

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07370

研究課題名（和文）がん浸潤先進部におけるがん関連線維芽細胞特異的マーカーの同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of cancer-associated fibroblast-specific markers at the forefront of invasion

研究代表者

目黒 史織（Meguro, Shiori）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40724290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ヒト大腸がん浸潤先進部のがん関連線維芽細胞（cancer-associated fibroblast: CAF）特異的マーカーの同定である。創傷治癒の線維芽細胞と筋線維芽細胞に強く発現している遺伝子の同定を行い、その中から18種類のタンパク質を拾い上げ、ヒト大腸がん（早期癌）における発現を免疫組織化学的に検討したところ、インテグリン 5が全ての症例においてがん浸潤先進部のCAFで陽性であった。進行癌28症例の浸潤先進部のCAFでも同様であった。以上の結果からは、インテグリン 5は大腸がん浸潤先進部のCAF特異的マーカーとな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

近年、腫瘍微小環境が従来考えられていたよりも能動的な役割を担っていることが明らかになっており、微小環境は腫瘍の進行の重要な決定因子であると考えられている。がん浸潤先進部での線維増生（desmoplastic reaction: DR）は活性化した線維芽細胞や筋線維芽細胞を含み、形態的、機能的に多様な細胞集団であると考えられるが、これまでにDRの質的評価は十分になされていない。その理由として、CAFの細分類のためのマーカーが不足していることが挙げられる。がん浸潤先端部でのCAFを細分類できるマーカーがあれば、CAFの形態学的同定や機能解析が可能となり、CAFに関する研究が進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify specific markers of cancer-associated fibroblasts (CAFs), especially CAFs at the forefront of the invasion. We identified genes strongly expressed in wound-healing fibroblasts and myofibroblasts, picked up 18 proteins among them, and examined their expression in human colorectal cancer (early stage cancer) by immunohistochemistry. The results showed that integrin 5 was positive in all cases of CAFs at the forefront of invasion. The same results were obtained for CAFs at the forefront of invasion in 28 patients with advanced cancer. These results suggest that integrin 5 is a CAF-specific marker for at the forefront of invasion.

研究分野：人体病理学

キーワード：がん関連線維芽細胞 CAF 線維芽細胞 大腸癌 インテグリン 5 INTGAV

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の浸潤に伴い出現する線維組織の増生は desmoplastic reaction (DR) と呼ばれ、悪性度の高い腫瘍の間質は一般的に血管新生が乏しく DR が顕著である。近年、腫瘍の微小環境が従来考えられていたよりも能動的な役割を担っていることが明らかになっており、癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblasts: CAF) がその形成の主役を務める DR は、決して単なる受動的な宿主反応ではないと理解されつつある。CAF はがん細胞の挙動に対して重要な決定因子である可能性がある。例えば、いくつかのトランスクリプトームおよび免疫組織化学的研究により、線維形成性のがん間質は患者の予後不良と関連しており、治療に対する反応を予測できることが示されている¹。

特にがん浸潤先進部での DR は活性化した線維芽細胞や筋線維芽細胞などを含み、形態的に多様性に富んでおり、機能的にも heterogenous な細胞集団であると考えられる。しかしながら、これまでに腫瘍-間質比などを指標とした量的な DR の評価は試みられていたものの、DR の質的評価は十分になされていない。その理由として、CAF の細分類のためのマーカーが不足していることが挙げられる。がん浸潤先端部での CAF を細分類できるマーカーがあれば、CAF の形態学的同定や機能解析が可能となり、がん浸潤先端部の CAF に関する研究が進むと考えられる。



2. 研究の目的

がん浸潤先端部 CAF 特異的マーカーの同定、およびがん浸潤先端部の CAF の機能を解析することである。

3. 研究の方法

(1) 創傷治癒早期～中期に出現する線維芽細胞と筋線維芽細胞に強く発現している遺伝子の同定、およびがん浸潤先端部 CAF 特異的マーカー候補の同定

がん浸潤先端部と正常組織の境界部では、常に新しい創傷治癒が生じている。我々は、以前、肺プレオマイシン線維症モデルマウスから、創傷治癒の早期～中期に出てくる線維芽細胞と筋線維芽細胞を FACS を用いて純化することに成功している^{2, 3}。そこで、創傷治癒の早期～中期に出現する線維芽細胞、筋線維芽細胞、および正常肺線維芽細胞の gene expression profiling を比較し、創傷治癒の線維芽細胞と筋線維芽細胞に特異的なマーカーを見出し、それらに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行えば、大腸がん浸潤先端部 CAF に特異的なマーカーが分かるのではないかと作業仮説を立てた。

