX)や癌オルガノイドを樹立し、それぞれの癌促進性 CAFs を誘導する能力を比較検討し、癌細胞と CAFs の相互作用を分子レベルで解明することを試みた。

### 3. 研究の方法

特に悪性度が高く予後不良な CMS4 サブタイプ大腸癌の根治治療は極めて困難である。予後不良の大腸癌の効果的な治療を可能にする社会実現に向けて、申請研究では、CAFs と CMS4 サブタイプの相互作用を分子レベルで解明することを目指す。このゴールに向けて、次の目標 ~ を設定して戦略的にアプローチする。申請研究では、CMS4 サブタイプ大腸癌が正常線維芽細胞の CAFs 化に優れているか否か CAFs が CMS4 サブタイプ大腸癌の分化に寄与しているのか CMS4 サブタイプ大腸癌と CAFs の相互作用を分子レベルで明らかにする。以上より、CAFs と CMS4 サブタイプの相互作用を分子レベルで解明し、それらを標的とした新たな分子標的治療法の実現化を目標とした基礎研究を実施する予定である。

課題(1) CMS4 サブタイプ大腸癌が正常線維芽細胞の CAFs 化に優れているか否か検討する。

現在 5 種類の患者より作製された、大腸癌由来 PDX マウスモデルを継代・維持している。その内 1 ~ 2 例において、間葉系マーカーである ZEB1 の発現亢進および上皮系マ

ーカ- E-cadherin の発現低下および a-SMA 陽性の CAFs の癌塊へのリクルートの亢進を示したことから、CMS4 サブタイプの癌の可能性が示唆された。

申請研究では、上記 5 種類の PDXs を collagenase で消化し、dissociate し癌細胞の cell suspension を作製する。1 X10<sup>5</sup> の癌細胞と不死化された 3 X10<sup>5</sup> の puromycin-耐性遺伝子が導入された正常ヒト大腸由来線維芽細胞を NOG マウスに皮下移植する。

1 ~ 2 か月後成長したそれぞれの群の癌塊を collagenase で消化し、dissociate し puromycin を添加した 10%FCS-DMEM 培地で培養する。数週間培養し、puromycin-耐性ヒト大腸由来線維芽細胞が増殖し confluent になったら stock する。対照群として癌細胞なしに、正常ヒト大腸由来線維芽細胞を NOG マウスに皮下移植する。1 ~ 2 か月後に線維芽細胞の白色塊をマウス皮下より採集し、同様に puromycin を添加した 10%FCS-DMEM 培地で培養する。数週間培養し、puromycin 耐性ヒト大腸由来線維芽細胞が増殖し confluent になったら stock する。

これらの puromycin-耐性ヒト大腸由来線維芽細胞において、CAFs の活性化のマーカである a-SMA, SDF-1, リン酸化 Smad2/3 の発現を immunoblot や real-time PCR で比較検討する。さらにこれらの線維芽細胞の癌促進能を調査するために、ヒト大腸癌細胞株と共に NOG マウスに皮下移植し、癌塊の増殖を比較検討する。

申請者らは、CMS4 サブタイプの大腸癌細胞が、non-CMS4 サブタイプの癌細胞と比較し、より活性化し癌促進能を有した CAFs を作り出すことつまり CAF ニッチ化に寄与していると予期している。CMS4 サブタイプの症例数を増やす必要がある場合は、生検サンプルや外科的に切除されたサンプルを使用し新たに PDX モデルを作製する。

課題 ( 2 ) CAFs が CMS4 サブタイプ大腸癌の分化に寄与しているのか調査する。

申請者は患者大腸癌より複数の a-SMA の発現を亢進した活性化線維芽細胞能を有した CAFs の抽出を予定している。non-CMS4 サブタイプの 2 ~ 3 種類の PDXs を collagenase で消化し dissociate し、NOG マウスに CAFs あるいは対照非癌部由来大腸線維芽細胞と同所移植する。成長した癌塊を dissociate し大腸癌細胞を抽出しマトリゲル状に 3 次元培養する。この条件では移植された CAFs やマウスの線維芽細胞が増殖することが困難であり、大腸癌細胞が organoid として増殖することが申請者らの予備実験にて明らかになっている。増殖した大腸癌細胞 organoid をレンチウイルス由来 GFP でラベルし、NOG マウスに同所移植する。移植後に形成された癌塊より標本を作製し、免疫組織染色や細胞抽出液を用いた Western blot 解析を施行し、TGF-β シグナルの活性化、間葉系の表現型および CAFs の集積や血管形成および高浸潤・転移性を検査する。これらの解析結果より、対照非癌部由来大腸線維芽細胞と比較して、CAFs と移植された non-CMS4 サブタイプの大腸癌細胞がより間葉系で高転移性の悪性度の強い CMS4 サブタイプに変化しているか否かを考察する。

課題 ( 3 ) CMS4 サブタイプ大腸癌と CAFs の相互作用を分子レベルで明らかにする。CMS4 サブタイプの大腸癌細胞が CAFs 化を促進した場合は、organoid 培養された CMS4 サブタイプ大腸癌細胞に 500 種類の化合物ライブラリー ( 癌支援より提供予定 ) を使用する。申請者の先行研究より、癌細胞由来の刺激により線維芽細胞に TGF-β-Smad2/3 シグナルが活性化されることが CAFs 化に重要であることがわかっている。それ故、化合物添加 24 時間後に癌細胞培養上清を回収し、96 well plate にまかれた活性化 Smad2/3 レポータープラスミドが導入された線維芽細胞に添加する。線維芽細胞における TGF-β シグナルの活性化を抑制する化合物を同定し、その標的シグナルを特定化する。以上より CAFs 化に關与する、CMS4 サブタイプの大腸癌細胞で活性化している遺伝子シグナルの同定を試みる。

