

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17683

研究課題名（和文）肺癌関連線維芽細胞の制御因子の解明から標的治療への展開

研究課題名（英文）Detection of key modulators of lung cancer associated fibroblast for targeted therapies

研究代表者

難波 由喜子（Namba, Yukiko）

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号：90782243

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）：腫瘍関連線維芽細胞(CAF)とがん細胞が互いに連携することでがん間質にがん細胞を取り込み、積極的にがんの進展を促進させるという、非小細胞肺癌におけるCAFの活性化機序を解明した。インテグリン 11 +/コラーゲンタイプXI 1 + CAFを標的とした新たな治療法が、がんの進展をより効果的に抑制する可能性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではインテグリン 11 +/コラーゲンタイプXI 1 + CAFの活性化が肺がんの進展に特に重要な役割を担っている可能性を明らかにした。本研究成果は、CAF を標的とした分子標的治療法の基盤形成をなす研究である。将来的に肺癌患者の实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。今後さらに研究を重ねることで、CAFの機能解明に関する研究は 肺がん死亡者数の減少を導くブレークスルーとなりうることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the functional regulation and cancer progression mechanism mediated by ECM which is produced by CAF by comparing them to normal lung fibroblasts isolated from same patients. When comparing the migration ability of normal lung fibroblasts and CAFs isolated from the same patient, the migration ability mediated by CAF-produced fibronectin and Type I Collagen was high in CAFs. CAGE analysis revealed the expression of ITGA11 and COL11A1 were high in CAFs. Also as a result of Western blotting, we found that both expression were high in CAFs at the protein level. Furthermore, conditioned media from A549 cultures significantly stimulated ITGA11 expression and harvested media from CAFs significantly stimulated migration of A549 compared to that of normal fibroblasts. This suggests that ITGA11 in the cancer stroma is a factor that contributes to the progression of cancer by regulating migration ability, and might be a new therapeutic target focused on the cancer stroma.

研究分野：呼吸器全般

キーワード：腫瘍関連線維芽細胞 ITGA11 COL11A1 非小細胞肺癌 TGF 1

1. 研究開始当初の背景

近年、非小細胞肺癌の分子標的治療が奏効率を改善させたが、ほぼ全例に治療耐性を生じて再発するため、依然として日本における癌死の第一位である予後の悪い癌種である。より効果的な治療法の解明が必務である。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は、近接する癌間質によって規定されている。癌細胞は癌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、癌組織内間質領域の理解なしに癌細胞の制御は不可能と考えられる。近年、癌間質線維芽細胞の病理形態像の検討より、癌間質量や線維芽細胞増殖の高さが患者予後と強く相関し、癌間質線維芽細胞の存在様式は、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。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、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。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。抗 VEGF 抗体(ベバシズマブ)は、直接癌細胞を標的とするものではなく腫瘍環境を構成する癌間質内に豊富に存在する腫瘍血管の分子生物学的特性を選択的に修飾させ殺細胞性抗癌剤との併用で非小細胞肺癌の治療成績を飛躍的に向上させた。この事実は、紛れもなく肺癌治療の上でも癌間質を制御する事の重要性を示している。

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。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期待されている。

2. 研究の目的

従来の殺細胞性の非小細胞肺癌の抗癌剤の奏効率が 30% と乏しいのは癌細胞のみならず癌間質を含めた肺癌組織全体の癌進展制御及び薬剤感受性の多様性があるためと考えられる。癌間質量や癌間質内の線維芽細胞の増殖能の高さが予後と強く相関し、癌間質線維芽細胞の存在様式と癌悪性度の密接な関連性が報告され癌間質の制御の重要性が指摘され始めている。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: Cancer-associated fibroblast) と称され、癌治療の新たな標的として注目を集めているが肺癌における CAF の解明は不十分である。本研究の目的は、肺癌組織中の CAF の生物学的特性を解明し、CAF 特異的マーカーを標的とした新たな肺癌治療法を新しい領域からアプローチすることを本研究の主目的とする。

