

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09088

研究課題名(和文)大腸癌関連線維芽細胞の癌悪性化および治療抵抗性促進機構の解明と新規治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of colorectal cancer-associated fibroblasts to promote cancer malignancy and treatment resistance

研究代表者

渋谷 智義 (tomoyoshi, shibuya)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：60365616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：手術により摘出された大腸癌部および非癌部の検体を採取し21例のCAFおよびコントロールの線維芽細胞の樹立に成功した。また、8症例の大腸癌オルガノイドも樹立した。細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立されていることが確認された。また、RNA-sequencingにより非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFにおいて有意に発現が亢進している遺伝子が複数同定された。今後は3D大腸癌オルガノイド培養や、CAFと大腸癌オルガノイドの共培養系の樹立やマウスへの同所共移植によるPDXモデルを作製し、CAFで誘導される癌浸潤・転移の生物学的研究を進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性大腸癌の転移再発に対する現行の抗癌剤の治療効果は不十分であり、根治的治療の開発が望まれている。大腸癌の間質に多く存在する線維芽細胞は癌浸潤、転移や治療抵抗性獲得に関与していることが知られているが、その分子機構の理解は不十分である。本研究は、大腸癌由来線維芽細胞を抽出し、大腸癌の浸潤、転移や治療抵抗性獲得に与える影響を分子レベルで解明することにより癌悪性化機構の理解を深める意義がある。

研究成果の概要(英文)：We collected specimens from colon cancerous and non-cancerous areas resected by surgery, and successfully established 21 cases of CAFs and control fibroblasts. We also established 8 colon cancer organoids. Immunohistochemical staining using a cell-specific antibody confirmed the establishment of highly pure fibroblasts. In addition, RNA-sequencing identified multiple genes that were significantly upregulated in CAFs compared to non-cancerous control fibroblasts. In the future, we will establish a 3D colon cancer organoid culture, establish a co-culture system of CAFs and colon cancer organoids, prepare a PDX model by orthotopic co-transplantation into mice, and conduct biological research on cancer invasion and metastasis induced by CAFs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸癌 癌微小環境 線維芽細胞 浸潤・転移

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌微小環境が大腸癌悪性化を促進することが示唆されている(Calon, A., *et al.*, *Nat Genet* 47, 320-329, 2015)。 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性の活性化筋線維芽細胞である癌内線維芽細胞 (Carcinoma-associated fibroblasts : CAFs)は患者大腸癌の間質で多く検出され、腫瘍の増殖、浸潤や転移さらには癌細胞の治療抵抗性に寄与することが知られている。申請者らは、乳癌内に存在する線維芽細胞が癌化の過程において癌細胞の影響を受けて CAFs に分化し、正常組織に存在する線維芽細胞とは異なった性質を獲得していることをこれまでに明らかにした。またヒト乳癌より抽出された CAFs は血管新生促進性サイトカイン stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) を高発現し乳癌の血管新生や増殖を促進することを示した。さらに、CAFs が癌の進展過程で SDF-1 と TGF- $\beta$ シグナルを亢進し、癌促進能の表現型を安定に維持し、癌細胞と独立した癌化を促進する細胞であることを明らかにした。しかしながら、CAFs が癌細胞に高転移性や治療抵抗性をもたらすメカニズムはまだ不明な点が多い。

以前より癌浸潤・転移を促進するプログラムとして完全型上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT)が広く知られている(Thiery, J.P., *et al.*, (2009). *Cell* 139, 871-890.)。EMT が誘導されると上皮系の表現型を消失した癌細胞は細胞-細胞接着能を失い、単一の間葉系癌細胞としてその浸潤能を亢進し、遠隔臓器に転移し、間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET)を介して上皮系の表現型が再誘導され転移巣を形成する。しかしながら、近年、EMT 非依存的に間葉系の表現型を介することなく上皮系癌細胞集団(クラスター)が転移する説も報告されている (Cheung, K.J., and Ewald, A.J., *Science* 352, 167-169, 2016)。また、最近多くの患者癌において、partial (部分的)EMT を介して E-cadherin の弱陽性および間葉系の表現型を有した癌細胞 (epithelial-mesenchymal type: E/M type) が細胞-細胞接着能を維持したクラスターを形成し、浸潤・転移に寄与することも提唱されている(Nieto, M.A., *et al.*, *Emt*: 2016. *Cell* 166, 21-45, 2016)。

申請者は CAFs が癌細胞に作用し partial EMT を誘導することにより、E/M type の癌細胞クラスター形成を促進することを推測している(図 1)。この E/M type の癌細胞クラスターは浸潤能および apoptosis 抵抗性を亢進し、高転移性の表現型や治療抵抗性を示すことが推測される。本研究ではこの仮説を分子レベルで解明し、治療応用へ向けての基礎を構築する。