また、大腸癌細胞と線維芽細胞の直接の接触が CAFs 化に重要である可能性も考慮し以下の実験も施行する。Accutase タンパク質分解酵素で処理された CMS4 サブタイプの大腸癌細胞と活性化 Smad2/3 レポータープラスミドが導入された線維芽細胞をマトリゲル上で共培養し、organoid を作製する。上記の化合物ライブラリーを使用し、organoid 中に存在する線維芽細胞のレポーター活性を IncuCyte® S3 生細胞解析システムを使用し、経時的に測定する。

#### 4. 研究成果

Informed consent が取れている大腸癌患者 40 例より手術により摘出された癌小断片を高度免疫不全 NOG マウスの皮膚に移植し PDX モデルを樹立した。28 例の癌がマウスに生着し新たなマウスに継続的に移植可能であった。28 例中 13 例の癌がマウスの直腸に移植された時に自発的に肝臓や肺に転移を発症した。これらの PDX をコラゲナーゼ処理後にマトリゲル中で 3D 培養し、8 例の癌 organoid を樹立した。ZEB1 陽性の CMS 4 サブタイプおよび ZEB 1 陰性の上皮系の organoid を樹立した。

Informed consent が取れている 6 例大腸癌患者より手術により摘出された癌部および非癌部を採取しコラゲナーゼ処理後に培養し CAFs および counterpart fibroblasts を樹立した。6 例中 5 例の CAFs で counterpart fibroblasts と比較し筋線維芽細胞マーカーである a-SMA の蛋白発現が顕著に亢進していたことより、筋線維芽細胞性の CAFs が樹立された。残りの 1 例が炎症性サイトカインの発現を亢進した炎症性 CAFs であるか否か現在検討中である。

ヒト正常大腸由来線維芽細胞を購入し、hTERT を導入し不死化ヒト正常大腸由来線維芽細胞を樹立した。hTERT の導入は PBabe-hTERT-hygro vector を挿入することにより施行された。長期間継代培養することにより vector 導入前の線維芽細胞と比較し、hTERT で不死化された線維芽細胞が不死化していることが明らかになった。

不死化ヒト正常大腸由来線維芽細胞と ZEB 1 陽性の CMS 4 サブタイプ 1 例の大腸癌 organoid が NOG マウスに移植され、現在、癌が増殖中である。今後は、他のサブタイプの大腸癌 organoid と不死化ヒト正常大腸由来線維芽細胞も NOG マウスに移植予定である。その後、増殖した大腸癌塊より移植した線維芽細胞を抽出し CAFs 化の程度（筋線維芽細胞性あるいは炎症性）と癌の CMS サブタイプ、間葉系、上皮/間葉系あるいは上皮系などの相関関係を評価する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibuya T, Nomura K, Okahara K, Haga K, Nomura O, Murakami T, Uchida S, Kodani T, Ishikawa D, Sakamoto N, Ogihara T, Osada T, Nagahara A.	4. 巻 25
2. 論文標題 Budesonide Foam for Ulcerative Colitis Patients Experiencing Inadequate Response to Biological Therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med Sci Monit.	6. 最初と最後の頁 9855-9863.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12659/MSM.918562.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibuya T, Nomura O, Nomura K, Okahara K, Haga K, Ishikawa D, Sakamoto N, Ogihara T, Osada T, Nagahara A.	4. 巻 101
2. 論文標題 Effectiveness of Cytapheresis for Ulcerative Colitis in Special Situations: Delayed Onset of Optimum Efficacy in Elderly Patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 46-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000504091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami T, Yao T, Yatagai N, Yamashiro Y, Saito T, Sakamoto N, Nagahara A.	4. 巻 76
2. 論文標題 Colorectal adenocarcinoma with enteroblastic differentiation: a clinicopathological study of five cases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 325-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.13973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami T, Akazawa Y, Yatagai N, Hiromoto T, Sasahara N, Saito T, Sakamoto N, Nagahara A, Yao T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular characterization of sessile serrated adenoma/polyps with dysplasia/carcinoma based on immunohistochemistry, next-generation sequencing, and microsatellite instability testing: a case series study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diagn Pathol.	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13000-018-0771-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiromoto T, Murakami T, Akazawa Y, Sasahara N, Saito T, Sakamoto N, Mitomi H, Nagahara A, Yao T.	4. 巻 73
2. 論文標題 Immunohistochemical and genetic characteristics of a colorectal mucin-rich variant of traditional serrated adenoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 444-453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13643.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami T, Sakamoto N, Nagahara A.	4. 巻 24
2. 論文標題 Endoscopic diagnosis of sessile serrated adenoma/polyp with and without dysplasia/carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 3250-3259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v24.i29.3250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami T, Akazawa Y, Yatagai N, Hiromoto T, Sasahara N, Saito T, Sakamoto N, Nagahara A, Yao T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular characterization of sessile serrated adenoma/polyps with dysplasia/carcinoma based on immunohistochemistry, next-generation sequencing, and microsatellite instability testing: a case series study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diagn Pathol	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-018-0771-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiromoto T, Murakami T, Akazawa Y, Sasahara N, Saito T, Sakamoto N, Mitomi H, Nagahara A, Yao T	4. 巻 73
2. 論文標題 Immunohistochemical and genetic characteristics of a colorectal mucin-rich variant of traditional serrated adenoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 444-453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	折茂 彰  (orimo akira)  (70275866)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------