Agilent 社のマイクロアレイを使用して、創傷治癒の早期～中期（プレオマイシン投与後 8-10 日目）に出てくる線維芽細胞、筋線維芽細胞と正常の肺線維芽細胞の gene expression profiling を比較した。創傷治癒の線維芽細胞と筋線維芽細胞に強く発現している 74 遺伝子を同定し、quantitative RT-PCR によって、創傷治癒の線維芽細胞と筋線維芽細胞に強く発現することを確認した。さらに、Human Protein Atlas に掲載されている大腸がんの組織写真を見て、74 種類のタンパク質の発現を web 上で 1 つずつ検討した。すると、18 種類のタンパク質が大腸がんの間質に発現していたことがわかった。

(2) ヒト大腸がん浸潤先端部 CAF の特異的マーカーの同定

粘膜下組織まで浸潤しているヒト大腸がん（深達度 pT1b 大腸がん）10 症例（陥凹型 5 症例と隆起型 5 症例）を使用して、18 種類のタンパク質に対する抗体で免疫組織化学染色を行った。同様に、進行癌（深達度 pT3、高分化/中分化管状腺癌）28 症例についても免疫組織化学的な検討を行った。

(3) マウス大腸がん浸潤先端部 CAF の機能解析

マウスに発生した大腸がんの浸潤先端部 CAF が、がん浸潤に促進的に働くのかそれとも抑制的に働くのかを、明らかにする。C57Bl/6 マウスに azoxymethane (AOM) と dextran sodium sulfate (DSS) を投与すると、AOM 投与後 70 日目に粘膜下組織へ浸潤する大腸がん (AOM/DSS 大腸がん) が生じる。凍結切片を作成して、抗 ITGAV 抗体によって免疫組織化学染色を行う。そして、大腸がん浸潤先端部に ITGAV 陽性 CAF が存在することが確認出来たら、次の 2 種類の実験を行う。

ATN-161 (ITGAV beta 3 の antagonist) を AOM/DSS 大腸がんマウスに投与して、大腸がんの発生にどのような変化が生じるかどうかを検討する。また、浸潤性大腸がんが生じた後 (AOM 投与後 70 日以降) に ATN-161 を投与して、ITGAV 陽性 CAF が減少するかどうかを検討する。減少すると

するならば、浸潤性大腸がんの進展にどのような影響を与えるかについて検討する。

マウス *Itgav* 遺伝子のエンハンサー/プロモーターをクローニングして、その下流にジフテリア毒素受容体の遺伝子を組み込んだ plasmid を作成し、トランスジェニックマウスを作製する。そのトランスジェニックマウスでは、浸潤性の AOM/DSS 大腸がんが生じた後に、ジフテリア毒素を注入すると ITGAV 陽性 CAF を選択的に死滅させることができる。ITGAV 陽性 CAF が減少した後の浸潤性大腸がんの進展について検討することで、大腸がん浸潤先進部 ITGAV 陽性 CAF はがん促進性 CAF なのかがん抑制性 CAF なのか、それともがん浸潤に関係がないのかが解明できるものとする。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸がん浸潤先進部 CAF の特異的マーカーの同定: pT1b 大腸がん 10 症例を使用して、大腸がんの浸潤先進部 CAF 特異的マーカー候補として挙げられた 18 種類のタンパク質に対する抗体で免疫染色を行ったところ、18 種類のタンパク質のうち integrin alpha V (ITGAV) が、すべての症例において大腸がん浸潤先進部周囲に発現していることが明らかとなった (Fig. 2)。陥凹型大腸がん浸潤先進部周囲における ITGAV 陽性細胞の多くが、alpha-smooth muscle actin (SMA: 筋線維芽細胞のマーカー) 陰性であった (Fig. 3)。蛍光免疫染色では、ITGAV 陽性細胞の多くは、lineage マーカー (上皮細胞マーカー (AE1/AE3)、血管内皮細胞マーカー (CD31)、血管壁細胞マーカー (myosin1B)、リンパ管内皮マーカー (Lyve-1) および血液細胞マーカー (CD45)) を発現しておらず、CAF と考えられた (Fig. 4)。そして、このがん浸潤先進部 CAF は Fig. 3 で見られた様に SMA 陰性であった (Fig. 5)。一方、大腸内腔側の CAF は ITGAV を発現していなかった (Fig. 6) SMA 陽性であった (Fig. 7)。一方、隆起型では、大腸がん浸潤先進部 CAF は、主として ITGAV 陽性/ SMA 陽性 CAF であった (Figs. 8 and 9)。

