

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09005

研究課題名(和文) 癌細胞におけるFAP 発現の意義の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of FAP alpha in cancer cell

研究代表者

清水 智治 (Shimizu, Tomoharu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70402708

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)：Fibroblast activation protein (FAP) はセリンプロテアーゼファミリーに属する細胞膜蛋白質であり、分解酵素として重要な機能を果たす。SMAなどと同様に癌関連線維芽細胞のマーカーとして用いられる。これまでに癌間質のFAPの発現が癌患者の予後不良因子であると報告されている。これまでに、癌細胞に発現するFAPがどのように予後に関与しているかについては明らかでなく、本研究はFAPの発現による癌や間質などが微小環境への影響と臨床への影響などについて検討をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は、2017年の女性における死亡原因の1位であり、対策が必要な疾患の一つである。大腸癌において遺伝子変異の重要性などが明らかになっているがFAPに関しては未だ十分ではない。生体内では癌と間質ではFAPは異なる役割を果たしている可能性があり、大腸癌におけるFAPを明らかにすることで癌の治療やバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast activation protein (FAP) is a member of the serine protease family of plasma membrane proteins and plays an important function as a degradative enzyme. FAP expressed in the stroma in the peritumoral environment of cancers can establish a favorable tumor microenvironment for tumor progression, such as promoting cancer cell proliferation and angiogenesis, and suppressing tumor immunity by reducing tumor immunity via T cells and macrophages. The expression of FAP in cancer stroma is a poor prognostic factor for cancer patients. However, it is not clear how FAP expressed in cancer cells is involved in prognosis. In this study, we investigated the effects of FAP expression on the tumor microenvironment, including the tumor and stroma, and its clinical implications.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 FAP バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌 (CRC) は、2017 年の女性における悪性疾患死亡原因の 1 位であり、今後も増加が想定され、2030 年までに患者数は 220 万人以上増加すると予想される<sup>1)</sup>。大腸癌は TP53 や APC、KRAS などの遺伝子変異が Driver mutation となり、癌の発生、進展、転移に影響を与えている。さらに、大腸癌のコンセンサス分子サブタイプでは、生物学的シグネチャーによって 4 つのサブタイプが報告された<sup>2)</sup>。

がん微小環境として、血管新生や免疫細胞、また線維化なども重要であることが知られている。一方で予後因子の同定や癌の早期発見における因子はこれまでに明らかではなく、臨床において重要なバイオマーカーの確立が必要である。

Fibroblast activation protein-alpha (FAPα) は、セプラーゼとも呼ばれるセリンプロテアーゼで、主に活性化した線維芽細胞で発現している。また、T 細胞やマクロファージを介して腫瘍免疫を低下させ、癌周囲環境で間質に発現する FAPα が、癌細胞の増殖や血管新生の促進、腫瘍免疫の抑制等、癌の進展に有利な微小環境を構築することが知られている。これらより FAP は、発生、組織リモデリングのための細胞外マトリックスの分解、癌に対する免疫学的効果など、多機能な役割を担っているが、がん細胞における FAP の発現の臨床的な関連性は明らかではない。

## 2. 研究の目的

これまでに癌間質における FAPα の発現が癌患者の予後不良因子であると報告されているが、癌細胞に発現する FAPα がどのように予後に関与しているかについては明らかでない。本研究は FAPα の発現による癌や間質などががん微小環境への影響と臨床への影響などについて検討をおこなった。

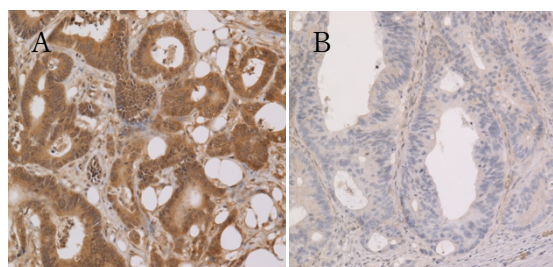


図 1. 原発巣浸潤部の癌部における FAP 染色。免疫組織化学で茶色に染色された FAP を強 (A)、陰性 (B) に分類した。

## 3. 研究の方法

進行大腸がん (CRC) に対する外科的切除を受けた標本における 180 例を用いて検討を行った。

免疫組織化学染色は 10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 4-5 μm の切片を用いた。脱パラフィン後、45 分間、98 度で加熱し、Immunosaver (Nisshin EM, Tokyo, Japan) を用いて抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性に対しメタノール 3%過酸化水素で 10 分間処理をおこなった。ブロッキングワンヒスト (nacalai tesque) で非特異的タンパク質結合をブロックした後、1:400 で希釈したウサギポリクローナル FAPα 抗体 (ab28244; Abcam) と 4℃ インキュベートした。トリス緩衝食塩水

