

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09058

研究課題名(和文) 乳癌組織周囲における脂肪細胞の挙動の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) A study of adipocyte transformation in breast cancer tissue

研究代表者

金田 英秀 (KANEDA, Hide)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30598967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌微小環境における脂肪細胞の関与はいまだ明らかになっていない。本研究では tdTomato で脂肪細胞の運命追跡ができる遺伝子改変マウスに、マウス乳癌細胞株を移植し、移植腫瘍組織内の tdTomato (+) 細胞の形質解析を行った。移植から14日後の移植腫瘍組織内に脂肪細胞マーカー(-)で tdTomato (+) の「脂肪細胞由来線維芽細胞様細胞」が同定され、42.5%がペリサイトマーカー(+)で、35.2%が間葉系幹細胞マーカー(+)であった。以上から、乳癌微小環境において、脂肪細胞の一部がペリサイトや間葉系幹細胞の形質を獲得していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪細胞特異的レポーターマウスを用いて、脂肪細胞に由来する細胞が乳癌組織内に出現することは、これまでに報告されておらず、学術的意義の高い研究成果であると考えられる。脂肪細胞が Pericyte や間葉系幹細胞の形質を獲得するメカニズムを今後解明できれば、乳癌に対する新規治療標的を発見する糸口となる可能性があり、社会的意義の高い研究成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mature adipocytes are suggested to promote breast cancer progression. However, the contribution of mature adipocytes to breast cancer development is unclear. In the present study, we transplanted breast cancer cells into the mammary fat pad of the mature adipocyte-lineage tracing mice. Histological evaluation revealed that fibroblast-like cell derived from mature adipocyte appeared in the tumor. We termed the cell 'adipocyte-derived fibroblast like cell (AFC)'. Some AFCs were positive for pericyte markers or mesenchymal stem/stromal cell (MSC) markers in the tumor. However, endothelial cell marker-positive AFCs and carcinoma-associated fibroblast marker-positive AFCs were not detected. These results indicate that mature adipocytes can be transformed into pericytes and MSCs in breast cancer.

研究分野：基礎医学

キーワード：乳癌 脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌組織やその周囲には線維芽細胞やマクロファージなどの間質細胞が存在し、癌細胞との相互作用により癌微小環境が形成され、癌の増殖、浸潤、転移に影響を与えていることが明らかにされている。乳癌は周囲に脂肪組織が豊富に存在するため、癌微小環境の形成には脂肪細胞の関与が示唆される。しかし、生体内における乳癌組織周囲の脂肪細胞の挙動はこれまでに明らかにされていない。

(2) Bochet らは、マウスの皮下に脂肪細胞と乳癌細胞株を投与し、脂肪細胞と乳癌細胞を相互作用させることで、脂肪細胞が癌関連線維芽細胞 (Carcinoma-associated fibroblast : CAF) へと形質転換することを報告 (Bochet L, et al. Cancer Res, 2013, 73:5657-5668) し、乳癌細胞から脂肪細胞への働きかけが存在することで、脂肪細胞が CAF へと形質転換することを示唆させた。

(3) Schwitalla らや Wang らは、消化管癌が発生する過程において、消化管上皮細胞が癌幹細胞へ脱分化してから癌が進展していくこと (Schwitalla S, et al. Cell, 2013, 152(1-2):25-38) や、心筋の組織修復の過程において、心筋細胞が一度脱分化してから増殖し、再度心筋細胞へ分化すること (Wang WE, et al. Circulation, 2017, 136(9):834-848) を報告した。乳癌組織周囲には脂肪細胞が豊富に存在し、組織破壊と組織修復が絶えず繰り返されているため、乳癌組織周囲の脂肪細胞が一度脱分化し、CAF などの他の形質を持つ細胞へと変化している可能性が考えられた。

(4) 培養細胞を用いた研究では、脂肪組織と乳癌細胞の共培養により、乳癌細胞の増殖活性が促進されることが報告されていた (Almarzouqi F, et al. Eur J Med Res, 2017, 22(1):10)。しかし、動物を用いた研究では、移植された脂肪細胞と乳癌細胞の相互作用を検討した報告 (Bochet L, et al. Cancer Res, 2013, 73:5657-5668) はあるが、生体内にもともと存在する脂肪細胞の関与を証明した報告はなかった。

2. 研究の目的

(1) 乳癌の進展や増殖に対する脂肪細胞の関与をマウス生体内において明らかにし、脂肪細胞の形質変化のメカニズムを解明することは、乳癌の新たな治療標的の発見につながる糸口となる可能性がある。

