

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03467

研究課題名（和文）がんの線維化におけるMeflinの機能解析と新規治療法の開発研究

研究課題名（英文）Functional Analysis of Meflin in Cancer Fibrosis and Research for Development of Novel Therapy

研究代表者

高橋 雅英（Takahashi, Masahide）

藤田医科大学・その他部局等・教授

研究者番号：40183446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、膵がん、大腸がん、非小細胞肺癌、泌尿器がんの間質に存在するがん関連線維芽細胞（CAF）におけるMeflin発現とがんの予後、治療効果との関連について解析した。その結果、いずれのがん腫においてもMeflinの陽性率の高い群では予後が有意に高く、膵がんでは化学療法の奏効率、非小細胞肺癌、泌尿器がんではIC阻害剤の奏効率が高まることが判明した。また、合成非天然型レチノイドであるAm80が、CAFにおけるMeflinの発現を効果的に誘導することができる試薬であることを明らかにし、Am80と化学療法あるいはIC阻害剤の組み合わせが、新たながん治療法の開発につながることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん線維化に関わる線維芽細胞の分化と機能におけるMeflinの関与について研究を進め、どのような機序でがんの悪性化を制御しているかを解析した。膵がん、大腸がん、肺癌、泌尿器がんにおける腫瘍内線維芽細胞におけるMeflinの発現と予後との関連、免疫関連細胞の浸潤、化学療法および免疫チェックポイント（IC）阻害剤の効果との関連の解析を行い、Meflin高発現群では患者の予後が有意に良く、治療効果も高いことが判明した。さらに、線維芽細胞におけるMeflinの発現を増強する低分子化合物Am80を同定し、化学療法あるいはIC阻害剤との併用による新たながん治療法開発に資する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the relationship between Meflin expression in cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the stroma of pancreatic, colorectal, non-small cell lung, and urologic cancers and cancer prognosis and treatment response. The results showed that the prognosis was significantly higher in the group with higher Meflin positivity in all carcinomas, and that the response rate to chemotherapy was higher in pancreatic cancer, and to IC inhibitors in non-small cell lung cancer and urologic cancer. In addition, Am80, a synthetic non-natural retinoid, was found to be a reagent that can effectively induce Meflin expression in CAFs, indicating that the combination of Am80 and chemotherapy or IC inhibitors can lead to the development of new cancer therapies.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん関連線維芽細胞 Meflin 膵がん 大腸がん 非小細胞肺癌 泌尿器がん AM80 免疫チェックポイント阻害剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんは進行過程においてその周囲の線維化がしばしば観察され、これにはがん間質に出現するがん関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast: CAF) が重要な役割を果たしている。CAF は腫瘍血管、免疫細胞などとともにがん微小環境を形成し、さまざまな液性因子や細胞外基質を分泌し、がんの進展に関わると考えられている。特に膵がんは高度な線維化が特徴であり、膵がんの予後の悪さ (5 年生存率が約 9%) と関連していることはよく知られている。

がん組織の線維化は CAF が病変局所に遊走し、平滑筋型ミオシン (α SMA) 陽性線維芽細胞 (筋線維芽細胞と呼ばれる) になり、コラーゲンなど過剰な細胞外基質を産生することにより生じる。線維化に関わる線維芽細胞には多様な起源が明らかになっている。局所の線維芽細胞の活性化・増殖、上皮からの移行 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、骨髄由来の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC)、MSC と同系統とされる perivascular fibroblast、肝臓の伊東細胞、膵臓の星細胞などがあげられる。線維化を誘導する線維芽細胞の活性化には TGF- β シグナルが重要な役割を果たすが、起源細胞からどのような機序で遊走し、分化するかについては明らかになっていない。

最近、われわれは全身臓器にごく少数存在している間葉系幹細胞 (MSC) の特異的マーカーであり、かつその未分化性に必要な分子として新規 GPI アンカー型膜タンパク Meflin を同定した (Maeda et al. Sci Rep. 2016)。Meflin は過去に報告されたマーカーに比較して MSC に対する特異性が高く、MSC として知られている perivascular fibroblast に加え、膵臓の星細胞の特異的マーカーであることを報告した (Mizutani et al., Cancer Res., 2019)。培養 MSC を TGF- β で刺激すると、Meflin の発現が減少し、 α SMA の発現が増強することから、Meflin 陽性 MSC が線維化と関連する筋線維芽細胞の起源細胞の 1 つであることが示唆された。実際、Meflin 陽性 MSC 由来の線維芽細胞の in vivo labelling lineage tracing を行うと、Meflin 陽性線維芽細胞から α SMA 強陽性の線維芽細胞が出現することが明らかになった (Hara et al., Circ Res., 2019; Mizutani et al., Cancer Res, 2019)。さらに興味あることにヒト膵がんにおいて Meflin 陽性線維芽細胞の発現が高いがんほど予後が良いということが示され、Meflin ががん抑制性 CAF の有効なマーカーになることを示した (Mizutani et al., Cancer Res. 2019)。