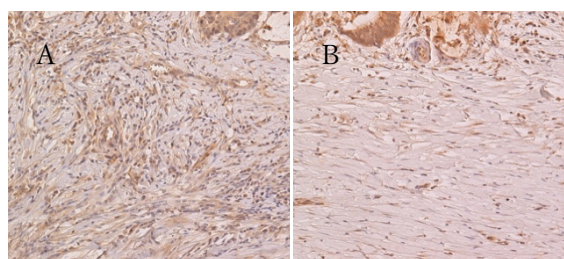


図 2. 原発巣浸潤部の間質における FAP 染色。免疫組織化学で茶色に染色された FAP を強 (A)、陰性 (B) に分類した。

(TBST) で 3 回洗浄し、HRP 標識ポリマー結合二次抗体 (Simple Stain MAX PO (MULTI); Nichirei Bioscience) 室温で 30 分インキュベートした。DAB (ニチレイバイオサイエンス) を用いて 10 分間発色を行った。

IHC スコアリングに関しては IHC Profiler プラグインを使用した。IHC profiler は、カラーデコンボリューションとコンピュータによるピクセルプロファイリングにより、各画像に 0~2 点の自動スコアを付与される。1 枚のスライドから 3 枚の画像を撮影し、1 人の患者の合計スコアは 0~6 となった。

## 4. 研究成果

FAP の染色を行ったところ、26 例 (14%) ががん細胞における FAPα の発現が陰性に分類された (図 1)。がん細胞における FAPα の発現に基づいて検討した所、がん細胞での FAPα 発現が低

値の群については全生存率が低下していた。臨床病理学的因子に関する多変量解析では、腫瘍浸潤 (HR: 5.098; CI,  $P < 0.001$ )、術前 CEA (HR: 2.32, CI ; ;  $P = 0.020$ )、リンパ節転移 (HR: 3.125; CI,  $P = 0.003$ )、がん細胞における FAP $\alpha$  陽性 (HR: 0.356;  $P = 0.009$ ) が独立した再発予測因子となった。一方で間質における FAP の発現を検討したところ、119 例が FAP $\alpha$  の発現高値に分類された。これらの症例で予後解析を行った所、両群で差を認めなかった。これらの結果より大腸癌において FAP $\alpha$  は大腸癌と間質において発現が異なり、大腸癌における FAP $\alpha$  の発現が癌の進展、転移に重要である可能性が示唆された。(図 4)

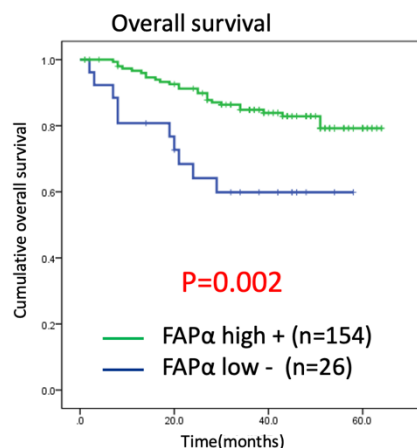


図 3 がん細胞の FAP $\alpha$  発現に基づく全生存率。がん細胞における FAP $\alpha$  の発現が低値群では全生存率が低下した。

ヒト CRC における FAP $\alpha$  発現の臨床的相関性

発現陽性 (スコア 2-6) と発現陰性 (スコア 0-1) のグループに分類した。全患者の 14% が、がん細胞における FAP $\alpha$  の発現陰性群に分類された。がん細胞における FAP $\alpha$  発現群と臨床病理学的因子との相関を解析したところ、年齢、性別、腫瘍部位、腫瘍分化度、腫瘍浸潤度に有意差はなかった。一方、腹膜播種 ( $P = 0.026$ )、肺転移 ( $P = 0.040$ )、病理学的 TNM ステージは FAP $\alpha$  発現と有意に相関していた。これらの結果から、がん細胞における FAP $\alpha$  の陰性発現は、転移と相関があることが示唆された。Ki 67 染色によるがん増殖の解析を行ったが、FAP $\alpha$  陽性群と陰性群でがん増殖に変化を認めなかった

