

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17783

研究課題名（和文）悪性黒色腫由来の癌関連線維芽細胞が癌リンパ管新生に及ぼす影響とその阻害薬の開発

研究課題名（英文）Effect of cancer-associated fibroblasts on lymphangiogenesis in malignant melanoma

研究代表者

前田 周作（Maeda, Shusaku）

大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：30817789

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）：悪性黒色腫の切除標本から癌関連線維芽細胞を樹立し、癌関連線維芽細胞の培養上清を用いてリンパ管内皮細胞の増殖能の評価を行った。癌関連線維芽細胞由来の細胞上清をリンパ管内皮細胞に添加することによりリンパ管内皮細胞の増殖およびリンパ管新生が促進したが、培養上清から抽出したエクソソームをリンパ管内皮細胞に添加すると増殖が抑制され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

悪性黒色腫は非常に悪性度の高い皮膚悪性腫瘍で、高率にリンパ節転移を来す。転移の機序には癌微小環境における癌関連線維芽細胞が関与していると言われており、本研究では癌関連線維芽細胞によるリンパ管内皮細胞への影響を調査した。近年エクソソームが転移に関与している可能性が示唆されており、癌関連線維芽細胞の培養上清から抽出したエクソソームを添加したリンパ管内皮細胞の増殖能を評価した。培養上清を添加した場合、増殖は促進したが、エクソソームを添加した場合は増殖が抑制することが示唆される結果となった。エクソソーム内に含まれる増殖を抑制する物質が同定されれば、腫瘍の進展を抑制する薬剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Cancer-associated fibroblasts were established from the resection specimen of malignant melanoma, and the growth ability of human lymphatic endothelial cells was evaluated using culture supernatant of cancer-associated fibroblasts. The addition of conditioned medium from cancer-related fibroblasts to lymphatic endothelial cells promoted proliferation of lymphatic endothelial cells and lymphangiogenesis, but it was suggested that proliferation of lymphatic endothelial cells with exosomes extracted from the conditioned medium would be suppressed.

研究分野：形成外科学

キーワード：悪性黒色腫 癌関連線維芽細胞 エクソソーム リンパ管新生 リンパ管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚悪性黒色腫はメラノサイトが悪性化した皮膚癌である。発生頻度については人種差があり、欧米と比較して本邦では10万人に1-2人と比較的稀であるが、悪性度が高くリンパ節転移、遠隔転移を来しやすい。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の発展により生存率の改善が見られるが、より有効性の高い新規治療薬の開発が望まれる。

以前より悪性黒色腫において発現する蛋白についての網羅的研究が行われているが、癌細胞を取り巻く腫瘍微小環境に着目した報告は少ない。胃癌や大腸癌など多くの癌腫において腫瘍微小環境、特に線維芽細胞が癌細胞の浸潤、転移に影響を与えることが報告されている。悪性黒色腫についても同様に腫瘍微小環境が進展に影響を与えている可能性が考えられる。微小環境内の線維芽細胞、いわゆる癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAF) について癌周囲のリンパ管密度を増加させることが報告されており、リンパ管密度の増加がリンパ節転移の進展に関与している。

また、近年、微小環境内での細胞間シグナル伝達ツールとして細胞から放出されるエクソソームが注目されている。癌細胞とCAFをはじめとする周辺の細胞との相互作用において、エクソソームおよびその中に含まれる miRNA が重要な役割を果たしていることが示唆されている。これらの物質が微小環境の構築に関与し、癌細胞の浸潤、転移を促進させる可能性がある。このメカニズムを解明し、エクソソーム、miRNA をターゲットとした新規治療薬を開発することにより、癌の浸潤、転移を抑制し生存率の向上が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では悪性黒色腫の腫瘍微小環境、CAFに着目した。CAFがリンパ節転移に関与しているその機序の解明を目的としている。CAFによるリンパ管内皮細胞への影響を調査するため、CAFが放出するエクソソームを抽出し、エクソソームを添加したリンパ管内皮細胞の増殖能を評価した。リンパ管内皮細胞に影響を与えるエクソソーム内のサイトカイン、miRNAの同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 癌関連線維芽細胞の樹立