2. 研究の目的

さまざまな臓器の線維化は重篤な慢性疾患を引き起こし、生命予後に大きな影響を及ぼす。がんにおいてもがん細胞周囲に出現する線維芽細胞 (がん関連線維芽細胞, CAF) から分泌される液性因子の活性や細胞外マトリックスによる線維化がその生物学的特性を規定する要因になり、抗がん剤などの治療効果を減弱させる。がんにおける線維化のメカニズムとその進展機構を明らかにすることは、がんの有効な治療法の開発においても極めて重要な課題である。近年、われわれのグループは、間葉系幹細胞の特異的マーカーとして、GPI アンカー型細胞表面タンパクである Meflin を同定し、Meflin が膵臓の星細胞の特異的マーカーであること、膵がん周囲の線維化組織に存在する Meflin 陽性線維芽細胞ががんの進行を抑制する働きがあることを明らかにした。さらに、この Meflin 陽性線維芽細胞が膵がんの進行過程で、がん促進性の平滑筋型ミオシン (α SMA) 陽性線維芽細胞に変換することも明らかにした。

本研究では、がん線維化に関わる線維芽細胞の分化と機能における Meflin の関与について解析を

行い、どのような機序でがんの悪性を制御しているかを解明する。膵がんに加え、肺がん、泌尿器がんにおける腫瘍内線維芽細胞における Meflin の発現と予後との関連、免疫関連細胞の浸潤、免疫チェックポイント阻害剤の効果との関連の解析を行う。また、Meflin 結合タンパクを同定して、Meflin がどのような機序でがん細胞の生物学的性質を制御するか機能解析を進める。さらに、線維芽細胞における Meflin の発現を増強する低分子化合物のスクリーニングを行い、膵がんに対する新たな治療薬開発に資する。

3. 研究の方法

(1) がん関連線維芽細胞(CAF)における Meflin 発現レベルと患者予後との関連および免疫関連細胞のがん組織内への浸潤の解析:膵がんにおいて、がん周囲線維化組織における線維芽細胞中の Meflin の発現が高いほど予後が良いことを明らかにし、膵がんにおいては Meflin 陽性線維芽細胞ががん抑制性 CAF である可能性を示した。本研究ではさらに肺がん、大腸がん、泌尿器がん組織を用いて Meflin 陽性 CAF と予後との関連性を検討する。また、多くの膵がん患者は免疫チェックポイント阻害剤に抵抗性であることが明らかになっているが、これは膵がん組織の高度の線維化が免疫細胞の分布や機能に影響を及ぼしている可能性が考えられている。よって、上記がん組織において、Meflin 発現レベルと免疫関連細胞(ミエロイド系、B 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、制御性 T 細胞など)の浸潤や分布にどのような違いがあるかを免疫組織学的に明らかにする。同時に、ヒトの膵がんモデルマウスである KPC マウス(K-ras、P53 変異タンパクを膵管上皮で発現するマウス)と MeflinKO マウスと交配した系を用いて、野生型マウスで発生した膵がん間質内の免疫関連細胞の分布と比較する。本解析で得られる知見をもとに膵がん細胞への免疫系の活性化のための戦略に資する。

(2) Meflin 陽性 CAF の膵がん間質における機能の解析; MeflinKO マウスと KPC マウスを交配して発生する膵がんは、野生型マウスで発生する膵がんに比し有意に増殖が速く、低分化であることを報告した(Mizutani et al., Cancer Res., 2019)。この結果は、Meflin 陽性率が高いほど、膵がん患者の予後が良いことと一致している。膵がん間質の線維化の状態を解析した結果、MeflinKO マウスに発生した膵がんではコラーゲン繊維がより太く、直線状の構造をとることが明らかになり、コラーゲン繊維の性状による間質の硬さとがんの増殖、浸潤能の関連性が示唆された。Meflin のがん間質での役割をさらに解明するため、結合タンパクを質量分析法で解析した結果、興味あることにコラーゲン繊維を架橋する働きのある Lysyl oxidase (Lox) が同定された。本研究では、KPC マウスに発生した膵がん組織を用いて、Meflin が Lox の機能とそれに伴うコラーゲン繊維の架橋を制御し、膵がん間質の硬さを規定しているかどうか解析する。膵がん組織の硬さの解析には原子間力顕微鏡を使用する。