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。肺線維芽細胞のフィブロネクチンに対する遊走能を 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、癌進展及び転移に関与する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関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関わるメカニズムを究明した。CAFを介する線維化制御Geneの網羅的探索のため、肺の線維化に重要な役割を担う線維芽細胞における1)遺伝子レベル2)転写プロモーター活性レベルの網羅的プロファイリング解析を行い、肺線維芽細胞の線維化に関わる生理機能活性制御因子の探索を行った。1)では肺線維芽細胞の生理機能活性を強力に促進させるTGF- β 1刺激、肺線維化リモデリングに作用するLPA刺激を正常線維芽細胞に行い、非刺激下と比較して変動するGeneを線維化にかかわ

る制御候補因子としてマイクロアレイを用いて探索した。2)では、正常肺線維芽細胞/CAFの両群間の転写プロモーター活性の表現型解析としてCAGEを導入した。正常肺線維芽細胞と比較してCAFにおいて変動する転写活性制御GeneをCAFを介するがん進展機序にかかわる制御候補因子として探索した。

4. 研究成果

CAFは、周囲のがん細胞と相互に影響を及ぼしあう環境下において活性化し、がん細胞の進展を促進させていく。本研究ではまず、がん間質中に集まるCAFの生理機能活性の中で遊走能の機能制御について着目した。CAFの遊走能を検討した結果、がん間質から分離したCAFは、正常肺から分離した正常肺線維芽細胞と比較して、がん間質中の主要な構成たんぱく質であるI型コラーゲンやフィブロネクチンに向かう遊走能が活性化していることを発見した。このCAFに特異的な遊走能の活性化に関与している機能制御因子を探るため、CAGE法による転写プロモーター活性の網羅的解析を行った。その結果、下記7点の新しい知見が得られた。

- (1) I型コラーゲンの受容体であるインテグリン 11がCAFで高活性であった。
- (2) たんぱく質の発現レベルにおいてCAFでインテグリン 11の発現が増加していた(図1)。

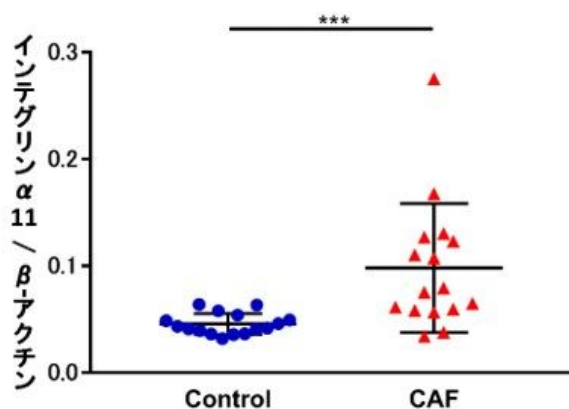


図1：がん関連線維芽細胞のインテグリン 11の発現

- (3) 正常線維芽細胞(Control)と比較してCAFでインテグリン 11のたんぱくレベルでの発現が増加していた。
- (4) CAFを含むがん間質組織中のインテグリン 11の発現が高いほど術後再発を起こしやすく、進行病期によってその発現量が増加することから、インテグリン 11の発現と予後の悪化との相関性を認めた。

- (5) がん間質内のインテグリン $\alpha 11$ の発現は、CAF の特異的マーカーとして報告されているコラーゲンタイプ XI $\alpha 1$ の発現と相関がみられ、CAGE 法解析やたんぱく質の発現レベルにおいても、CAF でコラーゲンタイプ XI $\alpha 1$ の転写活性や発現が上昇していた。
- (6) 線維化を強力に促進させるサイトカインの TGF- $\beta 1$ は CAF の遊走能を刺激するだけではなく、インテグリン $\alpha 11$ とコラーゲンタイプ XI $\alpha 1$ の発現を増加させた。
- (7) 正常肺線維芽細胞の培養上清液と比較して CAF の培養上清液は肺がん細胞の遊走強力に刺激させた。

