

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 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：20K09111

研究課題名(和文)大腸癌原発巣由来転移抑制シグナル機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the metastasis suppression signal mechanism derived from the primary lesion of colorectal cancer

研究代表者

小島 豊 (Kojima, yutaka)

順天堂大学・医学部・客員准教授

研究者番号：00327800

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)：本研究において22例の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た。これらの検体を酵素処理後、primary cultureし21例でCAFsおよびコントロールの線維芽細胞のペアでの樹立に成功した。また、がん組織の一部を酵素処理し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。研究実績として、研究に必要な臨床サンプルからの線維芽細胞とヒト大腸癌オルガノイドの樹立に成功したことがあげられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌死亡の90%は転移に起因しているが、転移のメカニズムは未だ明らかでない。大腸癌の転移再発は、原発巣の外科的な切除後2年以内に生じることが多い。このことから申請者は、原発巣は何らかの転移抑制シグナルを産生し転移巣の増殖を制御しているが、原発巣の切除によりその抑制シグナルが消失することで転移の発症が促進される可能性を想像している。また、高転移性癌では、癌間質の主な構成細胞である線維芽細胞がこの原発巣由来の転移抑制シグナルを阻害することにより、結果として転移を促進していることが予測される。申請研究では、原発巣由来の転移抑制シグナルを同定し新規転移抑制治療の基礎を確立することを目標とする。

研究成果の概要(英文)：In this study, 22 surgically resected colorectal cancer and non-cancerous specimens were collected. After enzymatic treatment of these specimens, primary culture was carried out, and in 21 cases CAFs and control fibroblasts were successfully established in pairs. We also established 8 colon cancer organoids by enzymatically treating a part of the cancer tissue. Immunohistochemical staining using antibodies specific to epithelial cells, mesenchymal cells, and blood cells confirmed the establishment of highly pure fibroblasts. Research achievements include the successful establishment of fibroblasts and human colon cancer organoids from clinical samples required for research.

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 転移

1. 研究開始当初の背景

癌は全身に影響を及ぼす疾患として考えられている。近年、原発巣が産生する増殖因子、サイトカインやエクソゾームが遠隔臓器に作用し、転移した癌細胞が生着し増殖し易い環境 (niche) を形成することが複数の動物モデルを使用した実験により示唆されている (McAllister SS, et al., Nat. Cell Biol., 16, 717-27, 2014)。これらの知見は、原発巣由来の癌細胞が転移促進 niche を形成し、癌細胞の遠隔転移を促進する作用があることを示唆している。

一方、従来より乳癌や大腸癌などの原発巣切除後に、遠隔転移の増悪がみられることが臨床的に観察されてきた (Sugarbaker E., et al., New York: Raven Press, pp. 227-240, 1977)。また、Judah Folkman のグループは、ヒト肺癌細胞株をマウスに皮下移植し、その3日後に原発巣を切除し、13-21日後に肺転移の大きさを観察した。結果として、原発巣を切除しなかった群と比較して、原発巣が切除された群において肺転移が10倍程度増大していた (O'Reilly M., et al., Cell, 79, 315-328, 1994)。さらに原発巣由来転移抑制因子として、血管新生抑制因子である angiostatin が肺実質の血管新生を抑制し、肺転移を抑制していることが明らかにされた。

現在まで上記のように原発巣が転移巣の増殖を促進あるいは抑制する両方の可能性を示唆する論文が混在している。このことから、申請者は転移抑制シグナルが産生されるか否かは、原発巣の性質に依存している可能性に着目した。申請者の先行研究より、癌微小環境に多数存在する線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) が癌浸潤・転移能をさずけることを見出している。以上のことから、申請者は原発巣由来大腸癌細胞は、転移巣増殖抑制シグナルを産生し遠隔臓器での転移増殖を抑制しているが、CAFs が豊富に存在する原発巣では、転移増殖抑制シグナルの産生が抑制され、転移が促進すると推測している。

2. 研究の目的

癌死亡の90%は転移に起因しているが、転移のメカニズムは未だ明らかでない。大腸癌の転移再発は、原発巣の外科的な切除後2年以内に生じることが多い。このことから申請者は、原発巣は何らかの転移抑制シグナルを産生し転移巣の増殖を制御しているが、原発巣の切除によりその抑制シグナルが消失することで転移の発症が促進される可能性を想像している。また、高転移性癌では、癌間質の主な構成細胞である線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) がこの原発巣由来の転移抑制シグナルを阻害することにより、結果として転移を促進していることが予測される。申請者は、患者大腸癌を模倣した patient-derived xenograft (PDX) モデルを樹立し、単一癌細胞よりも上皮系/間葉系の性質を有した癌細胞集団がより顕著に転移を形成することを明らかにした実績がある。申請研究では、大腸癌 PDX モデルを使用し、原発巣由来の転移抑制シグナルを同定し、CAFs による転移抑制シグナルの阻害機構を解明しさらに前臨床マウスモデルを使用した新規転移抑制治療の基礎を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では転移性大腸癌を抑制する為、(1) 大腸癌 PDX モデルを使用し、大腸癌原発巣由来の転移抑制シグナルを同定し、(2) CAFs による転移抑制シグナルの制御機構を解明し、(3) 新規の抗転移治療法の基礎を前臨床マウスモデルを用いて確立する。