(3) がん治療を目指した Meflin の発現を増強する低分子化合物の探索: CAF における Meflin の発現を増強することにより、がん間質の性質を変化させる(コラーゲン繊維の架橋を抑え、より柔らかい間質を形成することにより、抗がん剤が届きやすい環境あるいはがん細胞を攻撃する免疫細胞が浸潤しやすい環境を創り出せる可能性がある。Meflin の発現を増強する低分子化合物を Meflin プロモーター下にルシフェラーゼを発現する系を用いてスクリーニングし、有効な化合物を探索する。われわれはすでにビタミン D(calcipotriol) が Meflin の発現を誘導することを確認しており(Mizutani et al., Cancer Res.

2019)、ビタミン D に加えビタミン A の analogue を含め、スクリーニングを行う予定である。いくつかの候補物質が得られたら、培養細胞で Meflin タンパクの発現を誘導できる化合物を絞り込み、治療研究へと展開する。

4. 研究成果

(1) 大腸がんにおける Meflin 陽性 CAF の機能:、網羅的な遺伝子解析を用いて、大腸がんの CAF に特異的に発現し、かつ BMP に関連した遺伝子として、Meflin (別名: ISLR) と Gremlin 1 を同定した。機能解析により、大腸がん組織中の異なる CAF に発現する Meflin と Gremlin 1 という分子が、大腸がんの BMP のシグナルを調節することにより、それぞれがんを抑制および促進することを明らかにした。さらに、Gremlin1 の機能を抑制、あるいは Meflin の発現を増やすことで BMP シグナルが増強され、大腸がんの増殖が抑えられた。病理組織検体を用いた遺伝子発現解析を行い、Meflin を多く発現する大腸がん患者は良好な予後を示し、Gremlin 1 を多く発現する大腸がん患者は予後不良を示すことが明らかになった。これらの結果から、「がん促進性 CAF」および「がん抑制性 CAF」には、それぞれ Gremlin1 および Meflin が高発現し、CAF の機能的な多様性の本態が両分子の BMP シグナルへの関与の違いによるものである可能性が示唆された。

(2) 非小細胞肺癌における Meflin 陽性 CAF と免疫チェックポイント(IC)阻害剤の有効性との関連: 免疫チェックポイント阻害剤 (nivolumab, pembrolizumab or atezolizumab) で治療された非小細胞肺癌 132 例において CAF の Meflin 高発現群 (線維芽細胞の 20% 以上が Meflin 陽性) と低発現群の間で奏効率、予後を比較したところ、Meflin 高発現群において奏効率、予後ともに有意に高かった。また Meflin 高発現群の腫瘍中には浸潤 CD4 陽性 T 細胞が多いことが観察された。さらに肺小細胞がんのモデルマウスの系において、MeflinKO マウスと交配させることにより IC 阻害剤の反応が低下し、一方 CAF 特異的に Meflin を過剰発現すると IC 阻害剤に対する反応性が増強した。

(3) 合成レチノイド Am80 による CAF における Meflin 発現の増強と膵がんにおける治療効果:、ケミカルライブラリーのスクリーニングにより、合成非天然型レチノイドである Am80 が、CAF における Meflin の発現を効果的に誘導することができる試薬であることを明らかにした。膵がんモデルマウスへの Am80 の投与により、CAF における Meflin の発現が増強するとともに、腫瘍血管面積の増加や腫瘍内薬物送達を増加を見られ、化学療法 (gemcitabine) に対する膵がんの感受性が改善された。メカニズム的には、Meflin は Lysyl oxidase と相互作用してそのコラーゲン架橋活性を阻害することにより、腫瘍微小環境における組織硬化の抑制に関与していた。これらのデータは、CAF の heterogeneity を調節することが膵がん治療の戦略になることを示唆した。

(4) 泌尿器がんにおける Meflin 陽性 CAF と IC 阻害剤の有効性との関連: 腎明細胞がん、尿路上皮がんの症例を用いた免疫染色による解析の結果、がん間質 CAF における Meflin 高発現群 (陽性率 15% 以上) と低発現群を比較すると、前者において IC 阻害剤の有効性が有意に高いことが明らかになった。さらに、尿路上皮がんのマウスモデルを用いて、Am80 を前投与後、IC 阻害剤で治療すると、腫瘍縮小効果が有意に改善することが明らかになり、同時に腫瘍内では M1 様マクロファージが増加することを示した。Am80 と IC 阻害剤の組み合わせが、新たながん治療法の開発につながることを示した。