以上の結果から、CAF とがん細胞が互いに連携することでがん間質にがん細胞を取り込み、積極的にがんの進展を促進させるという、非小細胞肺癌における CAF の活性化機序が解明した (図 2)。この結果から、インテグリン $\alpha 11$ + コラーゲンタイプ XI $\alpha 1$ + CAF を標的とした新たな治療法が、がんの進展をより効果的に抑制する可能性が示された。

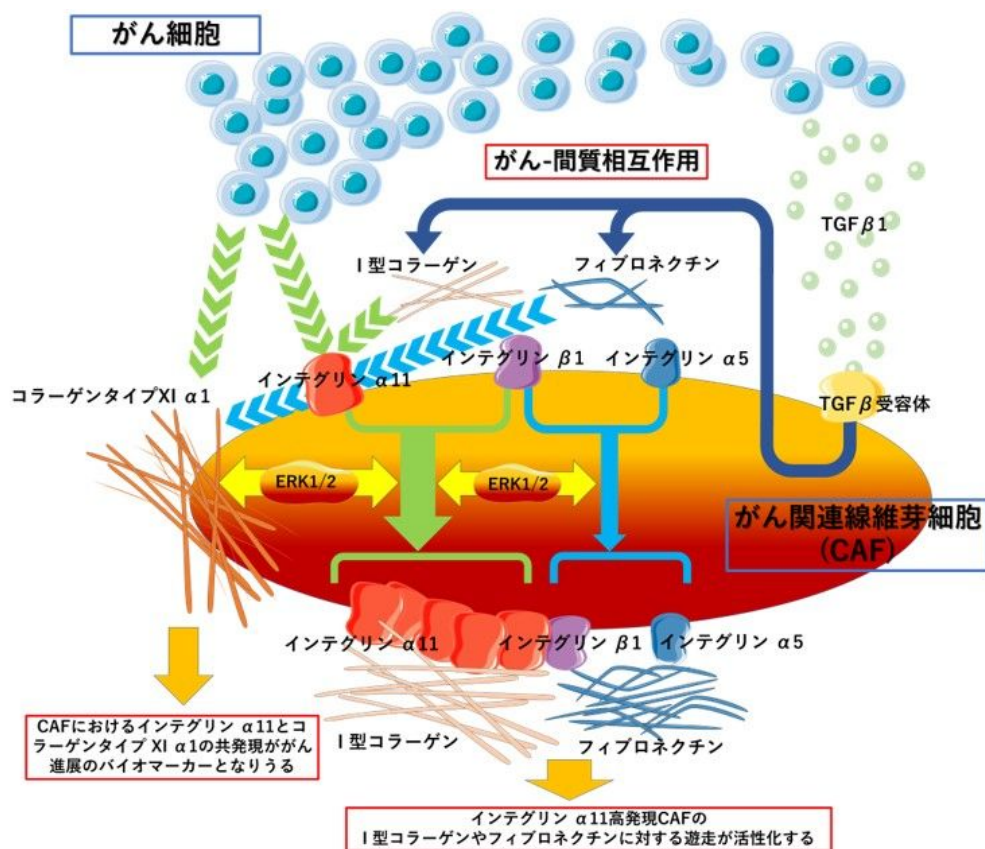


図 2 : 本研究で明らかになったがん関連線維芽細胞 (CAF) の活性化機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Iwai Moe, Tulafu Miniwan, Togo Shinsaku, Kawaji Hideya, Kadoya Kotaro, Namba Yukiko, Jin Jin, Watanabe Junko, Okabe Takahiro, Hidayat Moulid, Sumiyoshi Issei, Itoh Masayoshi, Koyama Yu, Ito Yasuhiko, Orimo Akira, Takamochi Kazuya, Oh Shiaki, Suzuki Kenji, Hayashizaki Yoshihide, Yoshida Koji, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer associated fibroblast migration in non small cell lung cancers is modulated by increased integrin 11 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanjo Yuta, Okuma Tomoko, Kuroda Yumi, Hayakawa Eri, Shibayama Kohei, Akimoto Takashi, Murashima Ryoko, Kanamori Koichiro, Tsutsumi Takeo, Suzuki Yohei, Namba Yukiko, Makino Fumihiko, Nagashima Osamu, Sasaki Shinichi, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 61
2. 論文標題 Multiple Types of Taste Disorders among Patients with COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2127 ~ 2134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9065-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mimori Tomoyasu, Shukuya Takehito, Ko Ryo, Okuma Yusuke, Koizumi Tomonobu, Imai Hisao, Takiguchi Yuichi, Miyauchi Eisaku, Kagamu Hiroshi, Sugiyama Tomohide, Azuma Keisuke, Namba Yukiko, Yamasaki Masahiro, Tanaka Hisashi, Takashima Yuta, Soda Sayo, Ishimoto Osamu, Koyama Nobuyuki, Kobayashi Kunihiro, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical Significance of Tumor Markers for Advanced Thymic Carcinoma: A Retrospective Analysis from the NEJ023 Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 331 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14020331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Enomoto Yutaka, Namba Yukiko, Hoshika Yoshihito, Komemushi Yoshimitsu, Mitani Keiko, Kume Haruki, Kobayashi Etsuko, Miyama Yu, Homma Yukio, Ushiku Tetsuo, Seyama Kuniaki	4. 巻 63
