

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09173

研究課題名(和文) 治療抵抗性癌における癌微小環境負のスパイラル機構の解明

研究課題名(英文) Negative spiral mechanism of cancer associated microenvironment i

研究代表者

白川 靖博 (Shirakawa, Yasuhiro)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60379774

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)：in vitroにて食道線維芽細胞に化学療法や放射線治療を加えmyofibroblastへの分化の有無を検証した。SMA,FAPの発現が上昇し、抗腫瘍治療によるmyofibroblastへの分化誘導が示唆された。放射線照射した線維芽細胞により癌細胞株の増殖能および放射線感受性が上昇する傾向がみられた。Invasion assay,Migration assayにて浸潤・遊走能が上昇し、特に扁平上皮癌細胞株で遊走能が有意に上昇した。治療誘導性CAFの上清をサイトカインアレイにかけ正常線維芽細胞と比較した。特にIL6に関しては種々の細胞株においても上昇を認め再現性を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、標準的治療が副次的にCAFの作用増強に繋がっている可能性が示された。現在の標準的治療の治療前に我々の開発してきたPIT治療などCAFを標的とした治療を施すことで、さらに治療効果を上乗せする革新的な癌治療の開発に繋がると予想される。既に食道癌に限らず膵癌や大腸癌など他の固形癌においてもCAFの同様な知見が多数得られており、今後多くの癌腫に対応できる大きな可能性を秘めており極めて研究意義の高いものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy and radiotherapy were applied to esophageal fibroblasts in vitro to verify the presence or absence of differentiation into myofibroblast. The expression of SMA and FAP was increased, suggesting that antitumor treatment induces differentiation into myofibroblast. Irradiated fibroblasts tended to increase the proliferative capacity and radiosensitivity of cancer cell lines. Invasion assay and migration assay increased infiltration and migration ability, especially in squamous cell carcinoma cell lines. The supernatants of treatment-induced CAFs were subjected to a cytokine array and compared with normal fibroblasts. In particular, IL6 increased in various cell lines, and reproducibility could be confirmed.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌微小環境 癌関連線維芽細胞 化学療法 放射線療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の分子細胞生化学の発展により、分子標的治療薬によって飛躍的に予後改善を認める癌腫も出てきている。しかしながら治療抵抗性を示す癌の中には抗癌剤や放射線治療など標準的治療を契機に、より悪性化し周辺へ浸潤や転移を引き起こすとされる。そのような癌の治療抵抗性や悪性化の本態となる癌幹細胞ニッチ形成や EMT を促す作用として、“がん微小環境”の関与が示唆されている。我々は以前より癌治療において“がん微小環境”への併用療法の可能性に着目し、特にその中心的な役割を果たしているとされる CAFs の癌に対する機能解析や分子標的となり得るシグナルの解析を行って来た。実際、食道癌において CAFs がリンパ節転移を促していることや腫瘍内の TILs を制御し腫瘍免疫抑制作用を有することを発見した。さらに CAFs が癌細胞の標準治療への治療抵抗性を促し、またそのことは CAFs の存在に依存し可逆性があることを確認した。

一方、食道癌治療の実臨床においては1次治療後に治療抵抗性を示す癌腫は一旦縮小を示すものの強い硬化を呈し、局所浸潤や遠隔転移を来たしやすい性質を持つことが知られている。特に強い線維化を起こす CAFs の関与が予測され、標準的な治療により線維芽細胞の CAFs 化が進んでいる可能性が示唆された(負のスパイラル)。我々はこれまでに、CAFs の機能解析を進めると同時に CAFs 自体を制御すべく CAFs 細胞を標的とした新規治療法の開発を進めてきた。また、NIH 小林久隆らと協力し CAFs 特異的な表面抗原である FAP (Fibroblast Activation Protein)を標的に Photoimmunotherapy(PIT)を開発した。これまでに *in vitro*、*in vivo* にて CAFs を制御し癌の増殖や CAFs による癌細胞の治療抵抗性獲得を阻害することに成功し、PIT-CAFs と従来の抗癌剤投与の併用療法の有効性を確認した。

以上を踏まえ我々は、“がん微小環境”つまり CAFs を標準治療前に制御することができれば奏効率や治癒率をさらに改善させるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究により、標準的治療が副次的に CAFs の作用増強に繋がっている可能性が示される。現在の標準的治療の治療前に我々の開発してきた PIT 治療など CAFs を標的とした治療を施すことで、さらに治療効果を上乗せする革新的な癌治療に繋がると予想される。既に食道癌に限らず膵癌や大腸癌など他の固形癌においても CAFs の同様な知見が多数得られており、今後多くの癌腫に対応できる大きな可能性を秘めており極めて研究意義の高いものと考えている。