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 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Miyai Y, Sugiyama D, Hase T, Asai N, Taki T, Nishida K, Fukui T, Chen-Yoshikawa TF, Kobayashi H, Mii S, Shiraki Y, Hasegawa Y, Nishikawa H, Ando Y, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 5
2. 論文標題 Meflin-positive cancer-associated fibroblasts enhance tumor response to immune checkpoint blockade	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202101230	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 Iida T, Mizutani Y, Esaki N, Ponik SM, Burkel BM, Weng L, Kuwata K, Masamune A, Ishihara S, Haga H, Kataoka K, Mii S, Shiraki Y, Ishikawa T, Ohno E, Kawashima H, Hirooka Y, Fujishiro M, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 41
2. 論文標題 Pharmacologic conversion of cancer-associated fibroblasts from a protumor phenotype to an antitumor phenotype improves the sensitivity of pancreatic cancer to chemotherapeutics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2764-2777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02288	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 該当する
1. 著者名 Hara A, Kato K, Ishihara T, Kobayashi H, Asai N, Mii S, Shiraki Y, Miyai Y, Ando R, Mizutani Y, Iida T, Takefuji M, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 26
2. 論文標題 Meflin defines mesenchymal stem cells and/or their early progenitors with multilineage differentiation capacity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 495-512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12855	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 Takahashi M, Kobayashi H, Mizutani Y, Hara A, Iida T, Miyai Y, Asai N, Enomoto A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Meflin/IsIr in Cancer Fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 749924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.749924	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 Nakahara Y, Hashimoto N, Sakamoto K, Enomoto A, Adams TS, Yokoi T, Omote N, Poli S, Ando A, Wakahara K, Suzuki A, Inoue M, Hara A, Mizutani Y, Imaizumi K, Kawabe T, Rosas IO, Takahashi M, Kaminski N, Hasegawa Y.	4. 巻 58
2. 論文標題 Fibroblasts positive for meflin have anti-fibrotic properties in pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2003397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.03397-2020	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 Miyai Y, Esaki N, Takahashi M, Enomoto A	4. 巻 111
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts that restrain cancer progression: Hypotheses and perspectives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1047-1057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14346. Epub 2020 Mar 10	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 Kobayashi H, Gieniec KA, Wright JA, Wang T, Asai N, Mizutani Y, Lida T, Ando R, Suzuki N, Lannagan TRM, Ng JQ, Hara A, Shiraki Y, Mii S, Ichinose M, Vrbanac L, Lawrence MJ, Sammour T, Uehara K, Davies G, Lisowski L, Alexander IE, Hayakawa Y, Butler LM, Enomoto A, Takahashi M, Worthley DL, Woods SL et al.	4. 巻 160
2. 論文標題 The Balance of Stromal BMP Signaling Mediated by GREM1 and ISLR Drives Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1224-1239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.11.011	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi H, Gieniec KA, Ng JQ, Goynes J, Lannagan TRM, Thomas EM, Radford G, Wang T, Suzuki N, Ichinose M, Wright JA, Vrbanac L, Burt AD, Takahashi M, Enomoto A, Worthley DL, Woods SL	4. 巻 Sep 3
2. 論文標題 Portal Vein Injection of Colorectal Cancer Organoids to Study the Liver Metastasis Stroma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JoVE Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/62630	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 迫田 朋佳、安藤 良太、宮井 雄基、飯田 忠、松山 誠、白木 之浩、三井 伸二、西田 佳弘、高橋 雅英、榎本 篤
2. 発表標題 骨肉腫におけるMeflin陽性細胞を標的とした抗体薬物複合体の研究開
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋雅英
2. 発表標題 がん及び心疾患線維化における線維化抑制線維芽細胞の同定と機能
3. 学会等名 第8回Heart Science Club（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大腸がん細胞の周囲で増える正常細胞の多様性を解明 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Ga_en_201114.pdf</p>
--

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	榎本 篤 (Enomoto Atsushi)	名古屋大学・医学系研究科・教授	
	(20432255)	(13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	浅井 直也 (Asai Naoya) (80273233)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

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			
中国	中南大学			
オーストラリア	アデレード大学	シドニー大学		
米国	コロンビア大学	カリフォルニア大学サンディエゴ校	ウィスコンシン大学	
ポーランド	Military Inst of Hygiene and Epidemiol			
英国	ニューキャッスル大学	オックスフォード大学		