次に、進行癌 28 症例についても免疫組織化学的な検討を行った。ITGAV、コラーゲン、コラーゲン XII、four and half LIM domains 2 (Fhl2)、latent transforming growth factor beta binding protein 2 (LTBP2)、ペリオスチン、テネイシン C に対する抗体を用い染色を行った。

その結果、ITGAV は、すべての症例の浸潤先進部の間質を構成する細胞に発現していたが、浸潤部から離れた腫瘍間質や非腫瘍間質の線維芽細胞では発現が減少していた。ペリオスチンは 14 症例の間質に弱く陽性を示したが、浸潤先進部を構成する細胞に特異的な発現は認められなかった。コラーゲンは腫瘍部および非腫瘍部の血管周囲で陽性像がみられたが、腫瘍間質での発現は認められなかった。コラーゲン XII、Fhl2、LTBP2、テネイシン C は、腫瘍間質に発現はみられなかった。

以上の結果を模式的にまとめると、ITGAV の発現と CAF の分布は Fig. 10 のようになる。

(2) 今後の展望: 上記の研究の方法 (3) に挙げたマウス大腸がん浸潤先進部 CAF の機能解析は、今回の研究期間中には遂行できなかったが、今後も解析を進めていきたいと考えている。

<引用文献>

1. Ueno H et al. Am J Surg Pathol. 2017;

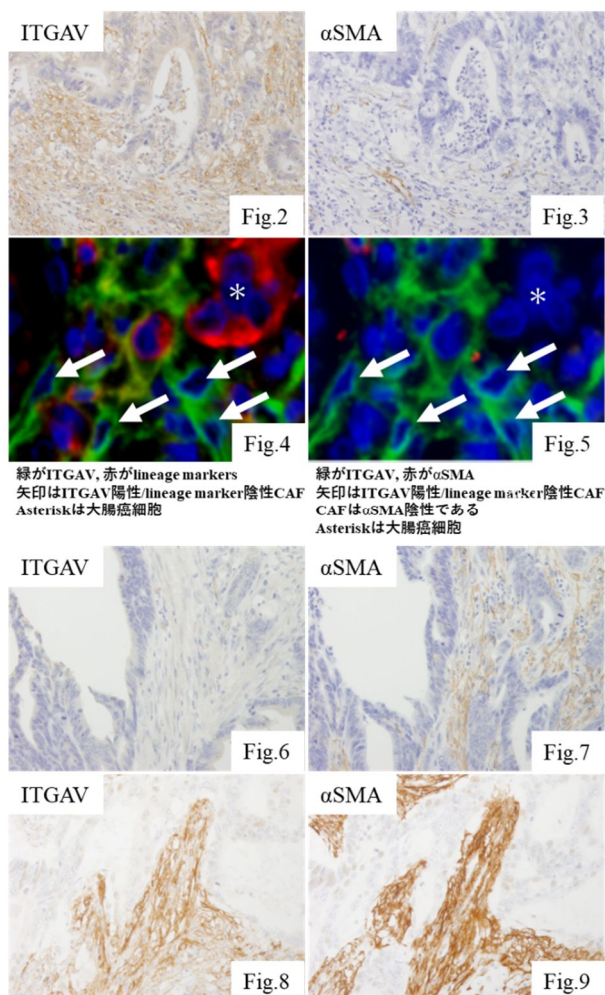
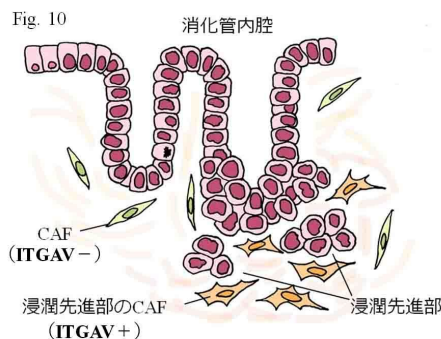


Fig. 2 ITGAV Fig. 3 αSMA
 Fig. 4 緑がITGAV, 赤がlineage markers 矢印はITGAV陽性lineage marker陰性CAF Asteriskは大腸癌細胞
 Fig. 5 緑がITGAV, 赤がαSMA 矢印はITGAV陽性lineage marker陰性CAF αSMA陰性である Asteriskは大腸癌細胞



41:1506-1512.

2. Akamatsu T et al. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013; 6:15.

3. Enomoto Y et al. *Clin Sci (Lond)*. 2018; 132:1565-1580.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	岩下 寿秀 (Iwashita Toshihide) (00283432)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	八木 春奈 (Yagi Haruna) (70837385)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	削除：2021年3月26日

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