(2) 「乳癌組織周囲の脂肪細胞が一度脱分化し、他の形質を有する細胞に変化する」という仮説を立てた。脂肪細胞の運命追跡ができるマウスを使用して、その仮説の現象を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生体内の脂肪細胞を運命追跡するために、脂肪細胞特異的マーカー (Adipoq) を追跡できる遺伝子改変マウス (Adipoq-Cre-ERT2 / tdTomato-ROSA26 マウス : Adipoq-Cre / tdTomato マウス) を用いた。このマウスは、エストロゲン刺激 (タモキシフェンの腹腔内投与) を加えた時点で、生体内にある脂肪細胞が Tomato (赤い色素) を発色する。この Tomato は、恒常的に発現する内在性プロモーター (ROSA26) の下流に遺伝子が位置し、一度 Tomato が発現した脂肪細胞は分化もしくは脱分化した後も、Tomato として検出することが可能である (図 1)。つまり、生体内における脂肪細胞の運命を Tomato により追跡できる、脂肪細胞特異的レポーターマウスである。

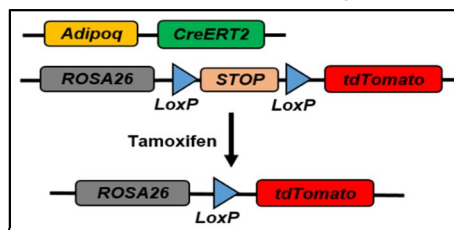


図 1 : Adipoq-Cre / tdTomato マウス

(2) エストロゲン刺激を加えた雌性の Adipoq-Cre / tdTomato マウスの乳腺周囲脂肪体にマウス乳癌細胞株 E0771 (細胞数 5×10^5 個) を投与し、乳癌細胞を移植した。14 日後に腫瘍を摘出し、脂肪細胞マーカー Perilipin A (-) で tdTomato (+) を示す細胞の同定を行うとともに、種々の抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、その形質解析を行った。

4. 研究成果

(1) 実験動物についての検討を行った。本研究では、マウス乳癌細胞を乳腺脂肪体へ移植するため、より実際に近い雌性マウスを使用することとした。しかし、Adipoq-Cre / tdTomato マウスはこれまで雄性での使用の報告はあったが、雌性の報告はなかった。そのため、雌性でも雄性同様に脂肪細胞特異的レポーターマウスとして使用可能かどうか検討した。その結果、雄性と同様に脂肪細胞特異的な tdTomato 発現を認め(図2)、雌性でも脂肪細胞特異的レポーターマウスとして使用可能であることを確認した。

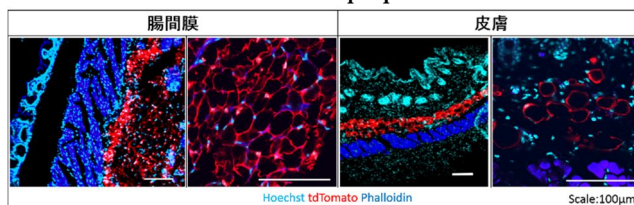


図2：Adipoq-Cre / tdTomato マウスにおける脂肪細胞特異的な tdTomato 発現

(2) マウス乳癌細胞株 E0771 (細胞数 5×10^5 個) を雌性の Adipoq-Cre / tdTomato マウスの乳腺脂肪体へ移植後 14 日で移植腫瘍(図3)を切除し、組織学的検討を行った。移植後 14 日の移植腫瘍組織内に、紡錘形の形態の tdTomato (+) 細胞を認めた。この細胞は脂肪細胞由来であるが、紡錘形で油滴を有さず脂肪細胞と異なる形態をしていた。続いて、脂肪細胞マーカーの Perilipin A で蛍光免疫染色した。その結果、Perilipin A (-) の tdTomato (+) 細胞が認められた(図4)。この細胞は脂肪細胞が形質変化した細胞であると考えられ、「脂肪細胞由来線維芽細胞様細胞 (Adipocyte-derived fibroblast-like cell : AFC)」と命名した。その後、各種抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、AFC の各種マーカーの発現解析を行った。



図3：移植腫瘍

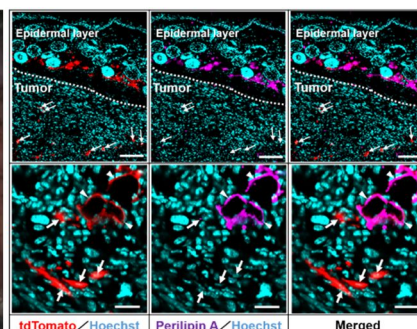


図4：腫瘍組織内の AFC

(3) Pericyte マーカーとして NG2、PDGFR β の AFC における発現状況を検討した。その結果、移植腫瘍組織内に NG2 (+) PDGFR β (+) AFC、NG2 (-) PDGFR β (+) AFC、NG2 (+) PDGFR β (-) AFC がそれぞれ確認された(図5)。続いて Pericyte マーカー (+) AFC と血管内皮細胞 (CD31 (+) 細胞) の局在を評価した。その結果、一部の NG2 (+) AFC や PDGFR β (+) AFC は、血管内皮細胞に付着するようにして突起を伸ばし典型的な Pericyte 様の形態を示した。