### 2. 研究の目的

悪性の大腸癌の転移再発に対する現行の化学療法や分子標的薬の治療効果は不十分であり、根治的治療の開発が望まれている。大腸癌間質に多く存在する CAFs は癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与しているが、その分子機構はまだ不明な点が多い。申請者らは、大腸癌 patient-derived tumor xenograft (PDX)モデルや organoids の培養を行った実績があり、CAFs が大腸癌細胞の浸潤・転移促進能および治療抵抗性獲得に寄与する分子機構を明らかにする準備ができています。本研究では、患者大腸癌由来 CAFs を抽出し、大腸癌の浸潤、転移や治療抵抗性獲得に与える影響を解明するため、CAFs と大腸癌細胞の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルの同定を目指す。本研究は大腸癌悪性化や治療抵抗性獲得を防ぎ、悪性の大腸癌に対する新規根治療法の確立につながるものであると確信している。

### 3. 研究の方法

CAFs による大腸癌の浸潤・転移や治療抵抗性メカニズムの解明さらにその治療への応用に役立てるために、本研究では、

(1) 8~10 例の患者大腸癌組織や非癌組織を内視鏡的ポリープ切除術あるいは開腹術により外科的に切除する。癌組織はハサミでミンチされた後、collagenase I 37℃で 2 時間処理され、得られた cell suspension を細胞皿上で培養する。

(2) 本研究では、大腸癌由来 CAFs あるいは対照の非癌部由来線維芽細胞と移植された大腸癌塊の増殖能、partial EMT および遠隔臓器への転移能に関して、各グループ間で

比較する。また、マウスより定期的な採血を行い、サイトスピンを用いて血液スミアを作製する。Partial EMT を有した癌細胞クラスターが血中に存在しているか否かを E-cadherin や ZEB1 に対する抗体を使用した免疫組織染色を用いて調査する。上皮系および間葉系マーカー発現が陽性の癌細胞クラスターが検出された場合は、partial EMT を支持する結果となりえる。CAFs の癌転移促進作用や治療抵抗性獲得の分子機構を解明する為に、大腸癌由来 CAFs あるいは対照の非癌部由来線維芽細胞と移植された大腸癌塊より癌 organoids を培養する。これらの organoids より RNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析を施行し、各グループ間で遺伝子発現を比較する。

(3) 上記課題 (2) の DNA マイクロアレイ解析にてグループ間で発現に差が認められた遺伝子のうち、その差が顕著な 5 つの遺伝子の発現を shRNA を用いて抑制し、partial EMT との関与を調査する。一方、EMT 誘導転写因子である ZEB1 の発現が癌細胞の局所浸潤や遠隔臓器に播種した癌細胞の tumor-initiating ability を維持することが報告されている (Nieto, M.A., et al., *Emt*: 2016. *Cell* 166, 21-45, 2016)。E-cadherin の発現も遠隔臓器に播種した癌細胞の colonization に必須であることが知られている。以上より、ZEB1 および E-cadherin に対する shRNA を導入した大腸癌 PDX 由来 organoid を作製し、NOG マウスに移植後、転移の有無を観察する。ZEB1 および E-cadherin の発現の抑制が、CAFs による転移形成能の促進を抑制するか否かを検討する。

#### 4 . 研究成果

手術により摘出された大腸癌部および非癌部の検体を採取し 21 例の CAFs およびコントロールの線維芽細胞の樹立に成功した。また、8 症例の大腸癌オルガノイドも樹立した。上皮細胞、間葉系細胞や血球系細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立されていることが確認された。また、RNA-sequencing により非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFs において有意に発現が亢進している遺伝子が複数同定された。現在 bioinformatic な解析を施行中である。

今後は 3D 大腸癌オルガノイド培養や、CAFs と大腸癌オルガノイドの共培養系の樹立やマウスへの同所共移植による PDX モデルを作製し、CAFs で誘導される癌浸潤・転移の生物学的研究を進めていきたい。また CAF で高発現している特定の遺伝子発現を shRNA でノックダウンし、癌浸潤・転移への影響を調査したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Fukushima H, Murakami T, Suzuki N, Shibuya T, Yao T, Nagahara A.	4. 巻 5
2. 論文標題 Rare case of advanced rectal cancer with multiple liver and bone metastases presenting with McKittrick-Wheelock syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open .	6. 最初と最後の頁 1103-1105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jgh3.12635.	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 Tomoyoshi Shibuya 1, Keiichi Haga 1, Michio Saeki 1, Mayuko Haraikawa 1, Hitoshi Tsuchihashi 2, Koki Okahara 1, Osamu Nomura 1, Hirofumi Fukushima 1, Takashi Murakami 1, Dai Ishikawa 1, Shigaku Ikeda 2, Akihito Nagahara 1	4. 巻 35
2. 論文標題 Pyoderma gangrenosum in an ulcerative colitis patient during treatment with vedolizumab responded favorably to adsorptive granulocyte and monocyte apheresis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Apher .	6. 最初と最後の頁 488-492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jca.21821	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 -

〔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	折茂 彰  (orimo akira)  (70275866)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授   (32620)	

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