### 3. 研究の方法

#### 【研究の検討項目の要約】

岡山大学にて根治切除された食道癌患者の切除標本を用いて化学療法および放射線化学療法後の CAFs 発現を臨床病理学的に解析する。続いて正常線維芽細胞を用いて標準治療である化学療法や放射線治療による CAFs 化を定量化する。また CAFs 化した線維芽細胞がどのように癌細胞に貢献するのか *in vitro* にて検討する。*in vivo* では CAFs 化した線維芽細胞と正常線維芽細胞また癌細胞単独での腫瘍増殖や転移の検討を行う。最終段階では PIT を用いて *in vitro* での上乗せ効果を検討し、*in vivo* では CAFs に対する PIT を用いて CAFs を標的とした前治療の標準的治療への上乗せ効果を検討する。

#### **P-1 食道癌切除標本を用いたCAFの臨床病理学的検討 (IHC)**

術前化学療法やサルベージなど治療後の切除標本（年間40例×予後解析が可能である5年間程度）を用いてCAFの免疫染色を行い臨床病理学的な検討を行う。

#### **P-2 化学・放射線療法による線維芽細胞活性化(CAFs化)の検討 (in vitro)**

食道癌標準治療である化学療法（CT: DXT, CDDP, 5FU）や放射線療法にて正常線維芽細胞に刺激しCAFのマーカーであるSMAやFAPなどの上昇、即ち活性化を検討する。FACSやWBまた免疫染色にて確認する。

#### **P-3 化学・放射線療法誘導性CAFの癌への機能性の検討 (in vitro)**

CTやRTで活性化したCAFが癌細胞にどのように作用するのか検討する。検討項目は、CAFの上清で癌細胞を刺激し治療抵抗性や浸潤転移能、そしてそれにはどのサイトカインが関与しているのかmulti-cytokine assayを用いて検討する。

#### **P-4 化学・放射線療法誘導性CAFの癌への機能性の検討 (in vivo)**

同所性移植<sup>2</sup>や皮下移植マウスモデルを用いて治療誘導性CAFの癌細胞への機能性を検証する。すでに食道癌同所性移植モデルを確立しており同手技にて行い、治療誘導性CAF群、正常線維芽細胞群等にて検証する。治療誘導は各種CTまたRTを検討する。

#### **P-5 治療誘導性CAFに対するPITの検討および総括**

当科で確立したCAF-PIT治療を用いて、治療誘導性CAFに対するPIT治療の有効性を確認する。まずin vitroで確認し、P-4で行なったモデルにPITを導入する。まとめとして各実験結果の総合的検討および総括や論文発表を行う。

### 4. 研究成果

・食道癌患者の切除標本を用いて化学療法および放射線化学療法後の Cancer associated fibroblasts : CAFs 発現を臨床病理学的に解析した。

・正常線維芽細胞に機械的ストレスを加えて分化させると、myofibroblast と呼ばれる活性化形態となり、その振る舞いはCAFに酷似していることが知られている。in vitroにおいて正常食道線維芽細胞に食道癌に対する標準治療である化学療法や放射線治療といったストレスを加えることにより、myofibroblast への分化の有無を調べた。

・どのように癌細胞に貢献するのかを検討するため、in vivo では CAFs 化した線維芽細胞 (myofibroblast) あるいは正常線維芽細胞の上清刺激した癌細胞、さらに癌細胞単独での腫瘍増殖や転移の検討を in vitro および in vivo にて行った。

・治療誘導性の CAFs (myofibroblast) に対して当科で確立した PIT-CAF が有効に機能するか in vitro、in vivo にて検証した。

・ヒト正常線維芽細胞株をシスプラチン、5-FU、または放射線で刺激し、myofibroblast のマーカーである SMA および FAP の発現を評価したところ、ともに発現が上昇しており抗腫瘍治療による myofibroblast への分化誘導が示唆された。

・放射線照射した線維芽細胞によって癌細胞株の増殖能および放射線感受性が上昇する傾向がみられた。また Invasion assay および Migration assay においても浸潤および遊走能が上昇し

ており、特に扁平上皮癌細胞株では遊走能が有意に上昇していた。

- ・ルシフェラーゼ発現食道癌細胞株と放射線照射された食道線維芽細胞株をヌードマウス腹腔内に注入し播種結節の形成を評価したところ、播種結節がより大きく、結節数も多い傾向があった。

- ・治療誘導性 CAFs の上清をサイトカインアレイにかけ、正常状態の線維芽細胞と比較した。CXCL1、IL6、MCP-1 などの上昇を認め、その中の IL6 に関しては、FEF3、NHLF、W138 といずれの細胞株においても上昇を認め再現性を確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河本 慧
2. 発表標題 化学放射線療法は線維芽細胞の活性化を介して食道癌細胞の悪性度を向上させる
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河本 慧
2. 発表標題 化学放射線療法は線維芽細胞の活性化を介して食道癌細胞の悪性度を向上させる
3. 学会等名 日本バイオセラピー学会
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	野間 和広  (Noma Kazuhiro)  (10534761)	岡山大学・大学病院・講師    (15301)	

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