大阪公立大学医学部附属病院形成外科、皮膚科において悪性黒色腫を含む皮膚悪性腫瘍に対する治療目的に受診した患者のうち、本研究へのインフォームドコンセントを得て、切除した病変よりCAFの樹立を行った。切除標本から組織を一部採取して細かく粉砕し、DMEM内で培養を行うことで樹立可能であった。樹立したCAFは凍結保存した。CAFはシャーレで培養を行い、semi-confluentとなった時点で培地を無血清培地へ変更し72時間培養を行った後に培地を回収してCAF培養上清として続く実験に使用した。

悪性黒色腫の腫瘍組織から CAF を樹立した症例において、皮弁や植皮など移植組織の一部を余剰正常組織として採取可能な場合は、正常組織から線維芽細胞を樹立した。樹立した正常線維芽細胞を normal tissue associated fibroblast (以下 NAF) として、CAF とペアで assay に用いた。

(2) エクソソームの単離と特性評価

エクソソームは以下の方法によって細胞上清から得た。10%FCS を含む DMEM で CAF を semi-confluent まで増殖させた後、細胞をリン酸緩衝液 (PBS、Wako) で洗浄し、10 ml の無血清 DMEM でさらに 48 時間インキュベートした。上清を収集し 2000g で 10 分間遠心分離して細胞残渣を除去した。続いて、上清を 0.8 μ m 孔フィルター (Millipore, Billerica, MA, USA) を使用して濾過した。収集した濾液を 1×10^5 g で 1.5 時間、4°C で超遠心分離した。エクソソームを含むペレットを 25 ml の PBS で洗浄し、続いて 1×10^5 g で 1.5 時間、4°C で超遠心分離した。上清を捨て、ペレットを -80 °C で保存した。エクソソームの形態学的特徴は、透過型電子顕微鏡 (HT7700、HITACHI、東京、日本) で観察した。エクソソームの定量は、Micro BCATM Protein Assay Kit ((Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。

(3) CAF によるリンパ管内皮細胞への影響の評価

悪性黒色腫細胞については、当教室保有のヒト皮膚悪性黒色腫細胞株 (MMAc、COLO679、A375) を使用した。CAF 培養上清を添加した条件下で、リンパ管内皮細胞が受ける影響を細胞増殖能により評価した。リンパ管内皮細胞は Promocell® よりヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (成人) を購入して用いた。

細胞増殖能については、リンパ管内皮細胞を CAF、NAF 培養上清添加または CAF 由来エクソソーム添加群と対照群を 72 時間培養し、MTT assay を行った。リンパ管内皮細胞に 50% の CAF 培養上清およびエクソソームを添加してインキュベーターで培養し、24 時間毎に CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega) を添加して処理した後、モデル 550 マイクロプレートリーダー (Bio-rad) により 570nm の吸光度を測定した。

(4) リンパ管内皮細胞増殖に関連するサイトカインの検索

リンパ管内皮細胞に関連するサイトカインについては、Proteome Profiler™ (R&D SYSTEM®) を用いて cytokine array を行い、CAF 上清中に含まれる物質について網羅的に検索した。候補と考えられる物質において、その物質をリンパ管内皮細胞に添加して培養し実際に増殖効果が認められるかどうかを確認した。