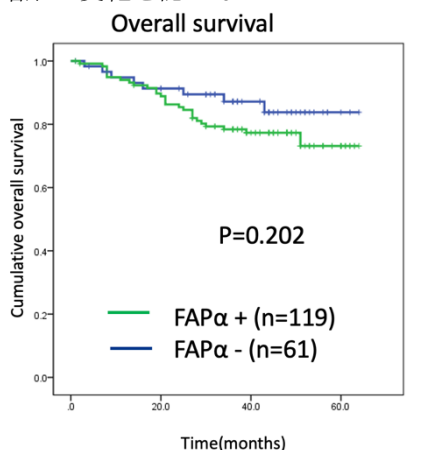


図 3 がん間質における FAP $\alpha$  発現に基づく全生存率。間質における FAP $\alpha$  の発現で差を認めなかった。

FAP $\alpha$  は、DPP8、DPP9 と同じセリンプロテアーゼを持つジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 4 遺伝子ファミリーの一員である<sup>3)</sup>。DPP4 と FAP $\alpha$  は、膜貫通型プロテアーゼで、末端がプロリンまたはアラニン残基のポリペプチドから N 末端のジペプチドを切断する FAP $\alpha$  は、創傷治癒過程に重要な 1 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解する能力を有している<sup>4)</sup>。FAP $\alpha$  は、腫瘍の微小環境の一部である癌関連線維芽細胞 (CAF) に発現する間葉系マーカーである。これまでに CRC の原発巣だけでなく転移リンパ節においても、腫瘍線維化が癌の予後に強く影響することを報告している。腫瘍間質における FAP 発現の役割は、臨床的予後や晩期病期との関連性が既に報告されている。膵臓癌では、FAP $\alpha$  の間質への発現が臨床予後の悪化と関連することが知られている。

5) 多変量解析により、FAP $\alpha$  の陰性発現が CRC の無病生存率と相関することが示唆された。このような患者には、術後の綿密なフォローアップと補助化学療法が推奨される。

今後、患者における FAP $\alpha$  発現の臨床的影響を解明するためには、さらなる基礎的な実験の追加とともに多数の臨床での症例蓄積が必要であると考えられる。

- 1) Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66:683-691.
- 2) Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015;21:1350-1356.
- 3) Yazbeck R, Jaenisch SE, Abbott CA. Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein. *Protoplasma*. 2018;255:375-386.
- 4) Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, et al. Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *PROTEOMICS - Clinical Applications*. 2014;8:454-463.
- 5) Levy MT, McCaughan GW, Abbott CA, et al. Fibroblast activation protein: A cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis: Fibroblast Activation Protein: A Cell Surface Dipeptidyl Peptidase and Gelatinase Expressed by Stellate Cells at the Tissue Remodelling Interface in H. *Hepatology*. 1999;29:1768-1778.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takebayashi Katsushi, Murata Satoshi, Kaida Sachiko, Yamaguchi Tsuyoshi, Otake Reiko, Miyake Toru, Ueki Tomoyuki, Kojima Masatsugu, Iida Hiroya, Maehira Hiromitsu, Mori Haruki, Shimizu Tomoharu, Tani Masaji	4. 巻 224
2. 論文標題 Adverse impact of postoperative intra-abdominal infectious complications on cancer recurrence-related survival after curative gastric cancer surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 949 ~ 954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.amjsurg.2022.05.009	査読の有無 無
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 Takebayashi Katsushi, Murata Satoshi, Kodama Hirokazu, Kaida Sachiko, Yamaguchi Tsuyoshi, Ishikawa Ken, Shimoji Miyuki, Miyake Toru, Ueki Tomoyuki, Kojima Masatsugu, Iida Hiroya, Maehira Hiromitsu, Shimizu Tomoharu, Tani Masaji	4. 巻 48
2. 論文標題 Long-term prognosis of patients with cancer-related genes detected in postoperative peritoneal washings obtained during curative gastrectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2021.05.012	査読の有無 無
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 -

〔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	谷 眞至 (Shimizu Tomoharu) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授  (14202)	
研究分担者	三宅 亨 (Miyake Toru) (70581924)	滋賀医科大学・医学部・講師  (14202)	

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