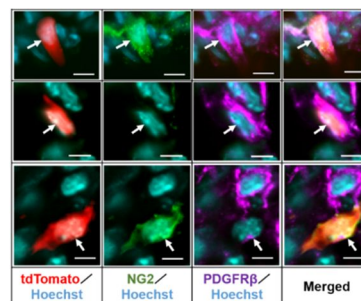


図5：Pericyte マーカー (+) AFC

(4) 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem / stromal cell : MSC) マーカーとして Sca-1、DLK1、CD26 の AFC における発現状況を検討した。その結果、移植腫瘍組織内に Sca-1 (+) DLK1 (+) または DLK1 (-) を示す AFC を認めた(図6)。一方で DLK1 (+) Sca-1 (-) を示す AFC や、CD26 (+) を示す AFC は確認されなかった。

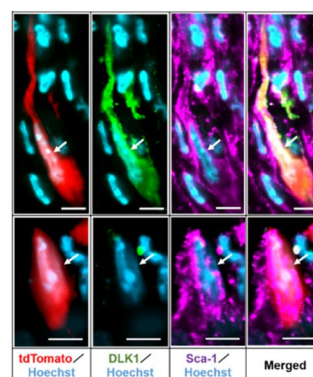


図6：MSC マーカー (+) AFC

(5) CAF マーカーとして FSP1、 α SMA の AFC における発現状況を検討した。その結果、FSP1 (+) SMA (+) を示す AFC は確認されなかった。また、血管内皮細胞マーカーとして CD31 の AFC における発現状況を検討した。その結果、CD31 (+) を示す AFC は確認されなかった。

(6) 移植腫瘍組織 3 切片中に存在する間質細胞を定量した。移植腫瘍組織内には血管内皮細胞や Pericyte といった血管構成細胞が高頻度に認められ、次に Sca-1 (+) DLK1 (+) または DLK1 (-) を示す MSC が多く認められた(図)。CAF や DLK1 (+) Sca-1 (-) を示す MSC や、CD26 (+) を示す MSC も移植腫瘍組織内に一定数認められた。

(7) 移植腫瘍組織 3 切片中における各種間質細胞に占める AFC の割合を定量した。その結果、Pericyte に占める AFC の割合は 5.9% であった。また Sca-1 (+) DLK1 (+) または DLK1 (-) を示す MSC に占める AFC の割合は 10.2% であった。一方、CAF、血管内皮細胞、DLK1 (+) Sca-1 (-) を示す MSC、CD26 (+) を示す MSC の中に AFC は全く確認されなかった。

(8) 移植腫瘍組織 15 切片中に存在する AFC に占める Pericyte、MSC の割合を定量した。その結果、AFC 中で Pericyte の割合は 42.5%であった。AFC 中で MSC の割合は 35.2%であった。移植腫瘍組織中に存在する AFC のうちその形質が明らかにならなかった割合は、22.2%であった。

(9) 以上の結果から、乳癌微小環境において、周囲の脂肪細胞が Pericyte や MSC の形質を獲得し、乳癌の進展に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土方浩平、植草省太、加藤礼保納、日高綾乃、小沼憲祥、越永従道、松本太郎
2. 発表標題 乳癌組織における脂肪細胞の形質変化に関する検討
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土方浩平、植草省太、加藤礼保納、日高綾乃、金田英秀、越永従道、松本太郎
2. 発表標題 乳癌微小環境における成熟脂肪細胞の形質変化に関する検討
3. 学会等名 第41回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土方浩平、植草省太、加藤礼保納、日高綾乃、小沼憲祥、越永従道、松本太郎
2. 発表標題 乳癌周囲における脂肪細胞の形質変化についての検討
3. 学会等名 第40回 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土方浩平、植草省太、加藤礼保納、日高綾乃、小沼憲祥、越永従道、松本太郎
2. 発表標題 乳癌組織内における脂肪細胞の形質変換についての検討
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔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	松本 太郎 (MATSUMOTO Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	櫻井 健一 (SAKURAI Kenichi) (20366602)	日本大学・医学部・研究医員 (32665)	
研究分担者	小沼 憲祥 (KONUMA Noriyoshi) (50553103)	日本大学・医学部・研究医員 (32665)	

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
---------	---------