4. 研究成果

CAF と NAF をペアで樹立可能な悪性黒色腫症例は 2 例あった。

- ・症例 1 : 肩部皮膚原発、Stage IIc
- ・症例 2 : 踵部皮膚原発、Stage IIa

上記 2 例の CAF、NAF の培養上清を採取し、CAF の培養上清から更にエクソソームを抽出して用いた。MTT assay による結果を図 1-4 に示す。

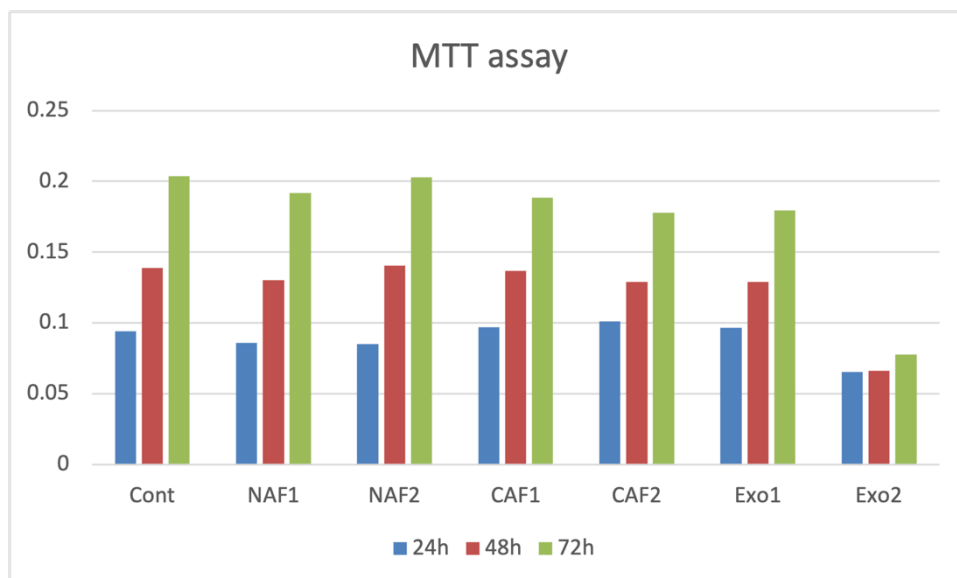


図1 MTT assay

経時的に細胞増殖を認めたが、症例2のエクソソーム添加群は増殖が乏しい

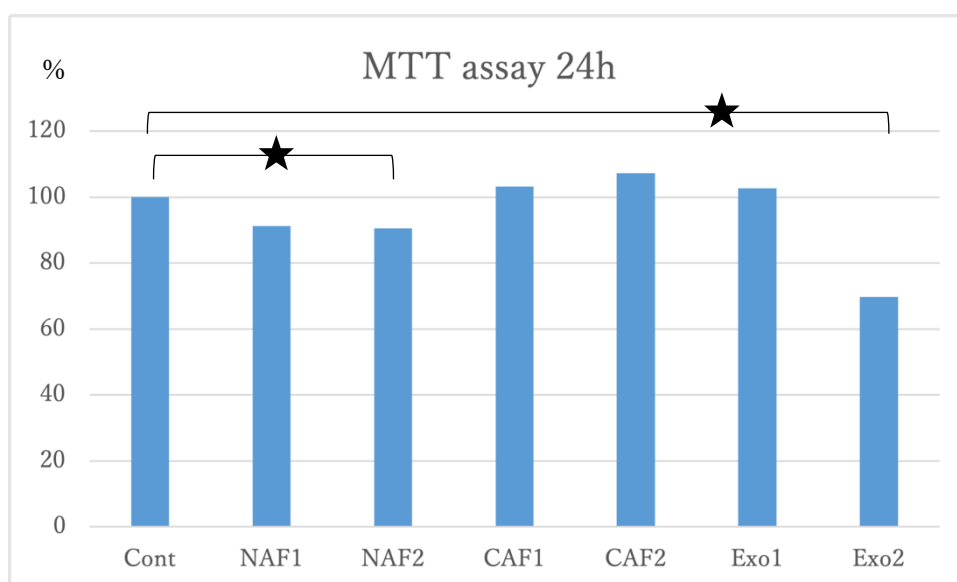


図2 MTT assay 24時間、★ : $p < 0.05$

症例2から採取したエクソソームを添加した群は対照群と比較して有意に増殖能の低下を認めた

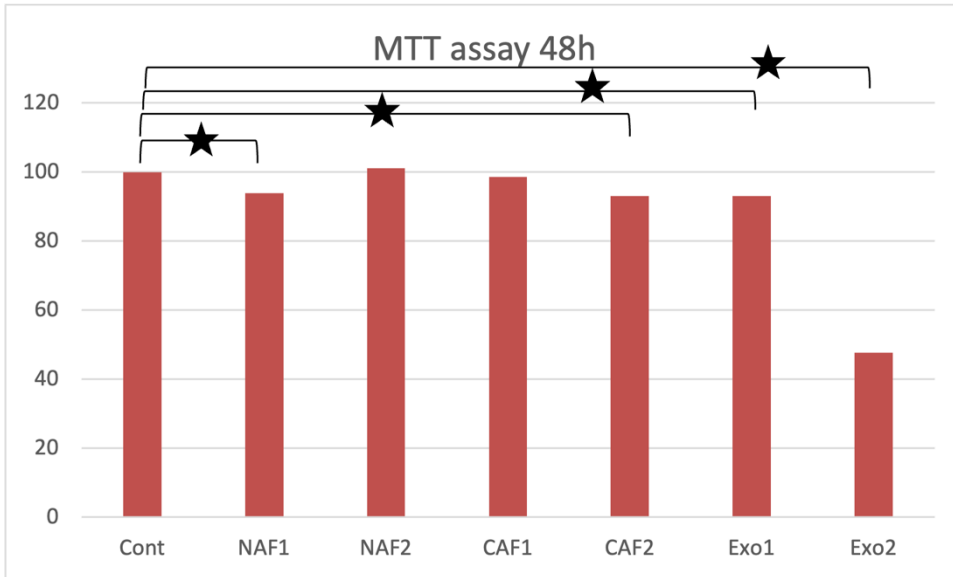


図3 MTT assay 48 時間、★ : p<0.05

24 時間時点と同様に症例 2 のエクソソーム添加群で細胞数は有意に減少していた

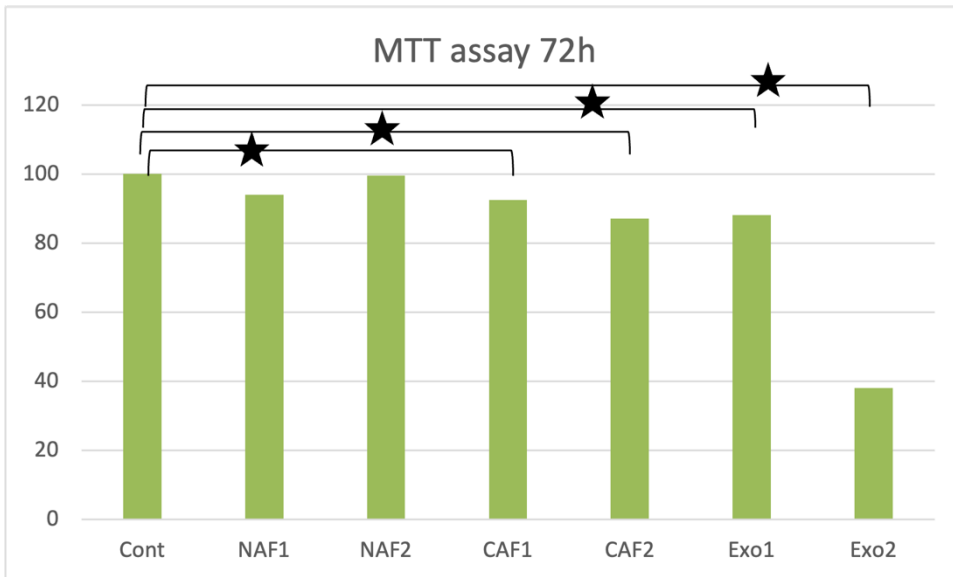


図4 MTT assay 72 時間、★ : p<0.05

24、48 時間時点と同様の傾向であるが、症例 2 だけでなく症例 1 のエクソソーム添加群も有意に減少している

上記より、エクソソーム添加によりリンパ管内皮細胞の増殖が抑制されることが示唆された。当施設での先行研究では、CAF 由来のエクソソームを悪性黒色腫の腫瘍細胞に添加した場合、癌細胞の増殖抑制が見られたことを報告している¹⁾。同様の機序でリンパ管内皮細胞の増殖が抑制される可能性がある。

引き続き、リンパ管内皮細胞の増殖抑制効果のあるエクソソーム内のサイトカインや miRNA の同定を試み、新規治療薬の開発へつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shusaku Maeda, Masakazu Yashiro, Hisashi Motomura, Takaharu Hatano, Heishiro Fujikawa
2. 発表標題 Cancer-associated fibroblasts under the influence of melanoma cells might stimulate the lymphatic vessel formation
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2020 (online) (国際学会)
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
---------	---------