(1) 申請研究では、①13例の患者由来大腸癌オルガノイド (同所移植後、8例は自発転移能あり、5例は自発転移能なし) の培養上清を抽出する。②レンチウイルス由来 GFP

で大腸癌オルガノイド（最も高転移能を有した）をラベルし、免疫不全マウスに同所移植あるいは経門脈的に移植する。③①で抽出されたオルガノイドの培養上清を②で作製されたマウスに細胞移植後に経時的に経腹膜的に投与し、30日後に GFP 陽性転移巣のシグナルを定量する。最初はパイロット実験として、各群2匹のマウスを用いる。転移巣の抑制効果がみられた場合は、再現性を確認するために各群6-8匹のマウスを使用する。また転移巣の抑制能を評価し、その能力別にグループ分けをする。次に転移抑制作用を示した群、示さなかった群のオルガノイド培養上清を用いてサイトカイン定量抗体アレイを施行し、転移抑制性オルガノイドで高発現している因子を同定する。

(2) 患大腸癌由来 CAFs を樹立して、大腸癌オルガノイドと免疫不全マウスに共移植する。申請者は、大腸癌オルガノイドのみが移植された場合と比較し、大腸癌由来 CAFs と共移植された場合は転移が促進されることを予測している。そして CAFs が課題(1)で同定された転移抑制因子の発現を抑制するか否かを調査するために、CAFs + 大腸癌オルガノイド、対照正常線維芽細胞 + 大腸癌オルガノイドおよび大腸癌オルガノイドのみの同所移植で形成された癌塊より作製した切片を使用し、上記の候補因子の特異的抗体を用いた免疫組織染色を施行する。申請者は、CAFs が大腸癌オルガノイドにおける上記の転移抑制因子の発現を抑制することにより転移形成を促進していると推測している。

(3) 原発巣由来転移抑制因子の治療効果を *in vivo* で検討するために、GFP 陽性大腸癌オルガノイドをマウスに同所移植する。その後、課題(1)で転移抑制因子として同定された3種類の因子のリコンビナント蛋白を細胞移植後に経時的に経腹膜的に投与し、30日後に GFP 陽性転移巣のシグナルを定量する。加えて、GFP 陽性大腸癌オルガノイドをマウスに経門脈的に注入して作製された実験的肝臓転移モデルにおいても、転移抑制因子のリコンビナント蛋白投与群および非投与群で、GFP シグナルを評価する。リコンビナント蛋白の投与が転移形成を抑制することが予期される。

4. 研究成果

本研究において22例の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た。これらの検体を酵素処理後、**primary culture** し21例で CAFs およびコントロールの線維芽細胞のペアアードの樹立に成功した。また、がん組織の一部を酵素処理し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。それ故、研究に必要な臨床サンプルからの線維芽細胞とヒト大腸癌オルガノイドの樹立に成功した。RNA-seq によるトランスクリプトーム解析も現在施行中である。

原発巣由来の転移抑制シグナルを同定する為に、研究室で長期培養後に株化された悪性の高い細胞株は使用せずに、患者由来のオルガノイドを使用した大腸癌 PDX モデルの樹立を試みた。しかしながら、2, 3例のオルガノイドを高度免疫不全マウスの皮下に移植し癌の形成能を検討したが、癌増殖が非常に遅く、移植後6カ月以内に癌を形成することはなかった。今後12か月まで経過観察し、もし癌の形成が見られた場合は、PDX より癌オルガノイドを樹立し実験に用いることも検討したい。オルガノイドの高度免疫不全マウスへの経門脈的移植による肝臓転移モデルの作製も今後検討予定である。

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 Sugimoto K, Sakamoto K, Ii Y, Amemiya K, Sugo H, Ito T, Munakata S, Takahashi M, Kojima Y, Tomiki Y, Sato K, Saiura A, Kawasaki S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Significance of postoperative adjuvant chemotherapy with an oxaliplatin-based regimen after simultaneous curative resection for colorectal cancer and synchronous colorectal liver metastasis: a propensity score matching analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Surg.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12893-021-01193-4.	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 Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Koyama Y, Sulidan K, Komiyama H, Saeki H, Ohtsuji N, Ito Y, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A.	4. 巻 146
2. 論文標題 Metastatic seeding of human colon cancer cell clusters expressing the hybrid epithelial/mesenchymal state	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 2547-2562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.32672.	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
---------	---------