2. 論文標題 A case of Birt-Hogg-Dub? syndrome implying reduced or no wild-type folliculin without mutated protein is pathogenic	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 103820 ~ 103820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmg.2019.103820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jin Jin, Togo Shinsaku, Kadoya Kotaro, Tulafu Miniwan, Namba Yukiko, Iwai Moe, Watanabe Junko, Nagahama Kumi, Okabe Takahiro, Hidayat Moulid, Kodama Yuzo, Kitamura Hideya, Ogura Takashi, Kitamura Norikazu, Ikeo Kazuho, Sasaki Shinichi, Tominaga Shigeru, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 20
2. 論文標題 Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1093-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kotaro Kadoya, Shinsaku Togo, Miniwan Tulafu, Yukiko Namba, Moe Iwai, Junko Watanabe, Takahiro Okabe, Jin Jin, Yuzo Kodama, Hideya Kitamura, Takashi Ogura, Norikazu Kitamura, Kazuho Ikeo, Tadayuki Takeda, Naoto Kondo, Kazuhisa Takahashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Specific Features of Fibrotic Lung Fibroblasts Highly Sensitive to Fibrotic Processes Mediated via TGF- β 1/ERK5 Interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 822 ~ 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33594/000000057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Moe Iwai, Shinsaku Togo, Hideya Kawaji, Miniwan Tulafu, Kotaro Kadoya, Yukiko Namba, Jin Jin, Junko Watanabe, Takahiro Okabe, Moulid Hidayat, Issei Sumiyoshi, Masayoshi Itoh, Yu Koyama, Yasuhiko Ito, Akira Orimo, Kazuya Takamochi, Shiaki Oh, Kenji Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, Koji Yoshida, Kazuhisa Takahashi.
2. 発表標題 Phenotypic alteration of cancer-associated fibroblast-induced integrin α 11-mediated migration toward fibronectin
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井萌, 十合晋作, 川路英哉, 伊藤昌可, Miniwan Tulafu, 渡邊純子, 門屋講太郎, 難波由喜子, 鈴木健司, 折茂 彰, 吉田浩二, 林崎良英, 高橋和久
2. 発表標題 ITGA11-fibronectinカスケードを介する癌関連肺線維芽細胞の遊走能の解析
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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